

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
DIVISÃO DE MEDICINA EXPERIMENTAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA



**Estudo Funcional do DD3 no Câncer de Próstata e sua
Interação com a Via do Receptor de Androgênio**

Aluno: Luciana Bueno Ferreira

Orientador: Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

Rio de Janeiro - RJ
2011

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
DIVISÃO DE MEDICINA EXPERIMENTAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA

**Estudo Funcional do DD3 no Câncer de Próstata e sua
Interação com a Via do Receptor de Androgênio**

Aluno: Luciana Bueno Ferreira

Orientador: Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

Dissertação de mestrado
apresentada ao Instituto
Nacional de Câncer como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de
Mestre em Oncologia

Rio de Janeiro - RJ
2011

F383e Ferreira, Luciana Bueno

Estudo funcional do DD3 no câncer de próstata e sua interação com a via do receptor de androgênio / Luciana Bueno Ferreira. – Rio de Janeiro, 2011. 93f. : il. graf. tab.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia - Instituto Nacional de Câncer, 2011.

Orientadora: Etel Rodrigues Pereira Gimba.

1. Neoplasias da Próstata. 2. Receptores Androgênicos. 3. RNA não codificantes. 4. DD3. I. Gimba, Etel Rodrigues Pereira (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer. III. Título.

CDD 616.99463042

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
DIVISÃO DE MEDICINA EXPERIMENTAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA

**Estudo Funcional do DD3 no Câncer de Próstata e sua
Interação com a Via do Receptor de Androgênio**

Aluno: Luciana Bueno Ferreira

Comissão examinadora

Presidente:

Etel Rodrigues Pereira Gimba (Orientadora - INCA)

Examinadores:

Luiz Eurico Nasciutti (Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ)

Marcelo Alves Soares (Programa de Genética - INCA/ Departamento de Genética - UFRJ)

Rosane Vianna Jorge (Programa de Farmacologia - INCA)

Claudia Esther Alicia Rocio Hassan (CEMO - INCA)

Cristiane Ramos (Serviço de Pesquisa Urogenital-Departamento de Anatomia - UERJ)

Data da Defesa: 29/03/2011

Rio de Janeiro - RJ
2011

AGRADECIMENTOS

À espiritualidade maior, pela oportunidade;

À minha família, em especial à minha mãe, ao apoio irrestrito ao meu crescimento intelectual e à todas as minhas decisões;

À minha orientadora Etel Gimba, pela orientação competente, pela confiança, por todas as sugestões, otimismo e pelo constante estímulo;

Ao Luiz Ricardo e Adriana Neves pela colaboração e discussão de dados;

À Cinthya e ao Maurício pela colaboração e ajuda nos ensaios de morte celular;

Ao Douglas pela ajuda com experimentos de interferência em horários não convencionais;

À técnica Fernanda, que ajuda diariamente na rotina do laboratório e em nossos projetos;

Aos pesquisadores da Medicina Experimental, coordenadores de laboratório, pelo auxílio com equipamentos, materiais e ensinamentos ministrados;

Às secretárias Thaís e Suely que sempre muito solícitas e educadas me auxiliaram com tudo que precisei;

À Lívia e Vanessa pelos bons momentos, pela amizade e apoio dentro e fora do laboratório;

Ao Pedro pelo companheirismo e força que se fazem presentes diariamente mesmo estando tão longe durante estes dois anos;

À Aline, pelas demonstrações de amizade e confiança;

À Marcela e Mariana pela amizade e pelas horas de descontração durante o almoço e café;

À todos amigos do laboratório que contribuíram, cada um à sua maneira, para a realização deste trabalho;

Aos meus amigos de convívio pessoal Lucélia, Bruno, Marilene e Melissa pela amizade e apoio de sempre;

Ao Instituto Nacional de Câncer, pela oportunidade oferecida;

À todas as agências de fomento pelo apoio financeiro,

Obrigada.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABELAS	4
LISTA DE ABREVIACÕES	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	10
Glândula Prostática	10
Características da glândula	10
Câncer de próstata	12
Aspectos Moleculares	14
Diagnóstico do Câncer de Próstata:	16
RNAs não codificantes (ncRNAs)	18
O gene DD3/PCA3	22
DD3/PCA3 no diagnóstico do CaP	25
Via do Receptor de Androgênio	30
Androgênios (Hormônios Sexuais) e o Receptor de Androgênio (AR)	30
Mecanismos de ação do androgênio	32
Câncer de Próstata Independente de Androgênio (AIPC)	34
OBJETIVOS	38
Objetivo geral	38
Objetivos específicos	38
MATERIAIS E MÉTODOS	39
Cultivo das Linhagens celulares	39
Extração de RNA Total	39
Síntese de cDNA	40
RT-PCR e PCR em Tempo Real	40
Ensaio de Silenciamento Gênico por Interferência de RNA	42
Padronização das condições de transfecção dos siRNAs em células LNCaP	43
Padronização dos ensaios de inibição de expressão por interferência de RNA.	44

Transfecção dos siRNAs específicos para o DD3 em células LNCaP e PC345	
Ensaio de ativação dos genes DD3 e genes responsivos ao Receptor de Androgênio (AR) com androgênio (DHT) e anti-androgênio (Flutamida)	46
Ensaio de proliferação com cristal violeta	46
Ensaio de viabilidade celular com Azul de Tripán	47
Ensaio de avaliação de núcleos picnóticos de células LNCaP por marcação com DAPI	47
Fracionamento de células LNCaP	48
Amplificação de fragmento completo do transcrito DD3	48
Análises estatísticas	50
RESULTADOS	51
1. O transcrito DD3 é superexpresso na linhagem tumoral de próstata LNCaP	51
2. Inibição da expressão do transcrito DD3 mediada por siRNA específico em células LNCaP	52
3. O transcrito DD3 parece estar envolvido na sobrevivência de células tumorais de próstata	53
3.1. Detecção de núcleos picnóticos associado com redução de níveis de expressão do transcrito DD3 em células LNCaP	55
4. Células com menores níveis de expressão do DD3 apresentam efeito exacerbado de indução de morte quanto tratadas com o siRNA específico para o DD3.	57
5. O nível de expressão do transcrito DD3 é regulado pela via do receptor de androgênio (AR)	59
6. O silenciamento do DD3 altera o perfil de expressão de genes regulados pela via do receptor de androgênio (AR)	61
7. Avaliação da possível função do transcrito DD3 pela superexpressão em células LNCaP	63
8. Caracterização do perfil de expressão do DD3 em distintos compartimentos celulares	66
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÕES	80
PERSPECTIVAS E PLANOS FUTUROS	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Localização anatômica da glândula prostática na pelve	10
Figura 2 - Divisão anatômica da glândula prostática (modificado de Marzo, 2007)	11
Figura 3 - Estimativa da incidência de câncer na população brasileira para o ano de 2010.....	13
Figura 4 - Paradigmas de como funcionam os ncRNAs.....	21
Figura 5 - O gene DD3/PCA3 está contido no cromossomo 9q21-22.....	24
Figura 6 - Teste uPM3.....	27
Figura 7 - Teste diagnóstico do DD3.....	28
Figura 8 - Diagrama ilustrando a coleta da amostra do DD3	29
Figura 9 - Diagrama ilustrando a coleta da amostra do DD3	33
Figura 10 - Cinco vias possíveis para a independência de androgênio	36
Figura 11 - Localização dos RNAs de interferência para do DD3.....	43
Figura 12 - Análise por FACS da eficiência de transfecção com siRNA Cy3 em células LNCaP transfectadas com diferentes volumes de reagentes de transfecção	44
Figura 13 - Ensaio de Interferência do GAPDH	45
Figura 14 - Perfil de expressão do DD3 em linhagens celulares de próstata ...	51
Figura 15 - Eficiência da redução da expressão do DD3 por siRNA em células LNCaP	53
Figura 16 - Efeitos do siRNA DD3-2 na expressão do transcrito e na sobrevivência de células LNCaP	54
Figura 17 - Efeitos da redução do nível de expressão do DD3 em células LNCaP	56
Figura 18 -Efeitos da redução do nível de expressão do DD3 em células PC358	
Figura 19 - A expressão do transcrito DD3 é regulada pela via do AR.....	60
Figura 20 - Perfil de expressão de genes após ativação do AR e transfecção com siDD3-2.....	63
Figura 21 - Oligonucleotídeos para amplificação do DD3	64
Figura 22 - Combinações de oligos na unidade transcricional do DD3.....	65
Figura 23 - Amplificação dos fragmentos do transcrito DD3.....	66
Figura 24 - Expressão do transcrito DD3 em compartimentos celulares	68

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos para amplificação de genes responsivos ao AR e DD3	42
Tabela 2 - Oligonucleotídeos para transcrito DD3	49
Tabela 3 - Combinações de oligonucleotídeos para DD3	50

LISTA DE ABREVIÇÕES

ABS	absorbância
AR	receptor de androgênio
ARE	elemento de resposta ao androgênio
AIPC	câncer de próstata independente de androgênio
AKT	proteína cinase B
ATCC	<i>american type culture collection</i>
BPE	<i>Bovine Pituitary Extract</i>
CaP	câncer de próstata
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
CO ₂	dióxido de carbono
CG	citossina/guanina
CCS	charcoal stripped serum
DD3	<i>differential display code 3</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DHT	dihidrotestosterona
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfato
DAPI	<i>2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride</i>
EGF	<i>Endothelial Growth Factor</i>
HPB	hiperplasia prostática benigna
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Kb	quilobases
KSF	<i>keratinocyte serum-free</i>
miRNA	micro RNA

mRNA	RNA mensageiro
mL	mililitros
M	molar
ncRNA	RNA não codificante
ORF	região aberta de leitura
PSA	antígeno específico prostático
pb	pares de bases
piRNA	<i>piwi-interacting</i> RNA
PBS	tampão fosfato-salino
qRT-PCR	<i>quantitative-reverse transcription PCR</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
rRNA	RNA ribossomal
RNA	ácido ribonucléico
RTK	receptor tirosina cinase
rpm	rotações por minuto
snoRNA	RNA nucleolar
siRNA	RNA de interferência
snRNA	RNA nuclear
siDD3	RNA de interferência para o DD3
tRNA	RNA transportador
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
USTR	ultra-sonografia transretal
uPM3	teste de urina para diagnóstico de câncer de próstata
U	unidade
Xist	<i>X-inactive specific transcript</i>
18S	RNA ribossomal

RESUMO

O gene DD3 corresponde a um RNA não codificante (ncRNA) específico da próstata. O seu papel como marcador diagnóstico no câncer de próstata (CaP) apresenta-se bem estabelecido, porém muito pouco se sabe até o presente momento sobre sua função na biologia deste tumor, bem como sobre seu envolvimento com a via do receptor de androgênio (AR). Este trabalho teve por objetivo caracterizar o papel funcional do ncRNA DD3 no CaP através da alteração de sua expressão na linhagem celular LNCaP, bem como avaliar seu envolvimento na via do AR. A função deste transcrito foi avaliada através da redução de sua expressão em células LNCaP utilizando RNAs de interferência específicos. Ensaios de viabilidade celular foram analisados por coloração com cristal violeta e azul de tripan e a avaliação da proporção de núcleos apoptóticos por marcação de núcleo com DAPI. Centrifugações fracionadas foram utilizadas para caracterizar as frações celulares em que o DD3 está localizado. As células LNCaP com DD3 silenciado apresentaram redução da viabilidade celular e aumento da proporção de núcleos picnóticos, indicativos de células em apoptose. O tratamento da LNCaP com o androgênio DHT aumentou significativamente a expressão do DD3, sendo esta ativação revertida pelo anti-androgênio flutamida, demonstrando que a indução da expressão do DD3 é mediada por esta via. A expressão de genes de resposta ao AR foi alterada quando a expressão do DD3 foi diminuída, indicando ser o DD3 um regulador da expressão destes genes. A tentativa de amplificar o transcrito completo do DD3 associada com predições de estruturas secundárias evidenciou que o DD3 pode ser processado em transcritos menores. Nossos dados indicam que este ncRNA é expresso majoritariamente no núcleo, em vesículas e ribossomos. Em conjunto, estes dados sugerem que o DD3 regula a expressão de genes envolvidos com a sobrevivência de células de CaP. Sugerem também, que após ser processado, deverá exercer funções relacionadas ao controle da expressão gênica, principalmente no núcleo e em vesículas. Sendo assim, o DD3 pode constituir-se em importante alvo alternativo para o CaP, especialmente no CaP refratário contra tratamento anti-androgênico. Desta forma, os resultados gerados por este estudo dão base ao

melhor entendimento das vias de sinalização ativadas pelo AR e de genes reguladores envolvidos nessa via, tal como o ncRNA DD3.

Palavras-chave: Neoplasias da Próstata; Receptores Androgênicos; RNA não codificante; DD3.

ABSTRACT

The DD3 gene corresponds to a non-coding RNA (ncRNA) specifically expressed in prostate tissues. Its role as a marker for prostate cancer (CaP) diagnosis is well established, although very few is currently known about its role on PCa biology as well about its involvement in the androgen receptor (AR) pathway. The purpose of this work was to characterize the functional role of DD3 ncRNA in PCa using LNCaP cells as a model and to evaluate its involvement in the AR pathway. The role of DD3 transcript was evaluated using gene knockdown assays in LNCaP cells using DD3 specific siRNAs. Cellular viability was analyzed by trypan blue exclusion and crystal violet assays and the evaluation of apoptotic nuclei was performed by DAPI staining. Differential centrifugation and RT-PCR assays were used to characterize the cellular fractions in which DD3 is expressed. LNCaP cells transfected with siRNA-DD3 demonstrated a decrease in cell viability and an increase in the proportion of pyknotic nuclei, which was indicative of cells undergoing apoptosis. LNCaP treatment with DHT androgen significantly activated DD3 expression by 11-fold, indicating that DD3 is regulated by the AR activation. Once no full length DD3 transcript could be amplified, in addition to observed predicted secondary structures in this transcript, we suggest that DD3 can be processed in minor transcripts. Our data indicate that this ncRNA is mostly expressed in the nucleus, cellular vesicles and ribosomes. Altogether, these data suggest that DD3 is a transcriptional regulator of genes involved on PCa cell survival. It also suggest that, after being processed, DD3 can perform its role on gene regulation mainly in the nucleus or cellular vesicles. Hence, DD3 could correspond to an important therapeutical target for PCa, especially for treatment of hormone refractory PCa. The results generated by this study provide the basis for a better knowledgement about signaling pathways activated by AR

and on the regulation of genes involved on this pathway, such as the ncRNA DD3.

Keyword: Prostatic Neoplasms; Receptors, Androgen; Non-coding RNA; DD3.

INTRODUÇÃO

Glândula Prostática

Características da glândula

A próstata corresponde à maior glândula acessória do sistema genital masculino, medindo cerca de 3 cm de comprimento. A parte glandular compõe aproximadamente dois terços da próstata, sendo o outro terço fibromuscular (Moore; Dalley, 2001). Está localizada imediatamente abaixo da bexiga urinária onde envolve a porção inicial da uretra (Figura 1) (Smith, 1979; Van De Graaff, 2003).

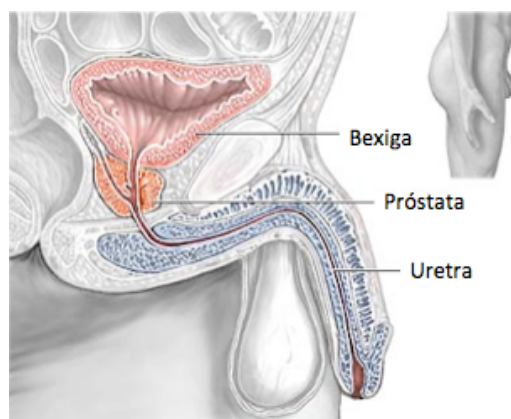


Figura 1 - Localização anatômica da glândula prostática na pelve (disponível em <http://healthguide.howstuffworks.com/prostate-cancer-in-depth.htm>).

Essa glândula é composta por ácinos e um complexo sistema de ductos ramificados, cujos produtos de excreção são lançados dentro da uretra prostática (Rohr; Barthsch, 1980). Sua função é produzir uma substância que, juntamente com a secreção da vesícula seminal e os espermatozóides produzidos nos testículos, vão formar o sêmem ou esperma (Smith, 1979; Gosling *et al.*, 1992).

A organização da próstata foi proposta por McNeal (1981), desenvolvendo o conceito de zona anatômica que forma a base atual para

descrever a localização dos processos neoplásicos nesse órgão. De acordo com esse conceito, a parte glandular da próstata é composta por uma grande zona periférica e uma pequena zona central que juntas constituem aproximadamente 95% da glândula, como mostra a Figura 2. O restante é composto pela zona de transição e pelas glândulas periuretrais. Embora as zonas periférica e de transição possam ser distinguidas anatomicamente e pela composição de seus elementos do estroma, elas compartilham uma estrutura acinar similar que reflete uma origem comum embrionária (sino urogenital). As glândulas da zona central são morfologicamente distintas, devido às suas origens embrionárias diferentes. Cerca de 60 a 70% dos tumores de próstata ocorrem na zona periférica e de 10 a 20% ocorrem na zona de transição. Apenas 5 a 10% dos tumores se originam na zona central. A hiperplasia prostática benigna (HPB) se desenvolve principalmente no estroma periuretral e nas glândulas da zona de transição (Schulz, 2003).

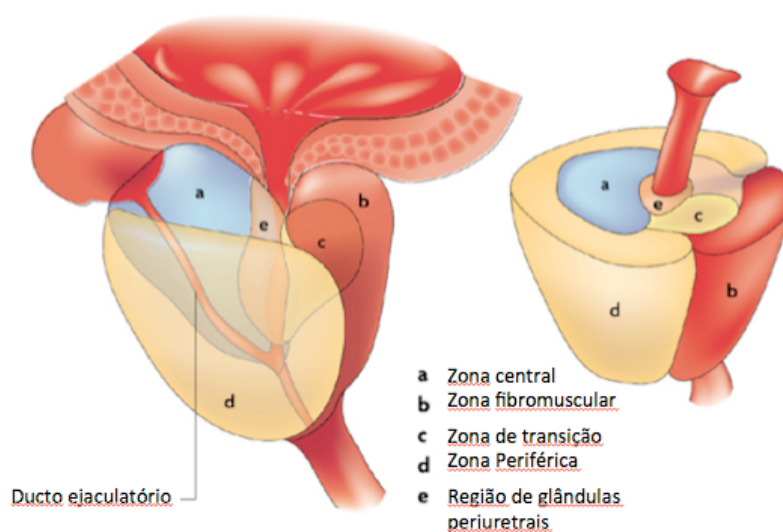


Figura 2 - Divisão anatômica da glândula prostática (modificado de Marzo, 2007)

Câncer de próstata

O câncer de próstata (CaP) corresponde à malignidade mais comum detectada em homens e é a segunda causa de morte por câncer entre homens nos Estados Unidos (Penson *et al.*, 2007) e no Brasil, tornando-se um dos principais problemas de saúde nos países ocidentais industrializados (Bishop *et al.*, 2011). A sua incidência vem aumentando, principalmente pela maior expectativa de vida dos homens, sendo que após os 85 anos, a maioria dos homens apresenta este câncer em sua forma histológica (Andriole *et al.*, 2004).

O aumento da incidência do CaP também é devido à melhoria nas técnicas diagnósticas, em especial, com o advento do uso da detecção do antígeno prostático específico (PSA) para rastreamento desta neoplasia (Lilja *et al.*, 2008). Entretanto, a sua incidência e mortalidade variam em diferentes regiões geográficas, com forte influência regional e também racial (Hsing *et al.*, 2000).

No Brasil, o CaP é o segundo em incidência, sendo superado somente pelos tumores de pele não-melanoma. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o número de casos novos estimados para o ano de 2010 foi de 52.350 (Figura 3). Estes valores correspondem a um risco estimado de 54 casos novos a cada 100 mil homens. Estima-se que a frequência para a região Sul seja de 69/100.000, 62/100.000 na região Sudeste, 48/100.000 na região Centro-Oeste, 43/100.000 na região Nordeste e, 24/100.000 na região Norte.

Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira

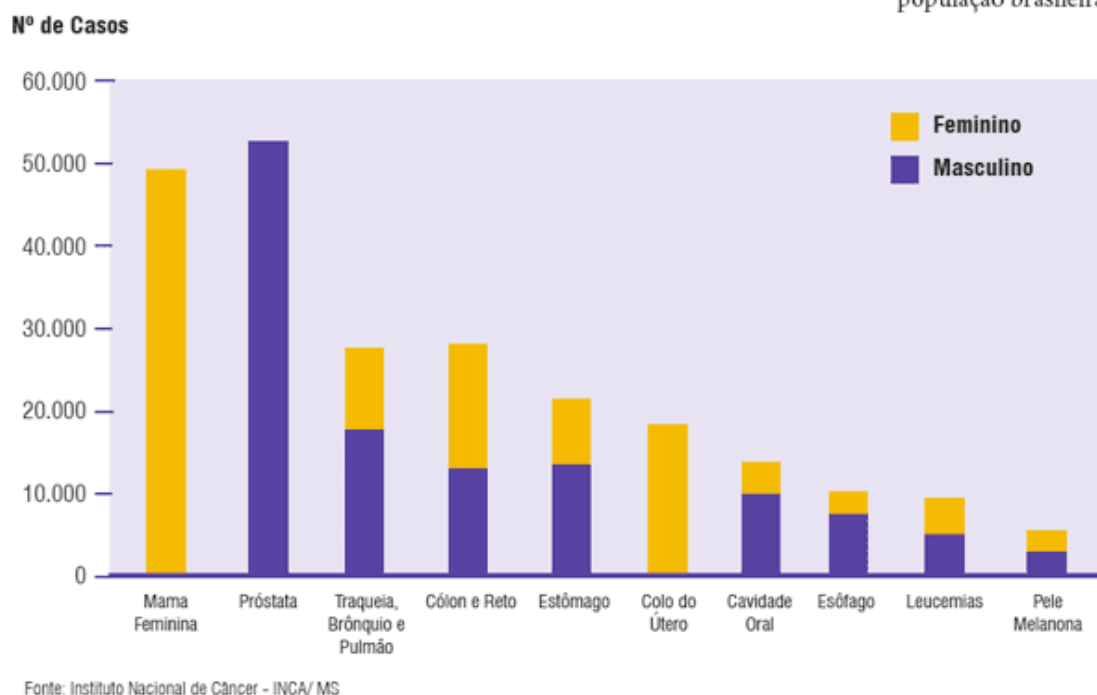


Figura 3 - Estimativa da incidência de câncer na população brasileira para o ano de 2010

O CaP é predominantemente uma doença de homens idosos, e sua incidência aumenta abruptamente na 70^a década de vida. Embora a etiologia do CaP seja ainda pouco compreendida, sabe-se que o aumento da incidência é em parte causado pelo envelhecimento da população, além do estilo de vida. Outros fatores de risco são considerados, tais como história familiar, etnia e dieta alimentar (Haas *et al.*, 1997).

A hereditariedade é um dos fatores envolvidos na etiologia do CaP, visto que homens com um familiar de primeiro grau com esta doença têm um risco duas vezes maior de desenvolvê-la comparados com homens que não têm. Esta chance eleva-se em até 11 vezes se há 2 ou 3 membros da família acometidos. Homens com um irmão com CaP têm maior probabilidade de ter a neoplasia em relação àqueles cujo pai teve a doença (Reiter *et al.*, 2000).

Estudos da literatura indicam que a dieta ocidental é pobre em fatores protetores, em nutrientes como o selênio, vitaminas como o folato, fitoestrógenos e antioxidantes como o licopeno. Por outro lado, o consumo de alto teor de gordura, de produtos lácteos e de carne vermelha têm emergido como fatores de risco em estudos epidemiológicos (Schulz. *et al.*, 2003).

Aspectos Moleculares

O câncer é uma doença causada por alterações genéticas que provocam mudanças no padrão de expressão de genes, inativando supressores de tumor e ativando os proto-oncogenes (Abate-Shen *et al.*, 2011). Essas modificações desorganizam a homeostase tissular, seja por aumento desordenado da divisão celular, como pela inibição da apoptose, promovendo o surgimento dos tumores (Cairns *et al.*, 2011).

A maioria das alterações genéticas são adquiridas ao longo da progressão do tumor, sendo assim consideradas mecanismos da tumorigênese. Contudo, algumas podem ser herdadas, resultando em predisposição ao câncer (De Marzo *et al.*, 2007).

Por muito tempo atribuiu-se a origem do tumor prostático como determinada apenas pela estimulação hormonal da testosterona, porém, atualmente se sabe que o desenvolvimento tumoral é também regido geneticamente, sendo em 10% dos casos por transmissão hereditária e os demais por alterações genéticas esporádicas (Hughes *et al.*, 2005).

Mutações em oncogenes e genes supressores de tumor provocam alterações em múltiplas vias de sinalização intracelulares que alteram o metabolismo das células tumorais e as reestruturam para permitir seu crescimento e sobrevivência. Na verdade, é provável que as alterações metabólicas sejam necessárias para que as células tumorais sejam capazes de responder aos sinais proliferativos que são enviados pelas vias de sinalização oncogênicas (Cairns *et al.*, 2011).

Além das mudanças genéticas que alteram o metabolismo das células tumorais, o microambiente tumoral anormal tem um papel importante na determinação do fenótipo metabólico das células tumorais (Cairns *et al.*, 2011).

Adicionalmente, um grande número de anormalidades moleculares têm sido descritas para esta neoplasia, incluindo perda ou ganho cromossômico, amplificação gênica, mutações que levam a um aumento ou decréscimo em expressão gênica, e mutações resultando em mudanças em funções de proteínas (Abate-Shen *et al.*, 2011).

Diversos estudos recentes de expressão gênica em larga escala em CaP, utilizando microarranjos de cDNA, microarranjos em tecidos e outros

métodos têm contribuído para o entendimento dessas alterações (Ngan *et al.*, 2009; Dahiya *et al.*, 2008; Heemers *et al.*, 2011; Reynolds *et al.*, 2007;). Os eventos moleculares que ocorrem no desenvolvimento da independência ao androgênio têm sido amplamente investigados (Schroder *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2008), particularmente por estudos de ativação do receptor de androgênio (AR) independente de ligante (Culig *et al.* 2006).

Muitos genes associados com regulação de ciclo e proliferação celular têm sido implicados. Mutações em p53 são comuns em CaP, particularmente em doença avançada, assim como seu efetor p21 tem sido associado com o desenvolvimento da independência ao androgênio. O gene supressor de tumor, PTEN, localizado no cromossomo 10q23, uma região na qual a perda de heterozigozidade ocorre frequentemente em CaP, codifica uma fosfatase que regula negativamente a progressão do ciclo celular. O proto-oncogene c-Met que codifica o fator de crescimento hepatócito, tem sua expressão aumentada de acordo com o aumento do escore de Gleason, e mais de 90% dos espécimes metastáticos foram positivos para c-Met, ao contrário de 50% de amostras primárias examinadas no mesmo estudo (Foley, 2004).

Muitos esforços têm sido destinados ao melhor entendimento dos complexos mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese e progressão do CaP (Kung & Evans, 2009; Mattick, 2009;). O surgimento de tecnologias de expressão de genes em larga escala permite a análise simultânea da manifestação de milhares de genes, e centenas de amostras de tecido, facilitando o rápido progresso na identificação dos principais mecanismos moleculares no desenvolvimento de CaP (Foley, 2004).

Diagnóstico do Câncer de Próstata:

No que se refere ao diagnóstico do CaP, os métodos atualmente mais utilizados são o exame do toque retal, a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA), a ultra-sonografia transretal (USTR) e a biópsia da próstata.

O exame do toque continua a ser o principal exame para a avaliação clínica inicial da próstata. O toque retal foi o primeiro teste de triagem e ainda é rotineiramente utilizado juntamente com o teste do PSA. Esse método possui a vantagem de detectar tumores que não secretam o PSA. Em vários estudos realizados desde a primeira investigação de sua precisão em 1956, o seu valor preditivo positivo tem sido em torno de 50% (Borley & Feneley, 2009). Entretanto, o toque retal é um teste que possui limitações, mesmo quando realizado por médicos experientes. Ele pode falhar em identificar tumores confinados ao órgão ainda em um estágio curável (Yamamoto *et. al.*, 2001). Isso porque durante o exame, somente as porções posterior e lateral da próstata conseguem ser palpadas, deixando cerca de 40% dos tumores fora de seu alcance.

O PSA corresponde a uma serina protease que foi descrita pela primeira vez em 1975 (Lilja *et al.*, 2008). É produzida pelo epitélio da próstata e pelas glândulas periuretrais ou bulbouretrais (glândula acessória) e está presente em grandes quantidades em secreções prostáticas. Apresenta como função degradar proteínas de alto peso molecular, que são sintetizadas na vesícula seminal, a fim de inibir a coagulação do sêmen. Seus níveis séricos estão aumentados na tumorigênese da próstata, pois com a perda normal da arquitetura da glândula, o PSA passa a ter acesso à circulação periférica.

Seu uso clínico para diagnóstico e seguimento do câncer prostático vem sendo empregado desde 1986 (Reynolds *et al.*, 2007), sendo reconhecido como o principal marcador do CaP e utilizado para selecionar populações e monitoramento de pacientes após terapia. No entanto, esse marcador possui baixo valor preditivo, uma vez que a elevação de seus níveis séricos não ocorre somente no CaP.

Como um biomarcador, o PSA é tecido específico, mas não câncer específico e, mais recentemente adquiriu certa utilidade como marcador de

massas epiteliais benignas, pois a produção do PSA aumenta no epitélio benigno com a idade (Wiygu & Babayan, 2009). Seus níveis são regularmente elevados em homens com hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatites e outras doenças não malignas, resultando em redução de especificidade (Nickel, 2007), além do fato de o PSA ser encontrado em outras neoplasias, como o câncer de mama (Iacoangeli *et al.*, 2004).

Outra modalidade muito comum de diagnóstico de CaP corresponde à ultra-sonografia transretal (USTR). A USTR fornece imagens da próstata e das vesículas seminais permitindo delinear sua imagem, identificar cistos, abscessos e calcificações dentro da próstata, e ser usado para determinar o seu volume.

O rastreamento das anomalias da próstata também pode ser realizado pela biópsia, que é indicada sempre que houver dúvidas ou anormalidades no toque retal ou no PSA, sendo o diagnóstico definitivo de CaP dado pelo estudo histopatológico do tecido proveniente da biópsia. Nessa avaliação determina-se o grau de diferenciação celular, denominado de Grau de Gleason.

Atualmente, estudos sobre o diagnóstico molecular do CaP e outras afecções prostáticas representam uma nova possibilidade de auxílio ao uso do PSA. Esses estudos demonstram tentativas de melhoria da segurança no diagnóstico, no controle pós-tratamento e no acompanhamento clínico dos pacientes, representando promessas de incorporação na prática clínica (Borley & Feneley, 2009; Hiroyoshi *et al.* 2004; Rogers *et al.* 2004; Ornstein *et al.* 2004).

Sendo assim, tem sido abordada a importância da expressão de um RNA não codificante (ncRNA), proveniente do gene DD3, como marcador molecular relevante no diagnóstico do CaP em amostras como urina e sangue periférico (Reynolds *et al.*, 2007), biópsias, líquido seminal ou massagem prostática (de Kok *et al.*, 2002), e fluido prostático (van Gils *et al.*, 2007). Jung *et al.* (2004) detectou mRNA de DD3 em sangue por RT-PCR e, por técnica similar, Marangoni *et al.* (2005) utilizaram o DD3 como um marcador para detectar células de CaP circulantes em sangue.

O marcador de urina uPM3 detecta o DD3 que se apresenta expresso especificamente no tecido da próstata, o qual apresenta-se de 60 a 100 vezes superexpresso nessa neoplasia. Ele é excretado na urina e medido em amostra

coletada após o exame do toque retal. O teste uPM3 oferece especificidade superior e precisão em comparação com o PSA total e PSA livre e tem sido utilizado principalmente para predição do câncer na re-biópsia, ao invés de ser utilizado no diagnóstico primário. O resultado indica a probabilidade de câncer para o paciente, no entanto, ele deve ser empregado juntamente com outros testes de diagnóstico de CaP (Bostwick *et al.*, 2006).

RNAs não codificantes (ncRNAs)

O sequenciamento do genoma humano surpreendeu a muitos quando foi determinado que existem apenas cerca de 20.000 genes codificadores de proteínas, o que representa menos de 2% da sequência total do genoma (Consórcio Internacional de Sequenciamento do Genoma Humano, 2004).

Rapidamente se tornou muito claro que a complexidade do desenvolvimento e da fisiologia dos humanos não pode ser explicada apenas pelo número de genes que codificam proteínas, uma vez que eucariotos menos complexos como o nemátodo *Caenorhabditis elegans* possui um número muito semelhante de genes codificadores de proteínas (Wilusz *et al.*, 2009).

O "splicing" alternativo de transcritos que codificam proteínas, bem como modificações pós-traducionais das proteínas aumentam a diversidade e a funcionalidade do proteoma, em parte explicando esse aumento de complexidade. Além disso, tem havido uma explosão de investigações acerca dos possíveis papéis funcionais para os outros 98% do genoma humano que não codificam proteínas (Wilusz *et al.*, 2009).

Nesse sentido, estudos recentes utilizando clonagem de DNA complementar em larga escala e "arrays" de genoma revelam que a maioria dos genomas são altamente expressos e que o número de ncRNAs é muito maior do que anteriormente previsto (Yazgan, Krebs, 2007). Os ncRNA são encontrados em abundância nas células. Segundo Mattick *et al.* (2001), aproximadamente 98% de todos os produtos transcritos do genoma humano correspondem à ncRNA.

Recentemente foram encontrados ncRNAs em surpreendente abundância, compondo novas classes e com funções inesperadas, envolvidos

no desenvolvimento dos organismos, na organização de domínios cromossômicos, no remodelamento de cromatina e em regulação da transcrição (ativação e repressão) (Costa, 2010; Barbarotto *et al.*, 2007). Além do DD3, comparações entre amostras de HPB e CaP, mostraram que 14 de outros 51 ncRNAs que foram diferencialmente expressos mostraram-se também superexpressos no CaP (Porkka *et al.*, 2007; Srikantan *et al.*, 2000).

A definição mais convencional para ncRNA é um RNA biologicamente funcional, ao invés de ser simplesmente um mensageiro intermediário entre DNA e proteínas. O primeiro ncRNA eucariótico (excluindo os já conhecidos snoRNAs, tRNAs e rRNAs) descrito na literatura foi um grande RNA chamado H19, o qual foi identificado como um gene de mamífero expresso em camundongos (Costa, 2007).

Alguns ncRNAs sofrem "splicing" alternativo e/ou são processados em produtos menores. Esses pequenos ncRNAs são partes integrantes de complexos ribonucleoprotéicos que virtualmente regulam todos os aspectos da regulação de genes (Costa 2005; Goodrich e Kugel 2006), e podem ser caracterizados da seguinte forma: (i) microRNAs (miRNAs), que possuem de 20 a 22 nucleotídeos de comprimento, são parcialmente complementares a um ou mais mRNAs, e podem também desempenhar a função de regular negativamente a expressão gênica pela ligação às regiões 3' não traduzida de um grupo específico de mRNAs (Pasquinelli *et al.*, 2005;. Angeloni *et al.*, 2006;. Presutti *et al.*, 2006), (ii) são pequenos RNAs de interferência (siRNAs), com 21 a 25 nucleotídeos de comprimento, levam à degradação de mRNAs específicos de maneira sequência-específica, com função de silenciamento gênico pós-transcricional (Morris, 2005), (iii) pequenos RNAs nucleares (snRNAs), que possuem entre 100 e 300 nucleotídeos, e estão envolvidos em "splicing" de RNA e manutenção dos telômeros (Hopper, 2006; O'Gorman *et al.*, 2006);. (iv) pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs), que estão envolvidos no processamento de rRNA e modificação e montagem de ribossomos (Eliceiri 2006; Kiss 2006; Rogelj 2006), e (v) tRNAs, que possuem de 75 a 95 nucleotídeos longos, e são parte integrante do processo de síntese de proteínas (Yoshihisa 2006).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos a respeito desses pequenos RNAs, e seus papéis nos processos celulares têm sido bem estabelecidos em

muitos casos. No entanto, existem milhares de transcritos de maior tamanho cujas funções ainda são desconhecidas (Claverie 2005; Mattick 2005; Goodrich e Kugel 2006; Mattick e Makunin 2006; Mendes Soares e Valcarcel 2006). Esses longos RNAs incluem transcritos derivados de íntrons ou regiões intergênicas, e mais provavelmente estão envolvidos em diferentes níveis de regulação gênica. No entanto, são escassas as evidências de conservação e funcionalidade, permanecendo obscuro o significado e função destes transcritos. Felizmente, mais evidências para as funções desses RNAs têm emergido a partir de estudos em diversos organismos como leveduras e humanos (Shamovsky e Nudler 2006). Essas evidências apóiam a mais recente convicção de que esses transcritos representam novos mecanismos de controle transcricional, ao invés de um ruído transcricional ou artefatos de clonagem, tais como moléculas truncadas, como se pensava anteriormente (Wang *et al.*, 2004).

Em relação às funções que estes ncRNAs podem desempenhar, incluem-se uma variedade de mecanismos complexos, como silenciar genes, transcrição de genes, desmetilação de DNA, estrutura dinâmica da cromatina, RNA de interferência, entre outros (Costa, 2007). A Figura 4 ilustra alguns dos paradigmas de como esses ncRNAs podem funcionar em nível molecular.

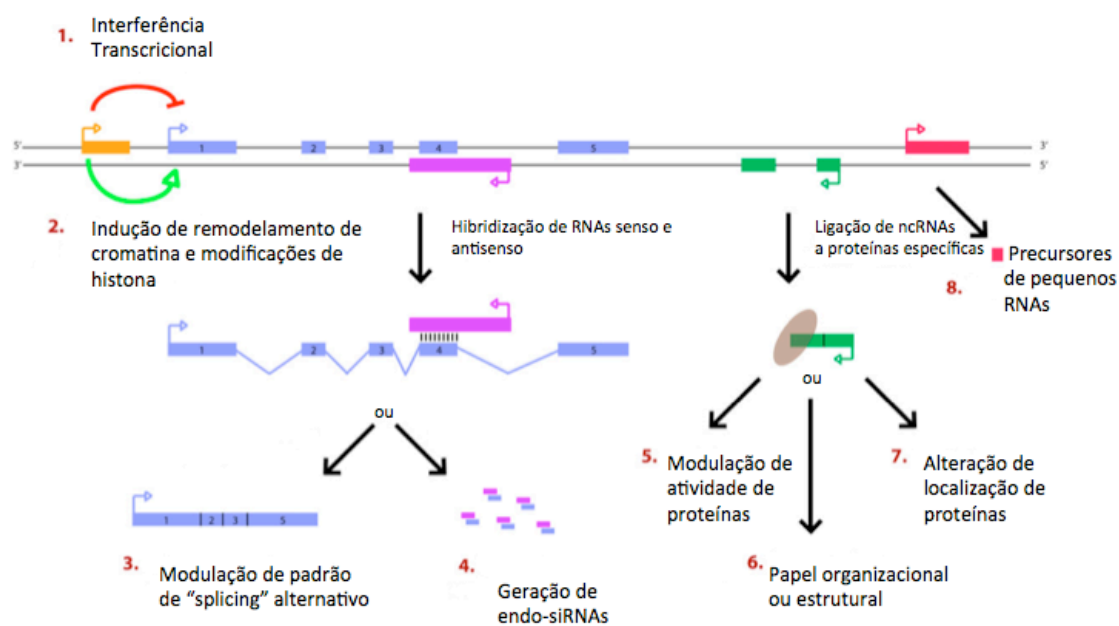


Figura 4 - Paradigmas de como funcionam os ncRNAs

Estudos recentes têm identificado uma variedade de funções reguladoras para os ncRNAs. A transcrição de um promotor localizado à 5' do gene (laranja) pode negativamente (1) ou positivamente (2) afetar a expressão de um gene situado à 5' (azul), inibindo o recrutamento de RNA polimerase II ou induzindo remodelamento de cromatina, respectivamente. (3) Um transcrito antisense (roxo) é capaz de hibridizar com outro transcrito em sentido oposto (azul) e bloquear o reconhecimento dos sítios de "splicing" pelo spliceossomo, resultando em um transcrito com "splicing" alternativo. (4) De outra forma, a hibridização de transcritos senso e antisense pode permitir a geração de siRNAs endógenos pela Dicer. Ou então, se ligando a proteínas específicas parceiras, um transcrito não codificante (verde) pode modular a atividade de proteínas (5), ou servindo como um componente estrutural que permite a formação de um complexo proteína-RNA (6), ou ainda alterando a localização de proteínas na célula (7). Longos RNAs não codificantes (rosa) podem também ser processados em pequenos RNAs, como miRNAs, piRNAs, e outras classes de transcritos não estão bem-caracterizadas (Modificado de Mattick JS *et al.*, 2009).

Sabe-se ainda que os ncRNAs podem participar de importantes vias na regulação da expressão de genes que codificam proteínas, visto que muitos deles parecem ter expressão tecido-específica (Ravasi *et al.*, 2006). Além disso, muitas funções dos ncRNA são atribuídas à suas particularidades estruturais (chamadas de motivos) e dentre esses tipos de RNAs estão os RNA^t (transportadores), RNA^r (ribossomais), snRNA (*small nuclear*), snoRNA (*small nucleolar RNA*), siRNA (*small interference RNA*), miRNA (*micro RNA*) e os RNAs catalíticos (ribozimas) (Akashi *et al.*, 2005).

Dados da literatura têm mostrado também que os ncRNAs podem agir como importantes executores da sinalização molecular das vias ligadas à oncogênese e supressão de tumores nas células (Chan *et al.*, 2005 e Takamizawa *et al.*, 2004) e regulação da apoptose (Fu *et al.*, 2006). ncRNAs como o H19 (Ayesh, 2002), o BC1 (Wang, 2002) e o MALAT (Ji, 2003) são reconhecidos como transcritos envolvidos na tumorigênese, enquanto o XIST é encontrado inativando o cromossomo X, sugerindo uma função associada à proteínas (Mercer *et al.*, 2009). O gene PCGEM1 é sabidamente envolvido no controle do ciclo celular de células de CaP (Fu *et al.*, 2006). Estes resultados indicaram claramente que os ncRNAs podem ser tão importantes como os genes codificadores de proteínas em condições patológicas como o câncer, reforçando a idéia de que sua expressão pode ser muito bem regulada para impedir o surgimento do câncer.

O gene DD3/PCA3

O gene DD3 foi identificado e caracterizado pela primeira vez por Bussemakers *et al.* (1999) pela técnica “differential display”, como um marcador altamente específico do carcinoma prostático.

Esses autores compararam a expressão de tecido normal e tumoral de próstata humana, no qual foi identificado um cDNA, o DD3, que se apresentou altamente expresso em 53 de 56 tumores prostáticos em comparação com tecido prostático não-neoplásico de alguns pacientes. Análises por RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos do DD3 indicaram que a expressão do mesmo é específica da próstata, pois nenhum produto pôde ser amplificado em 18 diferentes tecidos normais estudados. Além disto, amostras de outros tecidos tumorais e um grande número de linhagens celulares de outros tecidos foram analisados e nenhuma expressão desse gene foi detectada (Bussemakers *et al.*, 1999).

Posteriormente, foram feitas análises da sequência da região 5’ flanqueada do DD3, através das quais pôde ser caracterizado o promotor deste gene (Verhaegh *et al.*, 2000). O promotor foi transfectado em linhagem celular DD3 positiva (LNCaP) e em linhagens celulares DD3 negativas (PC-346C,

TSU-pr1, SW800, HT-29, entre outras), apresentando atividade promotora funcional somente na linhagem LNCaP, indicando que a atividade do promotor é específico nessa linhagem tumoral de próstata.

O gene DD3 localiza-se no cromossomo 9q21-22 e é composto por 4 exons, apresentando “splicing” alternativo no exon 2 e poliadenilação alternativa em 3 diferentes posições do exon 4, a qual produz 3 diferentes tamanhos de transcritos. Seu tamanho completo comporta uma região de aproximadamente 25 Kb, no qual o primeiro íntron é relativamente grande com aproximadamente 20 Kb, enquanto que os íntrons 2 e 3 são pequenos, contendo 873 e 227 pb, respectivamente.

No trabalho de Bussemakers *et al.* (1999), foi verificado por ensaios de “*northern blot*” que os exons 1, 3 e 4a estão presentes nos três diferentes transcritos contendo 0,6, 2,0 e 4,0 Kb cada um, enquanto o exon 4b está presente em dois grandes transcritos. O exon 4c está presente em somente um grande transcrito (4Kb), e o exon 2 pode ser parte de todos os três transcritos, mas só está presente em um número limitado de transcritos (5% dos clones de cDNA analisados).

Mais recentemente, Clarke *et al.* (2009) identificaram dois novos exons (2a e 2b), 4 novos sítios de poliadenilação e 4 novos sítios de iniciação de transcrição (Figura 5).

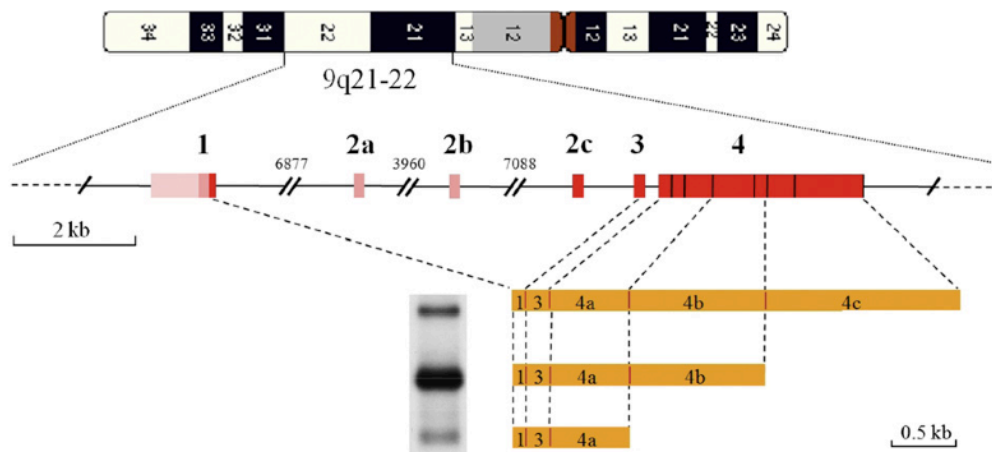


Figura 5 - O gene DD3/PCA3 está contido no cromossomo 9q21-22

Como descrito originalmente por Bussemakers *et al.* (1999), a unidade transcrricional do DD3 consiste de 4 exons (caixas vermelhas 1, 2c, 3 e 4) e 3 sítios de poliadenilação no exon 4 (caixas alaranjadas 4a, 4b, e 4c). O exon 2, é frequentemente retirado por “splicing” alternativo, estando ausente em 3 transcritos mostrados em “Northern Blot”. Clarke *et al.* (2009) identificaram novos exons (2a e 2b), 4 novos sítios de poliadenilação (linhas verticais no exon 4) e 4 novos sítios de iniciação de transcrição (exon 1, caixas cor-de-rosa e cor-de-rosa claro). (Modificado de Clarke *et al.* 2009).

O gene DD3 apresenta alta densidade de códons de parada, o que sugere que se ele eventualmente codifica alguma proteína, esta seria um pequeno peptídeo. A falta de homologia entre a sequência desse possível peptídeo e sequências de nucleotídeos disponíveis em bancos de dados de proteínas, aliada ao fato de não ter sido encontrada no gene DD3 nenhuma sequência aberta de leitura (ORF) sugere que este pode funcionar como um ncRNA. Houve também tentativa de tradução “in vitro” do cDNA do DD3, mas não foram encontradas evidências de que são produzidas proteínas a partir desse transcrito (Bussemakers *et al.*, 1999).

Neves *et al.* (2007) (tese de doutorado), analisaram as características estruturais do gene DD3, sugerindo que o mesmo pertence à crescente família de ncRNAs. Adicionalmente, foram analisadas as frequências de quatro moléculas variantes do DD3, como também foram preditas as suas estruturas secundárias na tentativa de elucidar o seu papel na biologia do CaP. Nenhuma associação foi encontrada entre a frequência dessas moléculas e outras patologias da próstata, como a HPB. Esses mesmos autores também realizaram análises de similaridade dos transcritos do DD3 com possíveis polipeptídeos depositados em bancos de dados. Da mesma forma que outros autores, não foram encontradas similaridades com quaisquer sequências

polipetídicas já descritas, confirmando a caracterização dos transcritos do DD3 como ncRNAs.

DD3/PCA3 no diagnóstico do CaP

Diferentemente do PSA, o gene DD3 apresenta expressão específica na próstata e no CaP, não apresentando expressão em câncer de pulmão, esôfago, íleo, cólon, pâncreas, testículos, mama, bexiga e melanoma, (Kok *et al.*, 2002). É um dos genes de expressão mais tecido-específica descritos até o presente momento, sendo superexpresso na maioria das neoplasias prostáticas, incluindo metástases distantes (Verhaegh *et al.*, 2000; Hessels *et al.*, 2005). Essas características sugerem que o DD3 possui vantagens em relação ao PSA como um marcador específico do CaP.

Embora o uso do PSA em testes de rotina tenha aumentado a detecção do CaP, um dos principais inconvenientes tem sido a falta de especificidade, o que resulta em alta taxa de biópsias negativas. Conseqüentemente, uma grande população de homens com PSA cronicamente elevado e um ou mais biópsias negativas tem emergido.

O uso do DD3 para o diagnóstico do CaP através da detecção deste transcrito na urina se encontra bem estabelecido. Desta forma, têm sido desenvolvidos kits baseados na detecção do DD3 com a finalidade de facilitar a identificação desta neoplasia. Em um grande número de pacientes, Fradet *et al.* (2004) demonstraram que através do teste uPM3, kit de detecção qualitativa de mRNA de DD3 e PSA para células prostáticas em amostras de urina, pode ser utilizado juntamente a outros métodos de detecção do CaP.

Esse teste diagnóstico representa uma melhoria significativa em relação aos métodos atuais para a detecção precoce do CaP, sendo que uma característica notável é a sua especificidade de 89% em uma série de 443 pacientes (Fradet *et al.*, 2004).

Similarmente, um estudo desenvolvido por Bostwick *et al.* (2006) demonstrou que o transcrito do DD3 foi detectado pelo teste uPM3 (Figura 6) em amostras de urina de pacientes com CaP, independentemente do volume do tumor, localização, extensão e graduação. Ainda, um novo teste de

detecção do DD3 em urina (APTIMA PCA3, Gen-Probe Inc., San Diego, CA, USA) (Groskopf *et al.*, 2006; van Gils *et al.*, 2007) mostrou sensibilidade e especificidade global de 69 e 79%, respectivamente.



Figura 6 - Teste uPM3

Diagrama mostrando que um baixo nível de expressão de DD3 está presente na urina proveniente de células benignas da próstata (à esquerda). À direita, uma única célula de câncer é mostrada superexpressando o gene, permitindo a detecção de uma amostra de urina com baixo nível de expressão do DD3.

A Figura 7 ilustra o teste para o diagnóstico do DD3, que consiste na quantificação dos transcritos DD3 e PSA separadamente, e a relação entre os dois é determinada (índice de DD3). Uma vez que o DD3 é expresso pelas células da próstata normal em baixos níveis e pelas células tumorais em altos níveis, um alto índice pode ser obtido a partir de uma amostra rica apenas em células prostáticas normais. Assim, a razão entre a expressão do DD3 e do PSA reflete a expressão de DD3 corrigido para sua expressão em células epiteliais normais ou de HPB presentes na amostra.

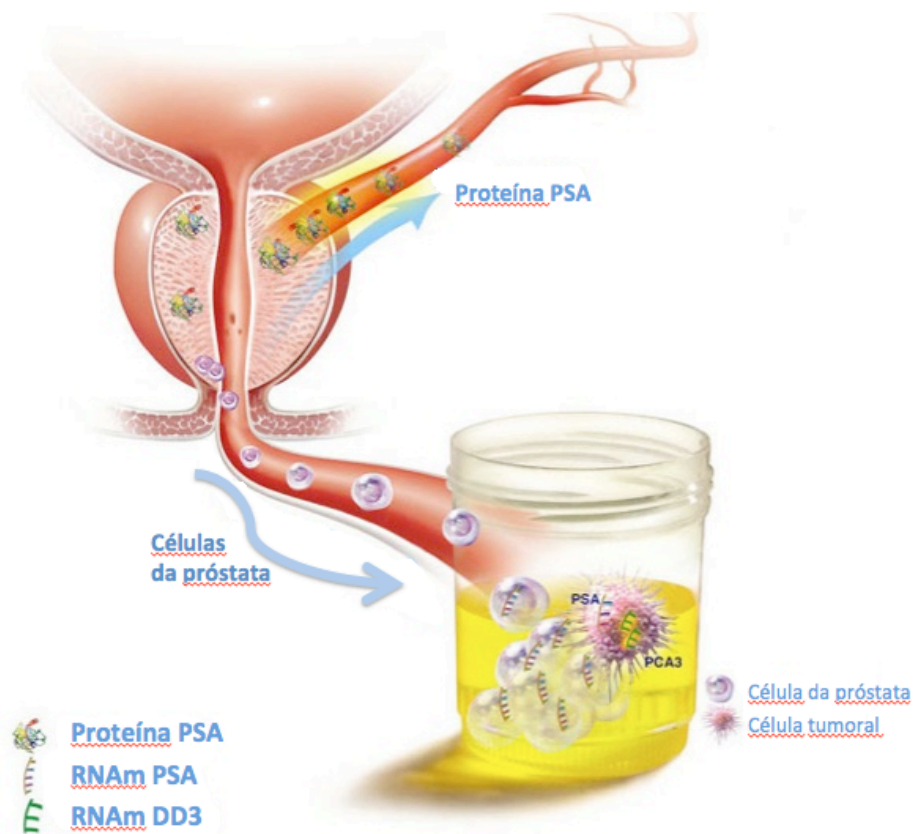


Figura 7 - Teste diagnóstico do DD3

Diagrama demonstrando DD3 na urina (seta inferior) versus PSA (seta superior). Considerando que o PSA é uma glicoproteína que pode entrar na corrente sanguínea, o DD3 é um transcrito que existe no núcleo de células epiteliais da próstata e pode ser eliminado na urina. Essas células, se tumorais, superexpressam o transcrito. Essa superexpressão, que pode ser muitas vezes encontrada em células benignas da próstata, é detectada pelo teste. A expressão do DD3 é normalizada no contexto de um material nuclear específico da próstata (mRNA do PSA), gerando um escore de DD3. A pontuação DD3 é muito mais específica do câncer do que os níveis séricos de PSA, que são confundidos por fatores como o volume da próstata, idade, traumas e certas drogas.

A detecção da expressão do DD3 também pode ser feita por ensaio quantitativo de RT-PCR coletando-se urina após massagem prostática, como mostrado no trabalho de Hessels *et al.*, 2003, ilustrado pela Figura 8.

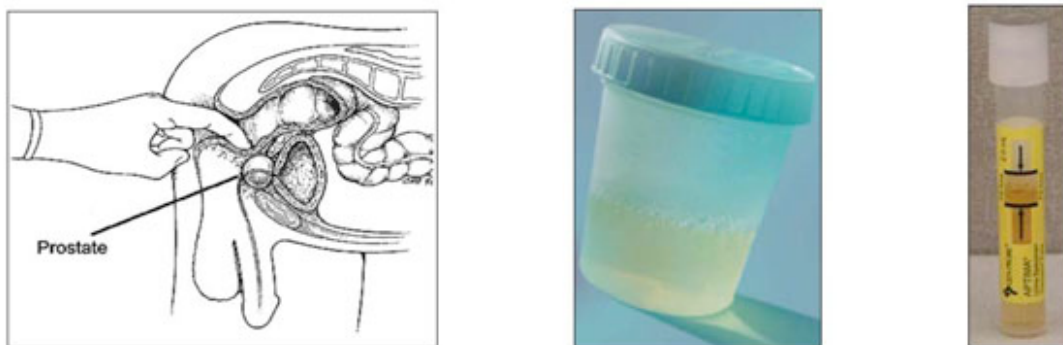


Figura 8 - Diagrama ilustrando a coleta da amostra do DD3

O procedimento começa com um exame digital retal intenso (3 varreduras em cada lado da próstata). A primeira urina é então coletada e enviada ao laboratório para análise.

Segundo Verhaegh *et al.* (2003), a expressão de transcritos poliadenilados do DD3 sugere que ele pode ter um papel funcional, apoiado por seus achados de que o DD3 é expresso no núcleo e que sua expressão não foi detectada no citoplasma. No entanto, os dados da literatura a respeito da localização desses transcritos em compartimentos celulares é contraditória. Popa *et al.* (2007), por outro lado, demonstrou que o DD3 está localizado no citoplasma de células tumorais e ausente em células do estroma.

Via do Receptor de Androgênio

Androgênios (Hormônios Sexuais) e o Receptor de Androgênio (AR)

A testosterona é o androgênio mais abundante no soro de indivíduos do sexo masculino, e o testículo é a sua principal fonte de produção. A glândula adrenal produz testosterona, porém em uma pequena quantidade, diretamente ou após a conversão periférica dos hormônios androstenediona e dehidroepiandrosterona, após ações de enzimas. No epitélio da próstata, a testosterona é convertida em androgênio que possui maior afinidade ao receptor de androgênio, a dihidrotestosterona (DHT), por meio da ação de uma enzima, 5 α -redutase (Melo *et al.*, 2005; Balk e Knudsen, 2008).

Os androgênios são sintetizados e secretados na corrente sanguínea. A testosterona e a DHT estão presentes no sangue na concentração 10 a 100 vezes acima do nível necessário para a saturação do receptor de androgênio (AR). Entretanto, aproximadamente 95% desses androgênios circulam ligados às proteínas, como a albumina ou globulina ligadora de hormônios sexuais que limitam a sua disponibilidade. Algumas células responsivas aos androgênios possuem receptores de membrana para as proteínas carreadoras de androgênio (Melo *et al.*, 2005).

Esses hormônios têm papel importante no desenvolvimento dos órgãos reprodutores masculinos, tais como o epidídimo, os vasos deferentes, a vesícula seminal, a próstata e o pênis. Além disso, os androgênios são necessários para a puberdade, a fertilidade masculina e a função sexual. Os elevados níveis de testosterona intratesticular, secretadas pelas células de Leydig, são necessários para a espermatogênese. Para exercer suas funções na espermatogênese, os androgênios são capturados por receptores específicos, os receptores de androgênio (AR) (Ghadessy *et al.*, 1999; Dohle *et al.*, 2003).

A testosterona atravessa a membrana da célula por difusão simples. Ao se incorporar nas células-alvo e antes que possa exercer sua função específica, a testosterona é metabolizada pela aromatase em estradiol do

hipotálamo, onde ocorre a determinação sexual. É metabolizada pela 5 α -redutase em DHT, na maioria dos órgãos reprodutivos masculinos (Figura 9). A DHT é cerca de 30 vezes mais potente que a testosterona devido à sua afinidade aumentada pelo AR (Lewin, 2001; Kang *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2005).

O AR corresponde a uma proteína transcricional regulatória ativada por ligante que pertence à superfamília de receptores nucleares, membros que incluem os glicocorticóides, a progesterona, o estrogênio e os receptores de ácido retinóico (Ghadessy *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2005). Geralmente são mantidos em estado inativo por inibidores e na ausência de seus ligantes (Balk & Knudsen, 2008).

Esse receptor é composto de um domínio de ativação amino-terminal, um domínio de ligação a ligante carboxi-terminal e um domínio de ligação ao DNA na região do médio que contém dois dedos de zinco. Assim como outros receptores nucleares, em estado basal, o AR se encontra ligado a proteínas de choque térmico e outras proteínas em conformações que impedem sua ligação ao DNA.

Mecanismos de ação do androgênio

A testosterona livre circulante no sangue entra nas células da próstata (Figura 9), e então aproximadamente 90% dessas moléculas são convertidas em dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase.

Em seguida, a ligação aos androgênios induz uma mudança conformacional no AR que leva à dissociação das proteínas de choque térmico e subsequente fosforilação do receptor, em parte mediado por proteínas cinase A. As mudanças conformacionais induzidas pelo ligante facilitam a formação de complexos de homodímeros, os quais se ligam aos elementos de resposta aos androgênios (AREs) nas regiões promotoras de genes-alvo (Ngan S. *et al*, 2009; Gnanapragasam V. J. *et al*, 2002; Jariwala U. *et al.*, 2007).

O complexo do AR ligado ao DNA é capaz de recrutar proteínas co-reguladoras, co-ativadoras ou co-repressoras, para seu complexo. Os co-ativadores permitem a interação do complexo de AR com o aparelho geral de transcrição para estimular ou inibir a transcrição de genes-alvo. Muitos genes-alvo do AR foram identificados, e genes adicionais estão sendo descobertos, principalmente pela utilização de tecnologia de microarranjos de DNA (Ngan *et al.*, 2009).

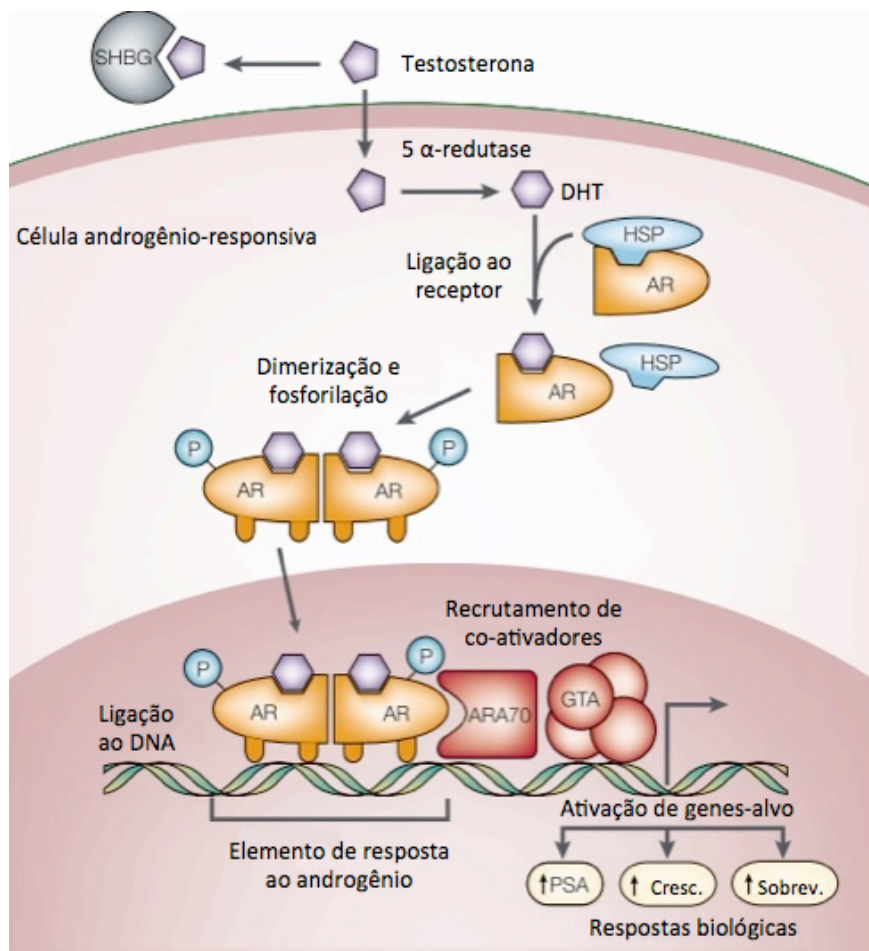


Figura 9 - Diagrama ilustrando a coleta da amostra do DD3

A testosterona circula no sangue ligada à albumina (não mostrado) e à globulina de ligação a hormônio sexual (SHBG). A testosterona livre entra nas células da próstata e é convertida em dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5α-redutase. A ligação do DHT ao receptor androgênico (AR) induz a dissociação de proteínas de choque térmico (HSPs) e subsequente fosforilação do receptor. O AR se dimeriza e pode se ligar a elementos de resposta a androgênio (ARE) nas regiões promotoras de genes-alvo. Co-ativadores (tais como ARA 70) e co-repressores (não mostrados) também se ligam a complexos AR, facilitando ou impedindo, respectivamente, a sua interação com o aparelho geral de transcrição (GTA). Ativação (ou repressão) dos genes alvo leva às respostas biológicas, incluindo o crescimento, sobrevivência e produção de antígeno prostático específico (PSA). (Modificado de Feldman & Feldman, 2001).

Câncer de Próstata Independente de Androgênio (AIPC)

Para o tratamento inicial do CaP, geralmente é indicado a prostatectomia ou a radioterapia para remoção ou destruição das células tumorais que ainda estão confinadas na cápsula prostática. No entanto, muitos pacientes não são curados por essa terapia, e o tumor persiste, ou então eles são diagnosticados após o tumor ter metastatizado.

A progressão do CaP depende do equilíbrio entre células em proliferação e células em processo de morte, sendo que os androgênios são os principais reguladores do estímulo de proliferação e de inibição de apoptose. Assim, o CaP depende de um nível crucial de estímulo androgênico para seu crescimento e sobrevivência. Conseqüentemente, a ablação de androgênio é capaz de promover a regressão do câncer, pois sem esses hormônios, a taxa de proliferação celular é menor e a taxa de morte celular é aumentada, levando à extinção destas células.

Nesse sentido, a ablação androgênica consiste na principal terapia para o CaP, capaz de promover a regressão de tumores andrógeno-dependentes, conforme documentado pelo trabalho de Huggins há mais de 30 anos (Richter *et al.*, 2007). No entanto, muitos pacientes eventualmente falham à aplicação dessa terapia e vêm à óbito por desenvolver o CaP independente de androgênio (AIPC). AIPC é uma forma letal de CaP, que progride e metastatiza. Todavia, no momento não há terapia efetiva para ele (Shaw *et al.*, 2008; Yuko Aoki *et al.*, 2010; Curtin *et al.*, 2007).

Existem várias vias pelas quais o AIPC pode se desenvolver. Estas vias podem fornecer indícios sobre os mecanismos de ação dos androgênios e dos processos pelo quais as células tumorais escapam do controle de crescimento normal e burlam os tratamentos contra o câncer. Entender as vias que levam a AIPC é o primeiro passo para o desenvolvimento de terapias para esta forma letal de CaP.

Estas vias apresentam-se resumidas na Figura 10 e correspondem: a) à via de hipersensibilidade, que apresenta dependência do ligante de androgênio e do receptor, havendo uma amplificação ou aumento da sensibilidade do receptor, e/ou um aumento nos níveis de DHT; b) à via promíscua, em que o

AR pode ser estimulado por pseudo-androgênios, por antagonistas e por corticoesteróides, dependente de AR mutante em células LNCaP ou então células responsivas à cortisona e cortisol; c) à via alternativa, que é independente de androgênio, mas há dependência do receptor de androgênio, sendo que receptores tirosina cinase (RTKs) são ativados e o AR é fosforilado tanto pela AKT (proteína cinase B) ou via proteína cinase mitógeno-ativada (MAPK); d) à via de escape, que é independente tanto de androgênio quanto de AR, em que os genes-alvo de resposta ao AR são ativados via mitocondrial por proteínas anti-apoptóticas como a BCL2; e) à via de células tronco, também independente de ligante e de AR, em que células-tronco epiteliais da próstata (já inicialmente independentes de androgênio) dão origem ao tumor (Feldman & Feldman, 2001).

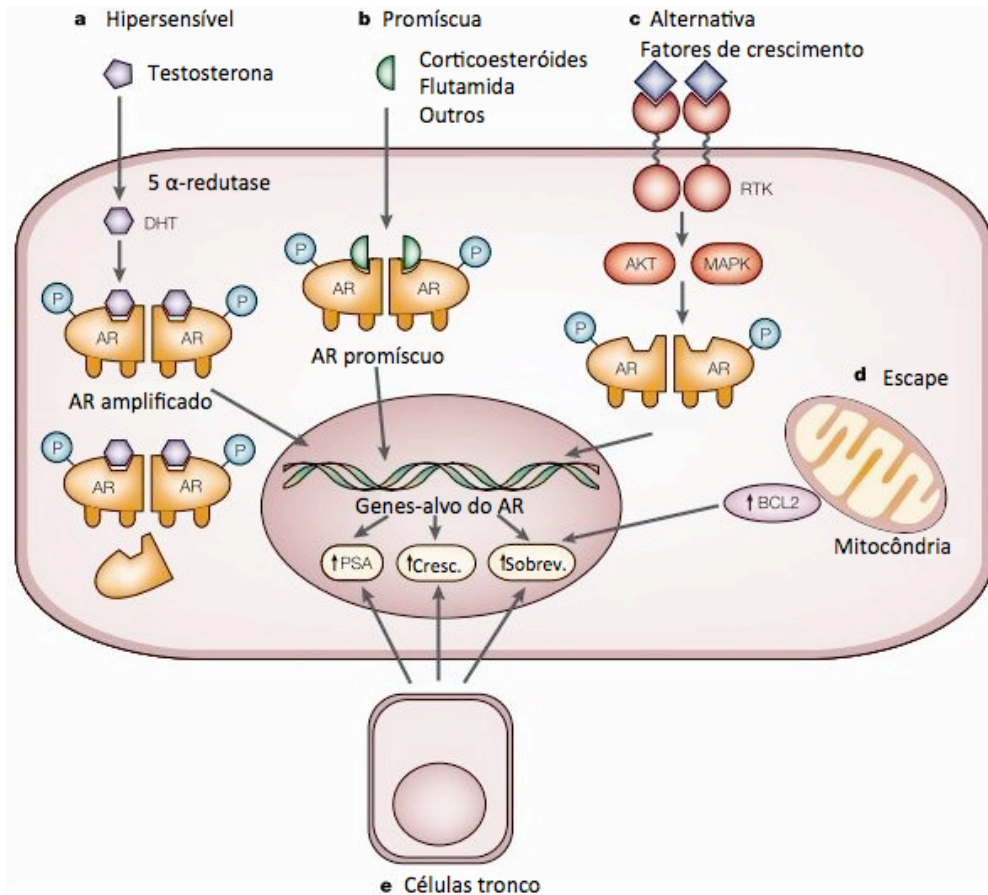


Figura 10 - Cinco vias possíveis para a independência de androgênio

a) Na via da hipersensibilidade, mais receptor de androgênio (AR) é produzido (geralmente por amplificação gênica), ou o AR tem a sensibilidade aumentada (não mostrado) para compensar os baixos níveis de androgênios, ou ainda mais testosterona é convertida para o androgênio mais potente, a dihidrotestosterona (DHT), pela 5α-redutase. b) Na via promíscua, a especificidade do AR é ampliada para que ele possa ser ativado por moléculas não-androgênicas normalmente presentes na circulação. c) Na via alternativa, receptores tirosina cinase (RTKs) são ativados, e o AR é fosforilado tanto pela AKT (proteína cinase B) ou via proteína cinase mitógeno-ativada (MAPK), produzindo um ligante independente de AR. d) Na via de escape, vias de sobrevivência paralelas, como a que envolve a BCL2 (proteínas anti-apoptóticas), evitaria a necessidade de AR ou de seu ligante. Finalmente, e) na via de células tronco, as células tumorais andrógeno-independentes, que estão presentes na próstata - possivelmente células-tronco epiteliais - podem ser selecionadas para a terapêutica. (Modificado de Feldman & Feldman, 2001).

Sabe-se que esses cinco mecanismos não esgotam as possibilidades pelas quais as células transformadas adquirem meios de se estabelecerem e burlar os tratamentos anti-androgênicos e, sem dúvida, novos estudos revelam outras perspectivas (Schroder, 2008; Prowse *et al.*, 2008). Também é possível e provável que um tumor seja capaz de utilizar vários desses mecanismos inicialmente ou de várias etapas progressivas para desenvolver o CaP andrógeno-independente. Ao utilizar várias dessas vias para subverter o

crescimento celular normal, a terapia bem sucedida requer uma abordagem individualizada baseada no tipo presente de AIPC.

Com base nessas informações, torna-se necessário investigar outros mecanismos envolvidos no desenvolvimento do CaP refratário, como por exemplo avaliar o papel de possíveis genes relacionados à ativação dessas vias, investigando os processos pelos quais a proliferação e a morte de células tumorais de próstata é controlada pela via do AR. A compreensão da atuação de genes nessas vias tem especial importância com relação ao CaP metastático refratário ao tratamento anti-androgênio, de tal modo que a alteração da expressão desses genes poderia constituir-se em uma estratégia alternativa de burlar os mecanismos de resistência aos tratamentos anti-androgênicos.

OBJETIVOS

Conforme acima apresentado, o atual conhecimento a respeito do transcrito não codificante DD3 demonstra sua aplicabilidade como importante biomarcador do CaP. No entanto, nada até o presente momento é conhecido a respeito de sua função na biologia do CaP e sobre a regulação de sua expressão, assim como a respeito das vias sobre as quais este transcrito atua. Dentro desse contexto, o presente trabalho apresenta os seguintes objetivos:

Objetivo geral

Caracterizar o possível papel funcional do ncRNA DD3 no câncer de próstata, seu perfil de expressão e seu envolvimento na via do receptor de androgênio.

Objetivos específicos

- I. Avaliar o possível papel funcional do transcrito DD3 no CaP através da utilização de ensaios de alteração de sua expressão em células LNCaP;
- II. Avaliar o envolvimento do DD3 na via do receptor de androgênio;
- III. Caracterizar as frações celulares em que o DD3 é expresso.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo das Linhagens celulares

As linhagens celulares tumorais de próstata utilizadas neste estudo foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e as linhagens normais de próstata foram gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa do Dr. Carlos Moreno (Emory University EUA). Foram utilizadas as linhagens LNCaP (proveniente de metastase de linfonodo), DU145 (carcinoma prostático), PC3 (adenocarcinoma de próstata), RWPE-1 (normal de próstata) e PrEC (primária de próstata). As linhagens LNCaP e PC3 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100U/ml de penicilina e 100ug/ml de estreptomicina. A linhagem RWPE-1 foi cultivada em meio Keratinocyte-Serum-Free (KSF) (Gibco) suplementado com EGF e BPE e 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 100U/ml de penicilina e 100ug/ml de estreptomicina. A linhagem PrEC foi cultivada em meio PrEGMTM Prostate Epithelial Cell Growth Medium for PrEC. A linhagem DU145 foi cultivada em meio DMEM (Gibco) com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 100U/ml de penicilina e 100ug/ml de estreptomicina. As células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂.

Extração de RNA Total

O RNA total das linhagens celulares de próstata, das amostras de células LNCaP e PC3 tratadas com os RNAs de interferência e com os androgênios e anti-androgênios, foi extraído utilizando-se Kit de extração de RNA Total RNeasy (Qiagen).

O protocolo de extração consiste em lise celular adicionando 350 µL de tampão RLT (Kit RNeasy) e homogeneização com a pipeta. Em seguida foi adicionado nas amostras 350 µL de etanol 70% seguido de homogeneização das mesmas. As amostras foram então transferidas para as colunas de

purificação e centrifugadas por 30 segundos a 8.000 g. Foi adicionado 700 µL de tampão RW1 nas colunas e centrifugadas por 15 segundos a 8.000 g para lavagem. Em seguida foi adicionado 500 µL de tampão RPE às colunas e elas foram centrifugadas por 15 segundos a 8.000 g para lavagem. Adicionou-se na sequência 500 µL de tampão RPE na coluna para a última lavagem e finalmente as colunas foram transferidas para tubos “eppendorf”. Para eluição dos RNAs acrescentou-se 30 microlitros de água “RNase-free” e os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 8.000 g. As amostras foram mantidas em ultrafreezer -80°C para conservação dos RNAs.

Em seguida, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 V3.2 (nanodrop Technologies, Inc-USA) a 260 nm.

Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1,0 µg de cada amostra de RNA total, segundo protocolo do kit “Superscript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen). As amostras foram tratadas com DNaseI (Invitrogen) para degradação de DNA genômico contaminante na preparação de RNA.

RT-PCR e PCR em Tempo Real

Para analisar a expressão qualitativa do gene DD3 nas linhagens celulares foi utilizado ensaio de RT-PCR utilizando-se tampão Taq 1X (Amersham), 1U de Taq polimerase, 200 µM final de dNTPs, 0,5 µM dos oligonucleotídeos senso e anti-senso (DD3, Tabela 1) e 5 µl de cDNA para um volume final de 20 µL.

As condições de amplificação do transcrito DD3 são: desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. O tamanho para o produto da PCR é de 277 pb para DD3 com “splicing” alternativo do exon 2. Os primers para amplificação do DD3 estão localizados no início do exon 1 (posição 69) e início do exon 4 (posição 491). O 18S foi o gene constitutivo utilizado como controle, gerando um produto de

PCR de tamanho de 151 pb. A sequência dos primers do 18S se encontram na Tabela 1.

Para quantificar a expressão do mRNA do DD3 foi utilizado ensaio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), através do sistema SYBR Green (SYBRTM Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos utilizados são os mesmos da RT-PCR não quantitativo. A mistura da reação da PCR (20 µL) contém 10 µL de SYBR Green, 5 µL de cDNA (sintetizado a partir de 1 µg de RNA total). O programa utilizado para ciclagem consiste de uma incubação inicial a 50°C por 2 minutos, seguidos de uma incubação a 94°C por 5 minutos, uma incubação a 94°C por 30 segundos e uma incubação a 55°C por 30 segundos. A temperatura então decresce 0,5°C por ciclo (“touchdown”). O programa volta ao terceiro passo por 9 vezes. Em seguida as amostras são incubadas 30 vezes a 72°C por 1,5 minutos, 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e uma parada a 72°C por 1 minuto e meio para a leitura de fluorescência das amostras. As amostras são então incubadas a 72°C por 15 minutos (extensão final). O aparelho utilizado para o qRT-PCR foi o CFX96 Real Time System (BIORAD) C1000 Thermal Cycler e todas as amostras foram analisadas em duplicatas ou triplicatas. Após o programa de ciclagem era realizada uma curva de dissociação para verificar se que o produto amplificado corresponde ao produto específico de interesse. Essa curva consiste de um aumento de temperatura que vai de 60°C a 90°C, com leituras efetuadas a cada 0,2°C. Para padronização das condições do PCR em tempo real foi realizada uma diluição seriada do cDNA das amostras (1:1 a 1:32 µL) de forma a avaliar a equivalência de eficiência de amplificação do DD3 e do gene constitutivo 18S. Valores de R² de 0,92 e 0,96 foram obtidos, respectivamente para amplificação dos genes DD3 e 18S, indicando semelhança na eficiência de amplificação.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos para amplificação de genes responsivos ao AR e DD3

Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR e PCR quantitativo em tempo real para amplificar os RNAm dos genes DD3, 18S, GAPDH, TMPRSS2, NDRG1, GREB1, PSA, AR, FGF8, CdK1, CdK2 e PMEPA1.

<i>Gene</i>	<i>Primer 5'-3' (senso)</i>	<i>Primer 5'-3' (anti-senso)</i>
DD3	AGATTTGTGTGGCTGCAGC	TCCTGCCCATCCTTTAAGG
18S	AACCCGTTGAACCCCAT	CGCTACTACCGATTGGATGG
GAPDH	TGACCCCTTCATTGACCTCA	AGTCCTTCCACGATACCAA
TMPRSS2	CTGGTGGCTGATAGGGGATA	GGACAAGGGGTTAGGGAGAG
NDRG1	CGAGACTTTACATGGCTCTG	GCATTGATGAACAGGTGCAG
GREB1	AAGGAGGGCTGGAAACAAAT	CATTGTGGCCATTGTCATCT
PSA	TGCATCAGGAACAAAAGCGTGA	CCTGAGGCGTAGCAGGTGGTCCCCAG
AR	CCACTCGTCTCACGGGATAG	GAAGACCTTGCAGCTTCCAC
FGF8	CAACTCTACAGCCGCACCAGC	TGCTCTGGCGATCAGCTTC
CdK1	AAGTGAAGAGGAAGGGGTTC	CCAAAAGCTCTGGCAAGGCC
CdK2	TTCTGCCATTCTCATCGG	ATGGGTGTAAGTACGAACAGG
PMEPA1	CATGATCCCCGAGCTGCT	TGATCTGAACAAACTCCAGCTCC

Ensaio de Silenciamento Gênico por Interferência de RNA

Foram desenhados, segundo algoritmos do software da empresa IDT Technologies, três RNAs de interferência (siRNAs) específicos para o gene DD3 (siDD3-1, siDD3-2 e siDD3-3), um siRNA de controle endógeno (GAPDH) e um controle negativo que apresenta uma sequência inespecífica com o mesmo conteúdo “CG” do RNA de interferência específico para a sequência do siDD3-2 (“scramble”). Esse oligonucleotídeo “scramble” foi desenhado através

do site siRNA Wizard v3.1 (www.siRNAwizard.com) e sintetizado pela empresa Prodimol Biotecnologia.

Os três siRNAs específicos projetados para o DD3 são sequências que apresentam homologia com sequências localizadas no éxon 4 do RNA mensageiro deste gene como mostra a Figura 11, região comum às três possíveis isoformas de mRNA do DD3.

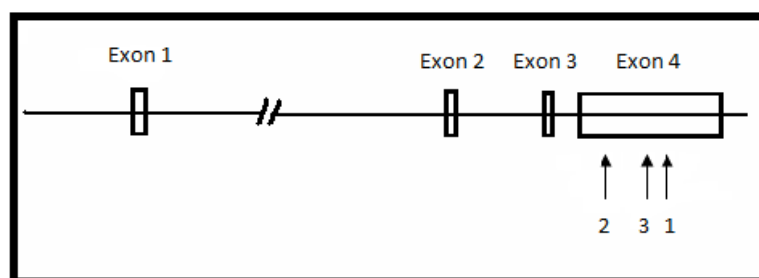


Figura 11 - Localização dos RNAs de interferência para do DD3

Localização dos três RNAs de interferência desenhados para silenciamento do transcrito DD3. Os RNAs 1, 2 e 3 anelam na região do exon 4, que corresponde a uma região comum dos possíveis transcritos provenientes do gene DD3.

Padronização das condições de transfecção dos siRNAs em células LNCaP

Para estabelecer as condições ideais de transfecção de células LNCaP com os siRNAs específicos para o DD3, as mesmas foram testadas com diferentes volumes de reagente de transfecção (Figura 12). Foram testados volumes de 2 μ L, 4 μ L e 6 μ L de reagente de transfecção. O volume de 4 μ L apresentou eficiência de 86% de transfecção tendo sido estabelecido como o volume a ser utilizado em todos os demais ensaios, pois apresenta quantidade intermediária de reagente e boa eficiência de transfecção.

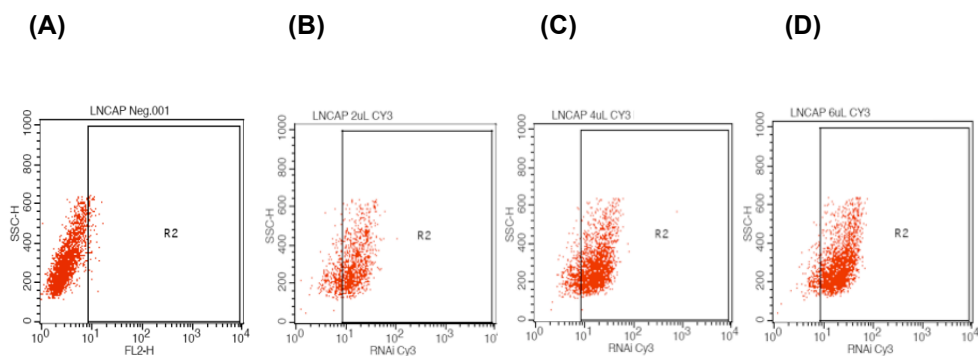


Figura 12 - Análise por FACS da eficiência de transfecção com siRNA Cy3 em células LNCaP transfectadas com diferentes volumes de reagentes de transfecção

Análise por FACS da eficiência de transfecção com siRNA Cy3 em células LNCaP transfectadas com diferentes volumes de reagentes de transfecção. A: controle negativo (células que não foram transfectadas com Cy3); B: células LNCaP transfectadas com 2 µL de Lipofectamina (eficiência de transfecção de 78,81%); C: células LNCaP transfectadas com 4 µL de Lipofectamina (86,34% de eficiência) e D: LNCaP transfectadas com 6 µL de Lipofectamina (eficiência de 92,06%). (Eixo x: Detecção de fluorescência do siRNA. Eixo y: complexidade da partícula).

Padronização dos ensaios de inibição de expressão por interferência de RNA.

A Figura 13 representa a análise de PCR quantitativo em tempo real de um experimento de silenciamento realizado com o RNA de interferência do gene constitutivo GAPDH. Observa-se que após 24 e 36 horas de incubação das células LNCaP com o siGAPDH, houve diminuição da expressão de seu transcrito de 86,2% e 90,5%, respectivamente, em relação às células que foram tratadas com o controle negativo de RNA de interferência "scramble". Essa análise mostrou que as condições experimentais e que a maquinaria celular envolvida em silenciamento de genes através do mecanismo de interferência na linhagem LNCaP estabelecidas nestes ensaios eram adequadas para a realização dos experimentos de RNA de interferência com o gene DD3.

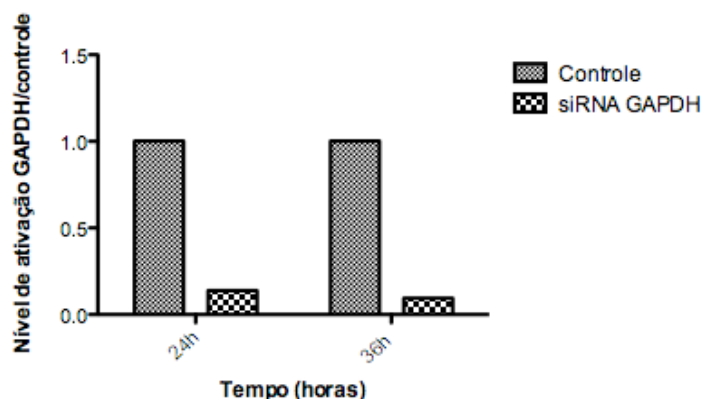


Figura 13 - Ensaio de Interferência do GAPDH

Análise dos dados de qRT-PCR do ensaio de interferência utilizando o siGAPDH a 30 nM por 24 e 36 horas em células LNCaP. Como controle negativo foi utilizado um RNA de interferência "scramble".

Transfecção dos siRNAs específicos para o DD3 em células LNCaP e PC3

As células LNCaP foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 6 poços, com meio RPMI sem antibióticos, com 10% de soro fetal bovino. 24 horas após o plaqueamento, o meio das células foi substituído por meio RPMI sem antibiótico e sem soro fetal bovino. Os siDD3-1, siDD3-2, siDD3-3, siRNA GAPDH, siRNA controle negativo e siRNA "scramble" foram diluídos em 100 μ L de meio de transfecção OPTI-MEM na concentração de 60 nM por poço e 4 μ L do reagente de transfecção Lipofectamina foi diluído em 100 μ L do meio OPTI-MEM por poço. Em seguida combinou-se as diluições de siRNAs e Lipofectamina e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos para permitir a formação dos complexos Lipofectamina + siRNA. Em seguida as células foram incubadas com os amostras de siRNA, somente com o reagente de transfecção Lipofectamina 2000 (Invitrogen) ou com o controle negativo "scramble". O volume final no poço das placas era de 2,0 mL.

As células foram mantidas em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24, 36 e 48 horas. O meio das placas foi substituído por meio RPMI 10% SFB após 8 horas do início do tratamento. Após os tempos de 24, 36 e 48 horas as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos

e em seguida foram estocadas no freezer a -20°C para futura extração de RNA.

Ensaio de ativação dos genes DD3 e genes responsivos ao Receptor de Androgênio (AR) com androgênio (DHT) e anti-androgênio (Flutamida)

As células LNCaP foram cultivadas em placas de seis poços na densidade de $2,0 \times 10^5$ células por poço com RPMI 1640 com 10% de CCS (Charcoal Stripped FBS One Shot) GIBCO – Invitrogen três dias antes do início do experimento para remover hormônios esteróides do meio de cultura. Para verificar o estímulo do receptor de androgênio nessas células, elas foram tratadas com $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de androgênio Dihidrotestosterona (DHT), $5 \times 10^{-6}\text{M}$ de anti-androgênio Flutamida e como controle as células foram tratadas somente com etanol, reagente de dissolução do DHT e Flutamida. Após 12, 24, 36 e 48 horas as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e armazenadas em freezer a -20°C para futura extração de RNA.

Ensaio de proliferação com cristal violeta

As células foram plaqueadas em placas de 24 poços com 5×10^4 células por poço e cultivadas em 5% de CO_2 à 37°C por 24, 36, 48, 60 e 96 horas. Em cada tempo experimental avaliado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas por 10 minutos com glutaraldeído 1% em PBS por 15 minutos. As células foram então lavadas com H_2O destilada e coradas com cristal violeta 0,1%, seguindo-se duas lavagens de 10 minutos com H_2O destilada para retirada do excesso de corante. As células coradas foram solubilizadas em 0,2% de Triton X-100 e 100 μL da suspensão de células foram lidos em 550nm no espectrofotômetro SpectraMax 90 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A densidade ótica obtida neste comprimento de onda é proporcional ao número de células aderidas.

Ensaio de viabilidade celular com Azul de Tripán

As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa as células foram ressuspensas em 10 mL de PBS 1x e uma alíquota de 10 µL foram coradas com azul de tripan 0,4%. As células foram colocadas na câmara de “Neubauer” e observadas no microscópio óptico. As células viáveis foram contadas e sua porcentagem foi avaliada com os seguintes cálculos: concentração de células viáveis (**Cv**) presentes na suspensão celular $C = nv \times 10^4 \times 2$, sendo que - **C** (concentração) é o número de células existentes em 1 mililitro de suspensão celular, e **nv** é a média do número de células viáveis observado por campo da câmara de contagem.

Ensaio de avaliação de núcleos picnóticos de células LNCaP por marcação com DAPI

As células que foram tratadas com os siRNAs específicos para o transcrito DD3 e as células controle do experimento de interferência foram coradas com o reagente 2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI) após 24, 36 e 48 horas de tratamento para avaliação do perfil morfológico nuclear dessas células. As células foram tripsinizadas nos tempos mencionados acima e fixadas com paraformaldeído 4%. Em seguida as amostras celulares foram lavadas com PBS 3X para retirada do paraformaldeído e submetidas ao corante DAPI (5µg/mL) por 10 minutos. Foram então montadas lâminas de cada amostra, e analisadas individualmente no microscópio de fluorescência no comprimento de ABS: 348nm. Foram contados campos das lâminas com aproximadamente 200 células de cada amostra em microscópio de fluorescência em aumento de 100x, e calculado em seguida a proporção de células com perfil nuclear picnótico em relação às células com perfil nuclear não-picnótico.

Fracionamento de células LNCaP

As células LNCaP foram cultivadas em garrafas de cultura celular até atingirem aproximadamente 90% de confluência. Em seguida o meio de cultura foi removido e descartado e as células foram lavadas com PBS 1x. Colocou-se sobre as células nitrogênio líquido para permitir a lise celular.

Foi adicionado 1,5 mL de tampão sacarose dentro da garrafa e as células foram raspadas com bastão de remoção celular. Todos os procedimentos foram realizados com as garrafas no gelo.

O tampão foi coletado com as células e dispensado em tubo eppendorf (mantido no gelo). Em seguida foram realizadas as centrifugações: 300 g por 5 minutos (o sobrenadante foi coletado e dispensado em tubo eppendorf); 1000 g por 10 minutos (o sobrenadante foi coletado e dispensado em tubo eppendorf); 8000 g por 10 minutos (o sobrenadante foi coletado e dispensado tubo eppendorf); 20000 g por 3 horas (retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi preservado para posterior extração de RNA e síntese de cDNA como indicam os protocolos acima citados).

A fração coletada após a centrifugação de 300 g corresponde à fração celular contendo núcleos, corpos densos e vesículas; a fração coletada após centrifugação de 1000 g corresponde à fração que contém mitocôndrias; a fração coletada após a centrifugação de 8000 g à fração composta por vesículas e ribossomos e finalmente, a última fração coletada após centrifugação de 20000 g corresponde ao citoplasma.

Amplificação de fragmento completo do transcrito DD3

Com o objetivo de amplificar o transcrito completo do gene DD3, um fragmento de 2.553 pb, compreendido entre os exons 1 e 4b, foram utilizadas amostras de cDNA sintetizadas a partir de RNAs previamente extraídos de amostras de tecidos de tumores de próstata.

Para a amplificação, foram utilizadas algumas enzimas específicas para amplificação de fragmentos grandes, como "Elongase® Enzyme Mix", Enzima "Pfx50 DNA Polymerase", "Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity" e

também o Kit (Race) "Rapid Amplification of cDNA Ends" específico para amplificação de sequências completas de transcritos de RNA.

Foram desenhados e sintetizados uma série de oligonucleotídeos internos para a amplificação do transcrito DD3. Os oligonucleotídeos estão listados na Tabela 2, e as diferentes combinações bem como os tamanhos dos fragmentos a serem obtidos estão demonstrados na Tabela 3.

As condições de amplificação foram as recomendadas segundo protocolo dos fabricantes de cada enzima específica acima utilizada. As temperaturas de anelamento variaram de 55°C a 68°C de acordo com a recomendação do protocolo do fabricante da enzima.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos para transcrito DD3

Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR para amplificar os fragmentos dos transcritos do genes DD3.

<i>Primer 5'-3' (senso)</i>		<i>Primer 5'-3' (anti-senso)</i>	
N1	AGATTTGTGTGGCTGCAGC	N2	TCCTGCCCATCCTTTAAGG
B/F	AAAGGATCCACAGAAGAAATAGCAAGTGCCGA	B/R	AAAGGATCCGAGGGACAGAAGTTCAGAGACAT
1F	TTCAAAGACCCTTCGTGTTGCTGC	1R	ATCTTGAGATGCTTCCCAGCCTGT
2F	ATAGGGCACTCTTGTGAGCCACTT	2R	AAGAGAGAGAGGCACACTTTGGCA
3F	GCAGCTGGAAATGGACAACCACAA	3R	TTGTGGTTGTCCATTTCCAGCTGC
F1	GCCTGGTCCCGCTTGTGAGG		
F2	CACGGGGCAGAGGGTCAGGA	R2	TCCTGACCCTCTGCCCCGTG
F3	ACAGCCACAGCCTCTCCCA	R3	TGGGAGAGGCTGTGGCTGT
F4	ATGGGGCACGTTTGTAAAGCCTGGG	R4	CCCAGGCTTACAAACGTGCCCAT

Tabela 3 - Combinações de oligonucleotídeos para DD3

Combinações dos oligonucleotídeos para amplificação dos fragmentos do transcrito DD3 e seus respectivos tamanhos de fragmentos

Combinação de oligos	Tamanho fragmento	Combinação de oligos	Tamanho fragmento	Combinação de oligos fragmento	Tamanho	Combinação de oligos	Tamanho fragmento
B/F – N2	→ 346 pb	N1 – R4	→ 1707 pb	F2 – R3	→ 678 pb	F3 – 2R	→ 710 pb
B/F – R2	→ 735 pb	N1 – 2R	→ 2075 pb	F2 – R4	→ 1001 pb	F3 – 3R	→ 880 pb
B/F – 1R	→ 1105 pb	N1 – 3R	→ 2245 pb	F2 – 2R	→ 1369 pb	F3 – B/R	→ 1120 pb
B/F – R3	→ 1393 pb	N1 – B/R	→ 2465 pb	F2 – 3R	→ 1539 pb	F4 – 2R	→ 390 pb
B/F – R4	→ 1715 pb	F1 – R2	→ 275 pb	F2 – B/R	→ 1779 pb	F4 – 3R	→ 563 pb
B/F – 2R	→ 2143 pb	F1 – 1R	→ 561 pb	1F – 1R	→ 100 pb	F4 – B/R	→ 803 pb
B/F – 3R	→ 2313 pb	F1 – R3	→ 908 pb	1F – R3	→ 452 pb	2F – 2R	→ 140 pb
B/F – B/R	→ 2553 pb	F1 – R4	→ 1231 pb	1F – R4	→ 774 pb	2F – 3R	→ 310 pb
N1 – N2	→ 277 pb	F1 – 2R	→ 1599 pb	1F – 2R	→ 1142 pb	2F – B/R	→ 550 pb
N1 – R2	→ 561 pb	F1 – 3R	→ 1769 pb	1F – 3R	→ 1312 pb	3F – B/R	→ 260 pb
N1 – 1R	→ 1037 pb	F1 – B/R	→ 2009 pb	1F – B/R	→ 1552 pb		
N1 – R3	→ 1384 pb	F2 – 1R	→ 331 pb	F3 – R4	→ 340 pb		

Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como médias. Nós realizamos comparações entre os grupos de células tratadas com o grupo de células controle, utilizando o teste t Student. Os valores de *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

1. O transcrito DD3 é superexpresso na linhagem tumoral de próstata LNCaP

Para caracterizar o perfil de expressão do transcrito DD3 em linhagens celulares tumorais (LNCaP, PC3 e DU145) e em linhagens não tumorais de próstata (RWPE-1 e PrEC), foram realizados experimentos de PCR em tempo real. A análise dos níveis de expressão do DD3 mostrou que esse transcrito apresenta-se aproximadamente 98% mais expresso na linhagem tumoral LNCaP em relação às linhagens DU145, RWPE-1 e PrEC e 82% mais expresso em relação à linhagem PC3 (Figura 14A). Diante deste perfil de expressão, a linhagem LNCaP foi escolhida como modelo para os futuros experimentos de interferência, sendo aquela que apresenta maior nível de expressão desse transcrito.

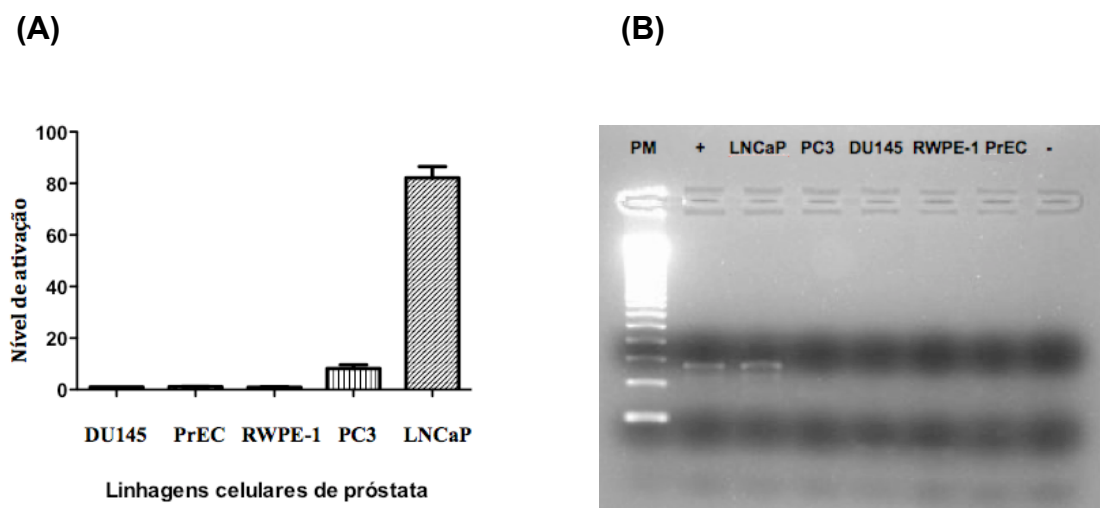


Figura 14 - Perfil de expressão do DD3 em linhagens celulares de próstata

A) Análise por qRT-PCR dos níveis de expressão do DD3 em linhagens celulares de próstata: DU145, PC3, RWPE-1, PrEC e LNCaP. B) Perfil dos produtos de amplificação do DD3 por qRT-PCR apresentados em gel de agarose 2,0%, confirmando a amplificação de um produto único e específico de 277 pb correspondente ao fragmento do DD3 na linhagem LNCaP. Como controle positivo foi utilizada uma amostra tumoral de próstata para amplificação do DD3.

2. Inibição da expressão do transcrito DD3 mediada por siRNA específico em células LNCaP

Com o objetivo de se obter uma primeira perspectiva sobre um possível papel do transcrito DD3 na carcinogênese prostática, o efeito da diminuição da expressão do DD3 através de siRNA foi investigado na linhagem celular LNCaP por qRT-PCR. Para tanto, células LNCaP foram tratadas durante 36 horas com 3 diferentes oligonucleotídeos siRNA (DD3 siRNA 1, DD3 siRNA 2 e DD3 siRNA 3), individualmente e em combinação. Um siRNA controle negativo ("scramble" DD3) foi incluído nesse experimento, a fim de monitorar a especificidade e a eficiência do silenciamento do DD3. Além disso, um siRNA para o gene constitutivo GAPDH foi utilizado como controle positivo para a otimização do processo de transfecção (materiais e métodos). Os transcritos de duas réplicas biológicas desses experimentos foram submetidos a RT-PCR quantitativo para a quantificação de DD3 silenciado (Figura 15). As eficiências da diminuição da expressão foram de 31,5% para siRNA DD3 1, e de 75% para o siRNA DD3 2, em 36 horas de tratamento em células LNCaP. Em contrapartida, o silenciamento do DD3 não foi eficiente o suficiente para reduzir a expressão do DD3 nas células LNCaP tratadas com siRNA DD3 3, assim como para os siRNAs do DD3 combinados ("pool" de siRNAs), em comparação com o controle negativo "scramble". Com base na maior eficiência de interferência do transcrito DD3 com o siRNA DD3 2, este RNA de interferência foi selecionado para todos os experimentos de avaliação funcional do transcrito DD3 por interferência de RNA.

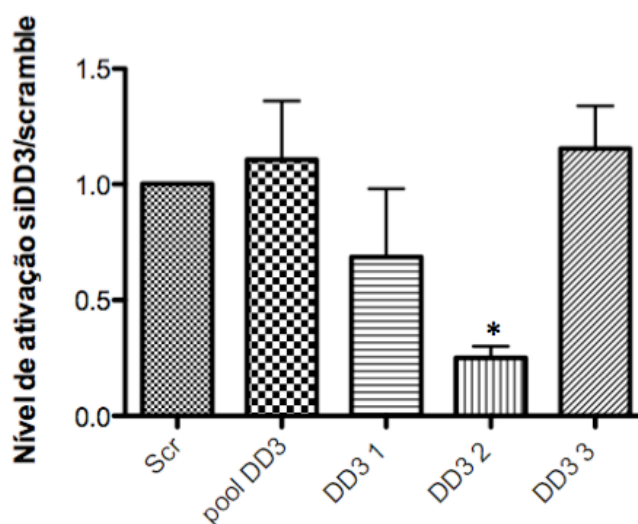


Figura 15 - Eficiência da redução da expressão do DD3 por siRNA em células LNCaP

As células foram tratadas com 60 nM de três diferentes oligonucleotídeos siRNAs (individualmente e em combinação - "pool siRNAs") e um siRNA controle "scramble" durante 36 horas. Os níveis da expressão do transcrito DD3 a partir de 2 repetições de experimentos foram monitoradas por RT-PCR quantitativo, revelando a eficiência de silenciamento em relação ao controle negativo (* $p < 0,05$).

3. O transcrito DD3 parece estar envolvido na sobrevivência de células tumorais de próstata

Ao longo do tratamento das células LNCaP com os RNAs de interferência específicos para o DD3, observamos um aumento do número de células inviáveis nos diferentes tempos de incubação. Sendo assim, para avaliar os efeitos do silenciamento desse transcrito na sobrevivência de células de CaP, nós tratamos as células LNCaP com 60 nM do siRNA DD3-2 e do controle negativo, durante 96 horas. A Figura 16A demonstra a análise da expressão do transcrito DD3 neste ensaio por qRT-PCR, apresentando uma eficiência máxima de inibição de expressão de 87% (***) $p = 0,0008$ em células tratadas com o siRNA DD3-2 no tempo de 36 horas, quando comparada com as células tratadas com o controle negativo. Para determinar se a redução da expressão do transcrito DD3 altera a sobrevivência das células LNCaP *in vitro*, as taxas de proliferação das células LNCaP após a interferência do foram avaliadas pelos métodos de cristal violeta e contagem de células viáveis por coloração com azul de tripan. O siRNA DD3-2 reduziu significativamente a proliferação *in vitro* de células LNCaP em 52% ($P < 0.01$) após 48 horas de tratamento, quando comparado com o controle negativo siRNA "scramble" (Figura 16B). Na análise

da contagem de células viáveis por coloração com azul de tripan, as células LNCaP tratadas com siRNA DD3-2 apresentaram uma redução no número de células viáveis de 80% e de 76% em 48 e 60 horas após tratamento, respectivamente, comparado ao controle siRNA "scramble" (Figura 16C).

Esses resultados indicam que uma vez que o transcrito DD3 tem seu nível de expressão reduzido, as células LNCaP apresentam uma significativa redução em sua viabilidade e proliferação celular, sugerindo que este transcrito pode estar envolvido em vias de sobrevivência nessa célula tumoral de próstata.

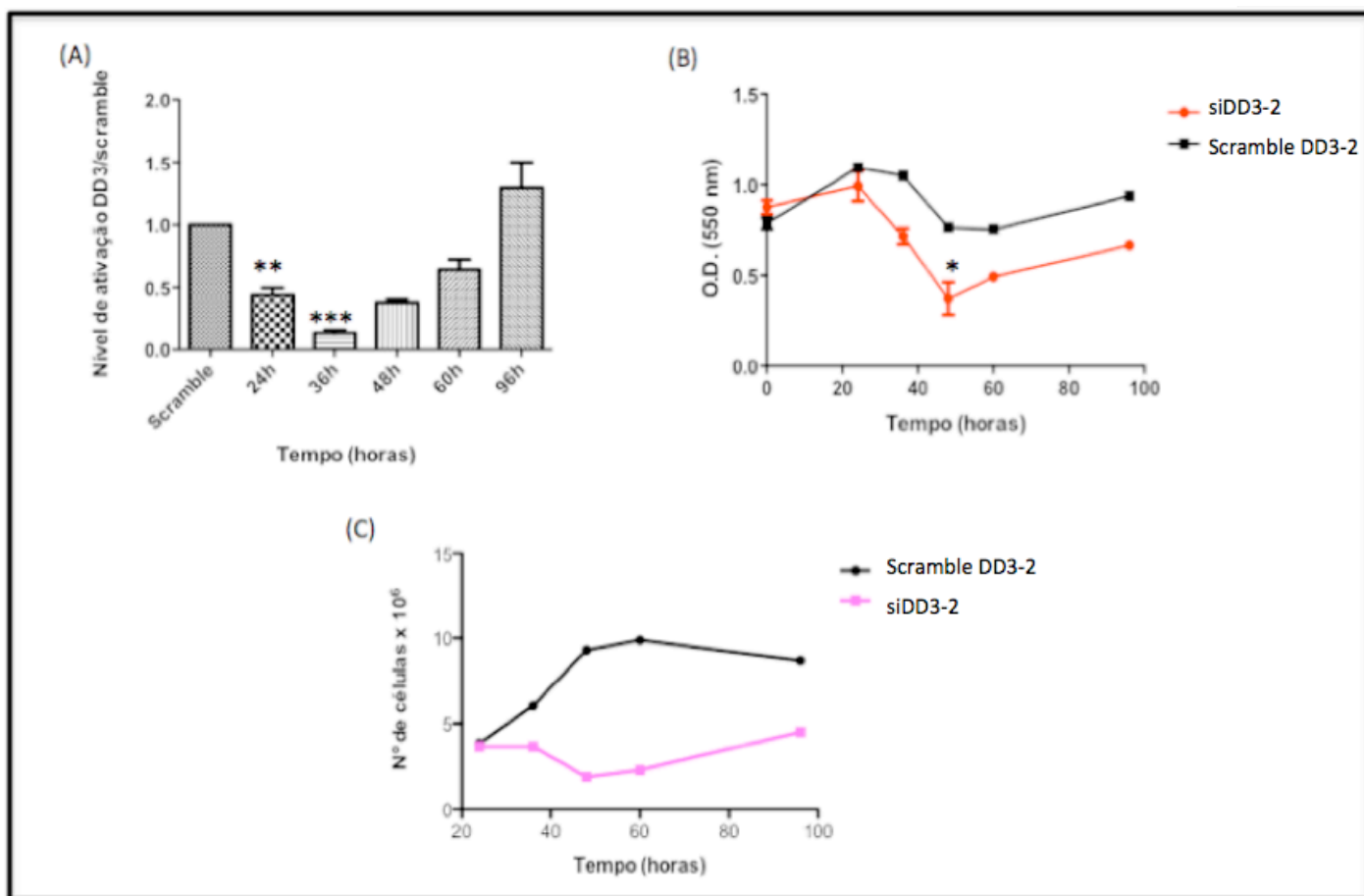


Figura 16 - Efeitos do siRNA DD3-2 na expressão do transcrito e na sobrevivência de células LNCaP

A) Análise dos dados de qRT-PCR do ensaio de interferência utilizando o siRNA do DD3-2 a 60 nM de 24 a 96 horas em células LNCaP. Como controle foi utilizado o siRNA "scramble" do DD3 (** p=0,0017 e *** p=0,0008). B). (B) As células foram incubadas com siRNA DD3 e siRNA "scramble" por 96 horas e as células viáveis foram avaliadas pelo método de coloração com cristal violeta e (C) pelo método de contagem com azul de tripan.

3.1. Detecção de núcleos picnóticos associado com redução de níveis de expressão do transcrito DD3 em células LNCaP

Uma vez que observamos que as células LNCaP que são induzidas a uma redução significativa na expressão do transcrito DD3, apresentam também uma redução na quantidade de células viáveis, fomos investigar a indução de morte celular por apoptose avaliando a incidência de núcleos com características típicas de núcleos apoptóticos marcados com 2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI). Após transfecção de células LNCaP com siDD3-2 e siRNA "scramble", foram observados "blebbings" de membrana (em destaque no "zoom" da imagem) e outras alterações morfológicas associadas com a apoptose nas células transfectadas com o siDD3-2, o que não foi observado nas células transfectadas com o siRNA "scramble" (Figura 17A).

A Figura 17B demonstra uma diminuição de 73% na expressão do transcrito DD3 em células LNCaP transfectadas com siRNA DD3-2 (60nM), quando comparado com células LNCaP transfectadas com siRNA "scramble" da sequência do DD3. Essas mesmas células transfectadas foram avaliadas em relação à morfologia de seus núcleos, sendo que os núcleos picnóticos (condensados e fragmentados) foram detectados e contados após a coloração com DAPI (Figura 17C). As células transfectadas com siDD3-2 apresentaram uma porcentagem de aproximadamente 12% de células com núcleos picnóticos em 36 horas de tratamento com o siRNA específico para o DD3 (Figura 17D). Por outro lado, as células controle tratadas com o siRNA "scramble" apresentaram apenas de 4 a 5% de células com núcleos picnóticos. O aumento na proporção de células com núcleos picnóticos (indicativos de células em apoptose), após diminuição da expressão do DD3, sugere que o transcrito DD3 pode estar relacionado com mecanismos de sobrevivência de células tumorais de próstata.

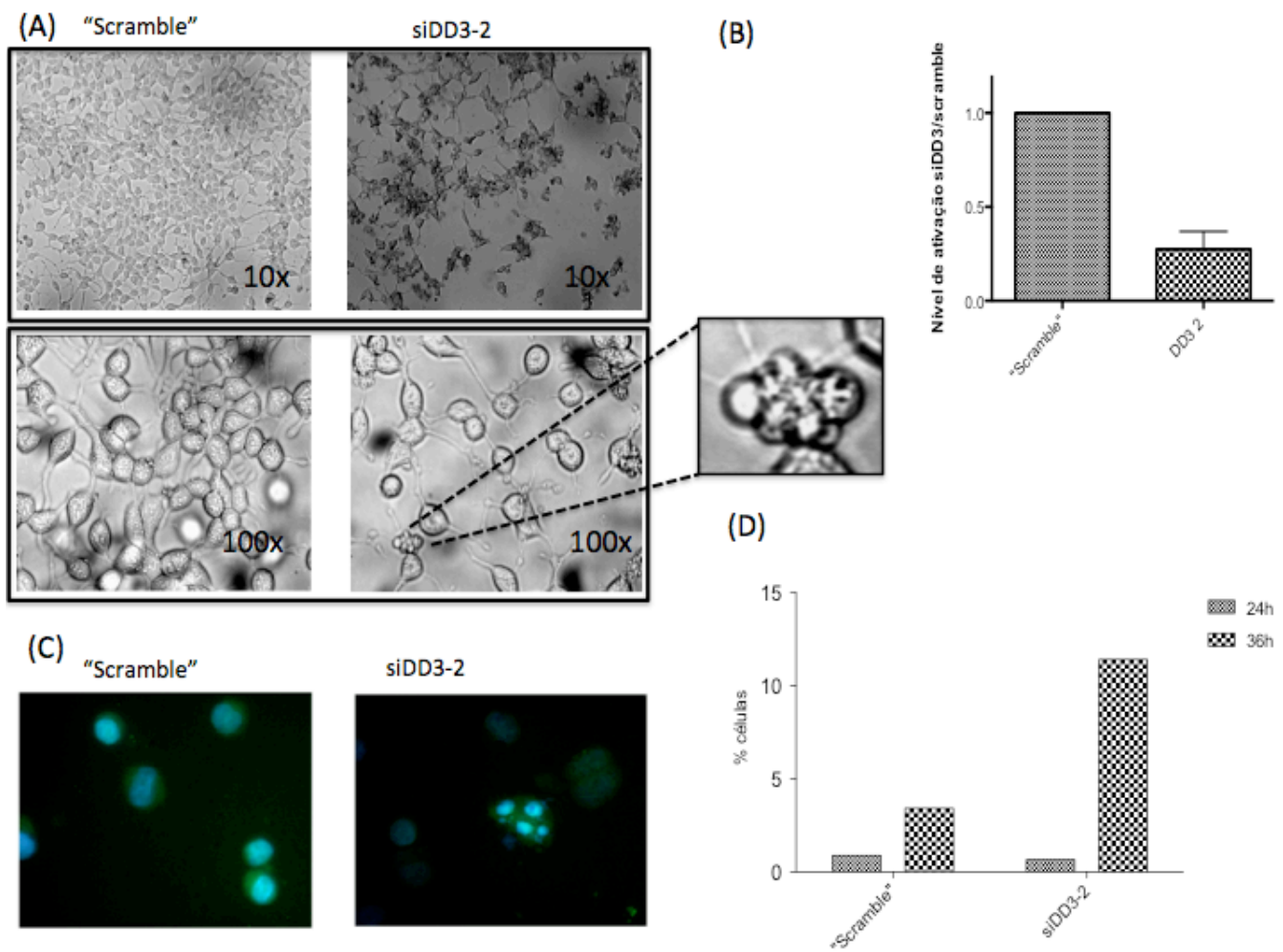


Figura 17 - Efeitos da redução do nível de expressão do DD3 em células LNCaP

(A) As células foram tratadas com 60 nM de siRNA "scramble" ou siRNA DD3-2 na mesma concentração por 36 horas, e áreas representativas foram fotografadas com aumento de 10x e 100x em microscópio invertido. Em destaque o "zoom" indica as alterações morfológicas como "blebbings" de membrana. (B) Análise dos dados de qRT-PCR do ensaio de interferência utilizando o siRNA do DD3-2 a 60 nM no tempo de 36 horas em células LNCaP, comparado com o controle "scramble" do DD3 na mesma concentração. (C) Análise morfológica dos núcleos das células LNCaP transfectadas com o siRNA DD3-2 e com o controle negativo "scramble". Os núcleos celulares foram analisados com marcação por 2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI), representando o tempo de 36h de tratamento com os siRNAs. (D) Frequência de células LNCaP com núcleos picnóticos marcados com DAPI. A avaliação da frequência das células com núcleos picnóticos corados com 2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI) foi realizada após 24 e 36h de tratamento das células LNCaP com o com o siRNA DD3-2 e com o controle negativo "scramble".

4. Células com menores níveis de expressão do DD3 apresentam efeito exacerbado de indução de morte quanto tratadas com o siRNA específico para o DD3.

Para validar o efeito de silenciamento do transcrito DD3, foram realizados experimentos de interferência em uma célula tumoral que apresenta menores níveis de expressão do transcrito DD3, quando comparado com as células LNCaP. As células PC3 tumorais de próstata, (expressam o transcrito DD3 8 vezes menos em relação às células LNCaP), conforme indicado na Figura 14A acima, foram transfectadas com o siDD3-2 e como controle foi utilizado o siRNA "scramble". Na Figura 18A, podem ser observadas as modificações da membrana plasmática ("blebbings") e outras alterações morfológicas associadas com apoptose em células PC3 transfectadas com o siDD3-2. Em células PC3 transfectadas com o siRNA "scramble", essas alterações de membranas não são observadas. A Figura 18B demonstra a redução na expressão do transcrito DD3 avaliada por qRT-PCR, apresentando 56% de silenciamento após 36 horas de tratamento das células PC3 com os RNAs de interferência. Estes dados confirmam que este RNA de interferência foi eficiente silenciando baixas quantidades de transcrito DD3 disponíveis na célula.

Adicionalmente, as células PC3 que receberam o tratamento com os RNAs de interferência (siDD3-2 e controle negativo) também foram avaliadas em ensaio indicativos de apoptose através de marcação com 2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI). Os núcleos apresentando morfologia característica de núcleos em apoptose (picnóticos) foram contados em microscópio de fluorescência. A Figura 18C demonstra que as células controle que foram tratadas com o siRNA scramble apresentaram cerca de 5% de células PC3 em apoptose, enquanto que as células tratadas com o RNA de interferência específico para o transcrito DD3 apresentaram aproximadamente 29% de células com núcleos picnóticos, sugestivos de células em apoptose.

Esses dados corroboram com os dados anteriores em que uma célula tumoral de próstata quando apresenta uma redução significativa no seu perfil de expressão do transcrito DD3 por meio de interferência de RNA, induz alterações

morfológicas típicas de células em apoptose, sugerindo que por mecanismos ainda desconhecidos, o transcrito DD3 pode estar relacionado com vias de sobrevivência de células tumorais de próstata.

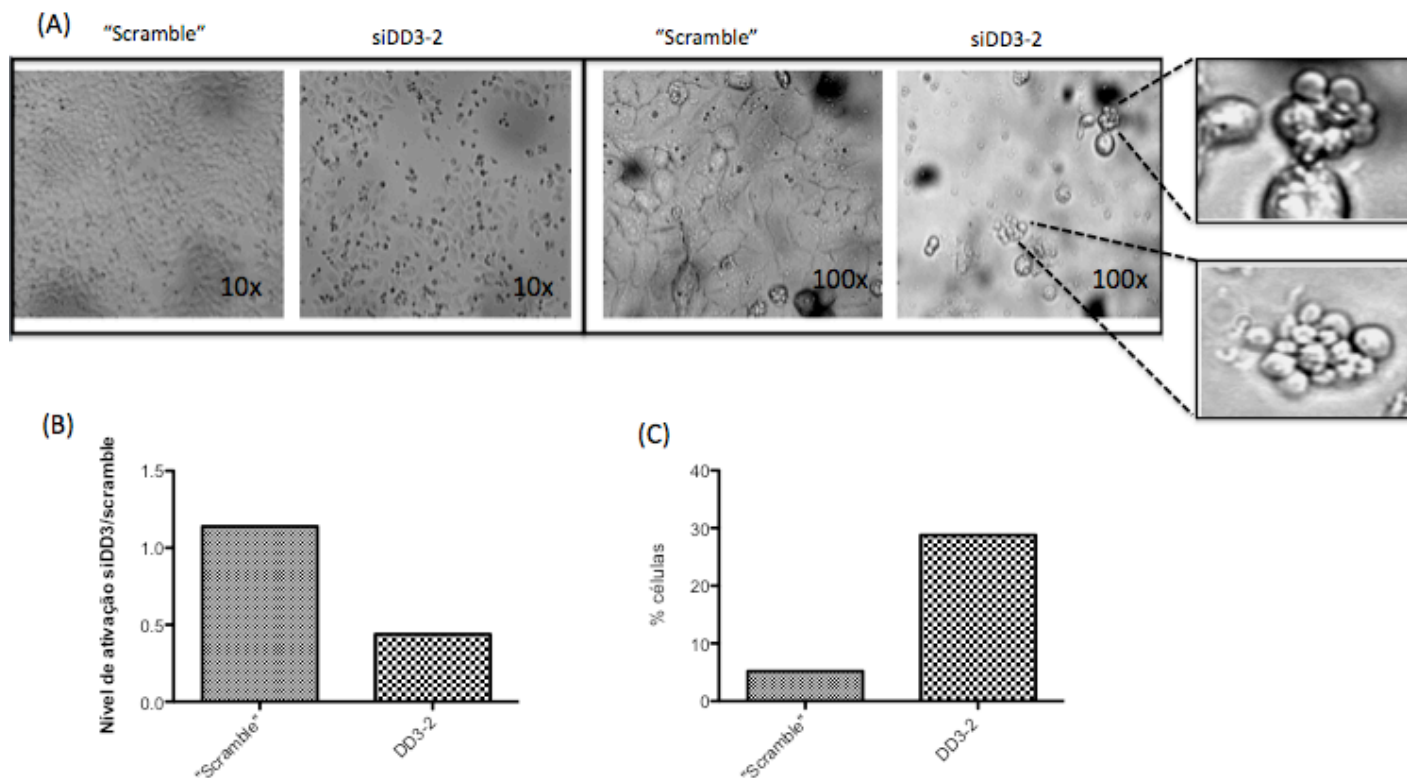


Figura 18 -Efeitos da redução do nível de expressão do DD3 em células PC3

(A) Células PC3 tumorais de próstata foram tratadas com 60 nM de siRNA "scramble" ou siRNA DD3-2 na mesma concentração por 36 horas, e áreas representativas foram fotografadas com magnificação de 10x e 100x em microscópio invertido. Em destaque o "zoom" indica as alterações morfológicas como "blebbings" de membrana. (B) Análise dos dados de qRT-PCR do ensaio de interferência utilizando RNA de interferência siDD3-2 e controle negativo "scramble" na concentração de 60 nM no tempo de 36 horas em células tumorais de próstata PC3. (C) Frequência de células PC3 que apresentam núcleos apoptóticos marcados com DAPI. A avaliação da frequência das células com núcleos apoptóticos corados com 2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride (DAPI) foi realizada após 36 horas de tratamento das células PC3 com os siRNA DD3-2 e "scramble".

5. O nível de expressão do transcrito DD3 é regulado pela via do receptor de androgênio (AR)

As células LNCaP são células receptor de androgênio (AR)-positivas e responsivas a androgênios, uma via de sinalização sabidamente envolvida na sobrevivência e proliferação de células normais e tumorais de próstata. Uma vez que nossos dados mostraram que as LNCaP são também as células que expressam os maiores níveis do transcrito DD3 entre as linhagens de próstata analisadas no presente estudo, e que esse transcrito pode estar relacionado com vias de sobrevivência de células tumorais de próstata, fomos avaliar o possível envolvimento do DD3 com a via do AR. Para tanto, o primeiro passo foi avaliar o nível de expressão do DD3 em células LNCaP mediante tratamento com concentrações crescentes do androgênio dihidrotestosterona (DHT). A Figura 19A demonstra que a expressão do DD3 é androgênio-dependente. Quando essas células são cultivadas em meio livre de androgênio, os níveis de expressão do DD3 reduzem a níveis indetectáveis dentro de 12 horas (Figura 19B). Ao adicionar a DHT ao meio de cultura, a expressão do DD3 aumenta rapidamente (Figura 19A).

Adicionalmente, para confirmar que a expressão do transcrito DD3 é regulada através da via de sinalização do AR em células dependentes de androgênio LNCaP, foi utilizado o antagonista do androgênio flutamida, ou a flutamida em associação com o DHT em tratamento por 48 horas. Como mostra a Figura 19B, o DD3 quando estimulado somente pelo androgênio DHT, apresenta um aumento significativo de 11 vezes em sua expressão, em 36 horas de tratamento. Entretanto, este efeito de aumento da expressão do gene DD3 promovido pelo androgênio DHT é revertido quando estas mesmas células são tratadas com o androgênio DHT em conjunto com o anti-androgênio flutamida (Figura 19B). Esta reversão ocorre em função do anti-androgênio flutamida competir com o DHT pela ligação ao AR. Esta competição inibe parcialmente a ativação da expressão do DD3 promovida pela ligação do DHT ao AR. Por outro lado, quando as células LNCaP também foram tratadas somente com o anti-androgênio flutamida, estas apresentaram um aumento de quatro vezes na expressão do DD3, possivelmente devido ao anti-androgênio

flutamida agir como agonista em algumas moléculas de ARs mutantes. Em conjunto, estes resultados indicam que a via do AR está envolvida regulação da expressão do transcrito DD3.

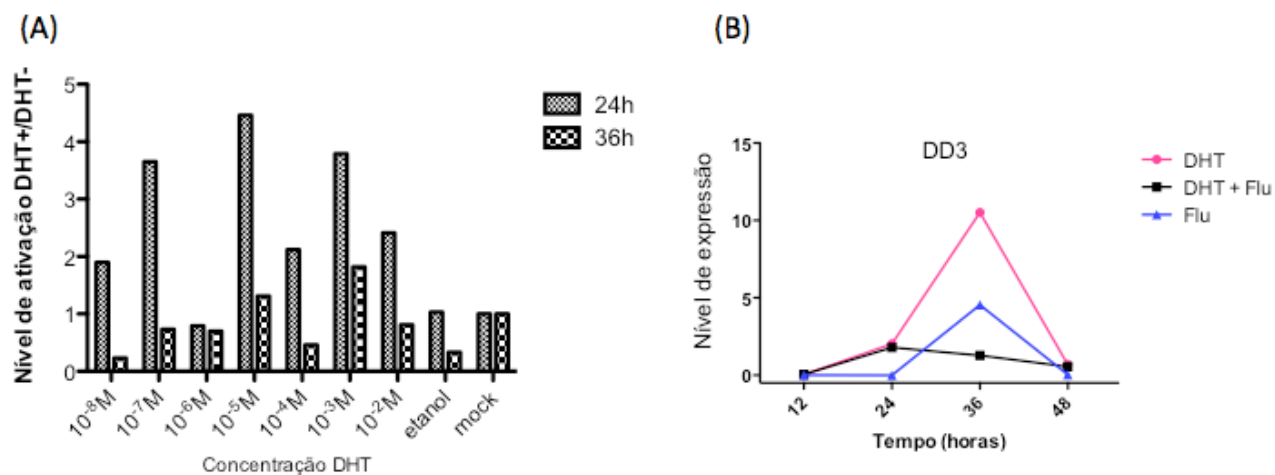


Figura 19 - A expressão do transcrito DD3 é regulada pela via do AR

(A) Efeitos da remoção do androgênio e adição de concentrações crescentes de dihidrotestosterona (DHT) na expressão relativa do DD3 em células LNCaP medidas por qRT-PCR utilizando “SYBR green”. (B) Análise da expressão do gene DD3 por qRT-PCR após tratamentos de células LNCaP com 10⁻⁵ M de Dihidrotestosterona (DHT), 10⁻⁵ M de DHT em conjunto com 10⁻⁵ M do anti-androgênio flutamida ou 10⁻⁵ M de flutamida, nos tempos de 12 a 48 horas.

6. O silenciamento do DD3 altera o perfil de expressão de genes regulados pela via do receptor de androgênio (AR)

Com o intuito de melhor caracterizar em que etapa da via do AR atua o transcrito DD3 e detalhar seu envolvimento nesta via, era necessário primeiramente validar se de fato as células LNCaP utilizadas em nosso modelo de estudo, mediante o tratamento com DHT, estavam ativando a expressão de genes de resposta ao receptor de androgênio (AR). Optamos neste estudo por avaliar o perfil de expressão de uma série de genes que são ativados diretamente pelo AR. Dentre os genes testados, incluem-se o TMRSS2, NDRG1, GREB1, PSA, AR, FGF8, CDK1, CDK2 e PMEPA1, os quais possuem elementos de resposta ao androgênio (ARE) em suas regiões promotoras (Ngan S. *et al*, 2009; Gnanapragasam V. J. *et al*, 2002; Jariwala U. *et al.*, 2007). Os níveis de expressão desses transcritos foram analisados utilizando qRT-PCR após tratamento com o androgênio Dihidrotestosterona (DHT) ao longo do tempo de tratamento de 24 horas. Foi observado um aumento de pelo menos duas vezes na expressão dos genes-alvo responsivos ao AR, bem como na expressão do transcrito DD3. Estes dados confirmam a ativação da expressão desses genes através do estímulo do AR por androgênio DHT (Figura 20A).

Nossos dados mostraram que o transcrito DD3 apresenta um aumento em seu nível de expressão quando estimulado pelo DHT (Fig 19A). Para investigar mais detalhadamente a relação entre a via do receptor de androgênio (AR) e os níveis de expressão do gene DD3, avaliamos também a expressão dos genes-alvo do AR após tratamento das células LNCaP com RNA de interferência do DD3 no tempo de 36 horas. De um modo geral, todos os genes analisados apresentaram uma alteração no perfil de expressão de seus transcritos quando a expressão do DD3 foi suprimida pelo tratamento com o RNA de interferência específico para o DD3. O mesmo não foi observado em células tratadas com o siRNA controle negativo (scramble) (Figura 20B). Os genes GREB1 e PMEPA1 diminuíram significativamente sua expressão, como mostra a Figura 20B, assim como o próprio transcrito do DD3. Os genes TMRSS2, FGF8 e CdK1 apresentaram diminuição em seus níveis de

expressão, porém devido aos valores do desvio padrão, esses transcritos não apresentaram diminuição significativa.

Ao passo que alguns genes apresentaram diminuição na expressão de seus transcritos mediante tratamento das células LNCaP com o RNA de interferência específico para o DD3, outros genes, como o NDRG1 e o Cdk2, apresentaram um aumento significativo de 8 e aproximadamente 40 vezes, respectivamente, em seus níveis de expressão, como mostra a Figura 20B. Em contrapartida, o nível de expressão do transcrito do receptor de androgênio (AR) mostrou-se inalterado após este tratamento. O transcrito do PSA apresentou um aumento de 1,5 vezes em sua expressão, embora não estatisticamente significativo. Estes dados indicam que o transcrito DD3 apresenta papel na regulação da expressão dos genes de resposta ao AR. Adicionalmente, é provável que ação do DD3 esteja centrada na regulação dos genes de resposta ao AR, já que a expressão do transcrito do AR permanece inalterada após diminuição da expressão do DD3.

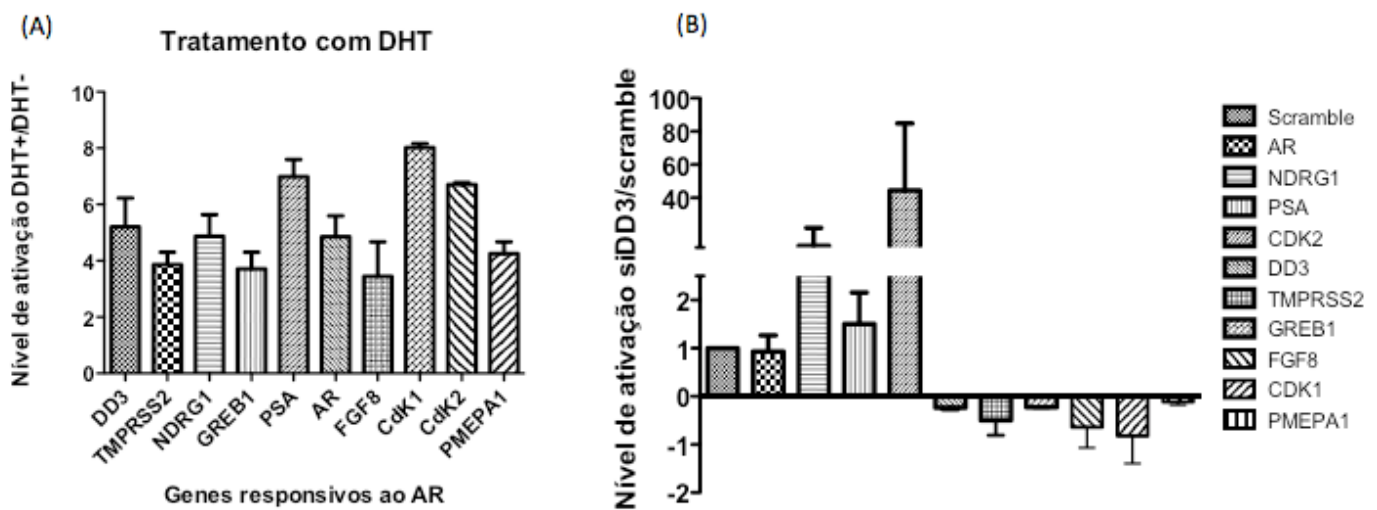


Figura 20 - Perfil de expressão de genes após ativação do AR e transfeção com siDD3-2.

(A) Análise por qRT-PCR da expressão de genes regulados pelo receptor de androgênio (AR) após tratamento de $10^{-5}M$ de Dihidrotestosterona (DHT) em células LNCaP no tempo de 24 horas. (B) Os genes TMPRSS2, GREB1 e PMEPA1 apresentaram diminuição da expressão de seus transcritos ($p < 0,05$), enquanto os genes NDRG1 e CDK2 apresentaram significativo ($p < 0,05$) aumento de sua expressão, mediante tratamento com siDD3 em relação às células tratadas com o “scramble”. Análise dos dados de qRT-PCR na expressão de genes responsivos ao receptor de androgênio (AR). Assim como para os genes utilizados nas análises do gráfico anterior, o constitutivo utilizado para estas análises foi o gene do 18S e o controle para comparação entre amostras tratadas com siDD3-2 foram as células LNCaP tratadas com o RNA de interferência controle “scramble”.

7. Avaliação da possível função do transcrito DD3 pela superexpressão em células LNCaP

Como abordagem alternativa para caracterizar o possível papel funcional do transcrito DD3 em células LNCaP, optamos por utilizar a abordagem complementar e oposta à testada anteriormente, que consiste na tentativa de superexpressão do transcrito DD3 nesse modelo celular. Para atingir esse objetivo, precisaríamos amplificar a sequência completa do transcrito DD3 e cloná-la em um vetor de expressão em células eucarióticas.

O primeiro passo dado nesse sentido foi a tentativa de amplificação do transcrito completo de 2.553 pb, compreendido entre os exons 1 e 4b, cuja localização está demonstrada esquematicamente na Figura 21.

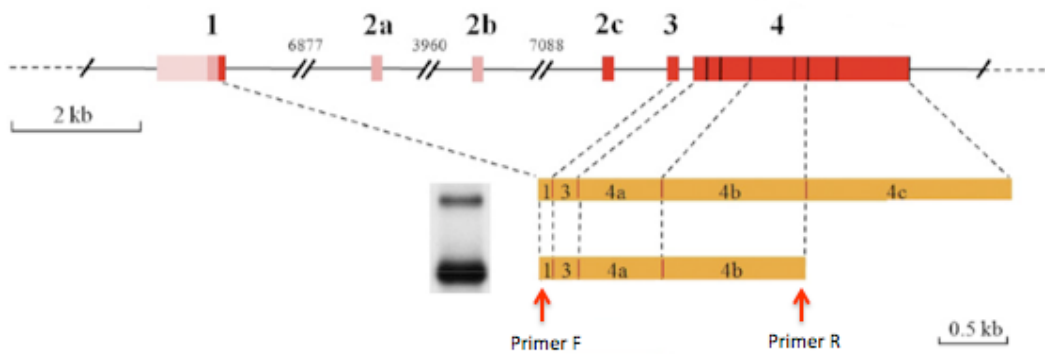


Figura 21 - Oligonucleotídeos para amplificação do DD3

Representação esquemática da unidade transcricional do DD3. As setas vermelhas indicam as localizações de primers para amplificação da sequência que compreende ao transcrito mais frequentemente detectado em amostras tumorais de próstata. (Modificado de Clarke *et al.*, 2009).

Através de distintas abordagens, como utilização de enzimas específicas para amplificação de fragmentos longos, conforme demonstrado na metodologia, e utilizando os oligonucleotídeos externos indicados na Figura 21, não foi possível a amplificação desse transcrito completo.

Pensando em verificar se esta amplificação não estaria acontecendo por ser um transcrito grande e que assim seria dificilmente totalmente amplificado, projetamos uma série de outros oligonucleotídeos localizados em sequências internas à sequência completa do DD3. Esta estratégia visava tentar reunir os diferentes fragmentos menores amplificados para obter o fragmento completo. Com esses oligonucleotídeos internos, em adição aos oligonucleotídeos externos anteriormente citados, testamos a amplificação do DD3 através de uma série de combinações destas sequências iniciadoras. As diferentes combinações de sequências de oligonucleotídeos testadas estão apresentadas na Figura 22.

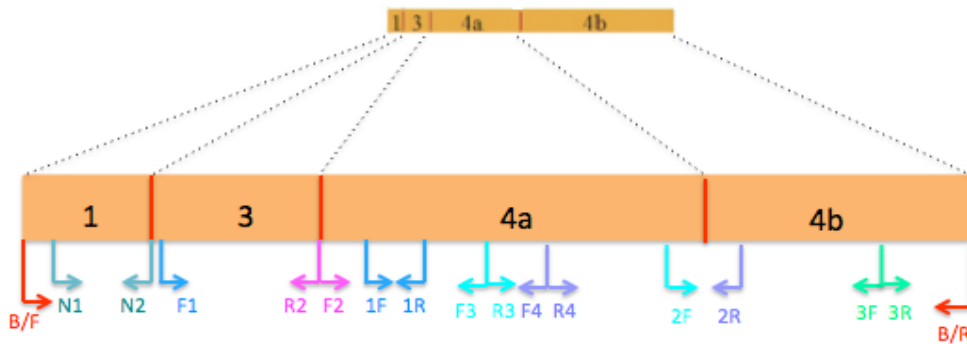


Figura 22 - Combinações de oligos na unidade transcritorial do DD3

Unidade transcritorial do DD3 com as diferentes combinações de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da isoforma contendo os exons 1, 3, 4a e 4b.

Como resultado de repetidas ampliações utilizando essas combinações de oligonucleotídeos a partir de amostras de RNA total de tumores de próstata e de linhagem LNCaP positivos para expressão do DD3, observamos que o tamanho máximo de amplicons obtidos a partir do transcrito DD3 foi de 561 pb, como mostra a Figura 23. Uma vez que não conseguimos obter o transcrito completo de 2.553 pb, decidimos por não seguir com os estudos funcionais por meio da superexpressão, conforme realizado por outros autores na caracterização funcional de ncRNAs (Srivastava *et al.*, 2006; Kwok *et al.*, 2007).

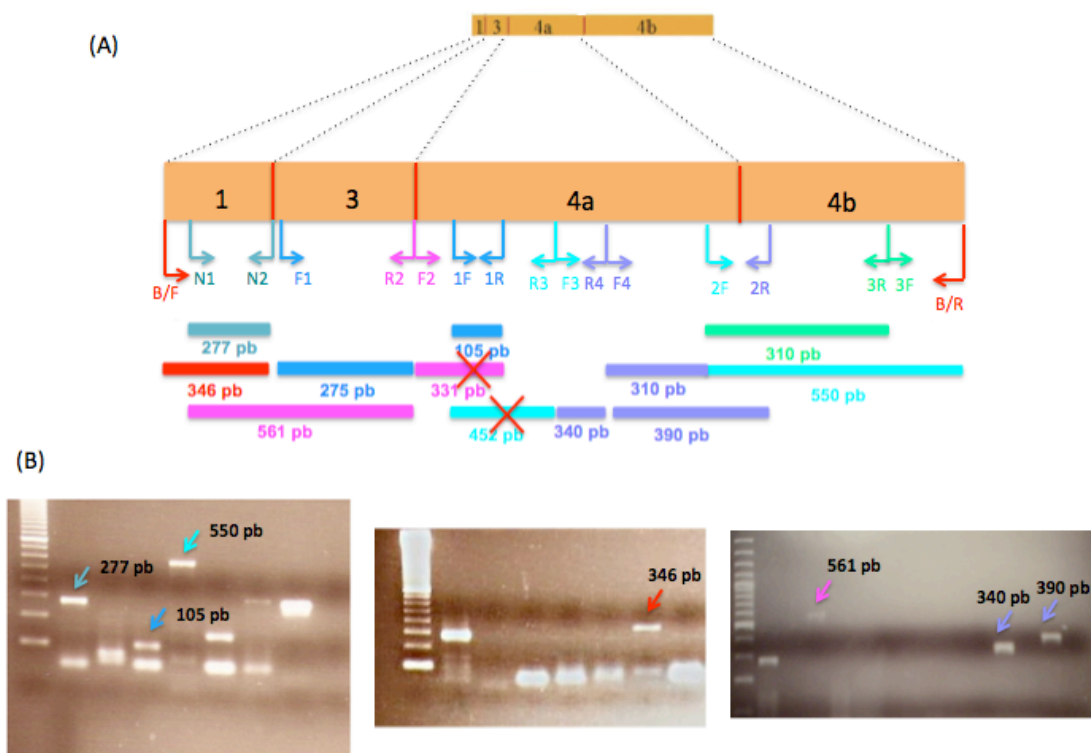


Figura 23 - Amplificação dos fragmentos do transcrito DD3

(A) Sequência do RNA mensageiro do DD3 correspondente aos exons 1, 3, 4a e 4b, contendo as regiões amplificadas destacadas pelos retângulos em cores diversas com seus respectivos tamanhos de amplicons. (B) Perfil dos produtos de amplificação do DD3 por qRT-PCR apresentados em gel de agarose 2,0%, confirmando a amplificação dos amplicons específicos de 105, 277, 340, 346, 390, 550 e 561 pb correspondentes aos fragmentos do DD3 em amostras de tumores de próstata. Os amplicons que aparecem destacados com um sinal de x em vermelho não foram amplificados.

8. Caracterização do perfil de expressão do DD3 em distintos compartimentos celulares

Como complemento à caracterização dos possíveis papéis do ncRNA DD3 na biologia de células de câncer de próstata, um passo importante neste sentido é a determinação dos compartimentos celulares em que este ncRNA encontra-se expresso em células de CaP.

No que se refere à localização do transcrito DD3 em compartimentos celulares, os dados da literatura são contraditórios. Verhaegh G. *et al.* (2003) demonstrou indícios de que a maioria dos transcritos do DD3 está localizada no núcleo, enquanto Popa. *et al.* (2007) demonstrou o DD3 está localizado no citoplasma de células tumorais e ausente em células do estroma.

Em nosso modelo de estudo *in vitro*, em que utilizamos a linhagem LNCaP, preparamos amostras de RNA total de extratos celulares provenientes de células LNCaP após centrifugação fracionada, gerando amostras de RNA representativas de diferentes compartimentos celulares, tais como a fração P1 que corresponde àquela rica em núcleos celulares, corpos densos e vesículas, a fração P2 que corresponde àquela rica em mitocôndrias, a fração P3 que corresponde àquela rica em vesículas livres e ribossomos e a fração P4, enriquecida em citoplasma celular. Através de qRT-PCR, investigamos o nível de expressão do transcrito DD3 nestas diferentes amostras de RNA. A Figura 24 demonstra que há um maior nível de expressão do transcrito DD3 na fração nuclear dos extratos celulares (P1), composta também por corpos densos e vesículas, sugerindo ser este transcrito predominantemente expresso nestes compartimentos celulares. A fração com segundo maior nível de expressão de DD3 corresponde ao compartimento contendo predominantemente ribossomos e vesículas livres (P3). As frações P2 e P4 apresentam níveis menores de expressão do DD3, compreendendo às frações celulares enriquecidas em mitocôndrias e citoplasma. Estes dados sugerem que o DD3 encontra-se expresso predominantemente nas frações nucleares e em vesículas livres e ribossomos.

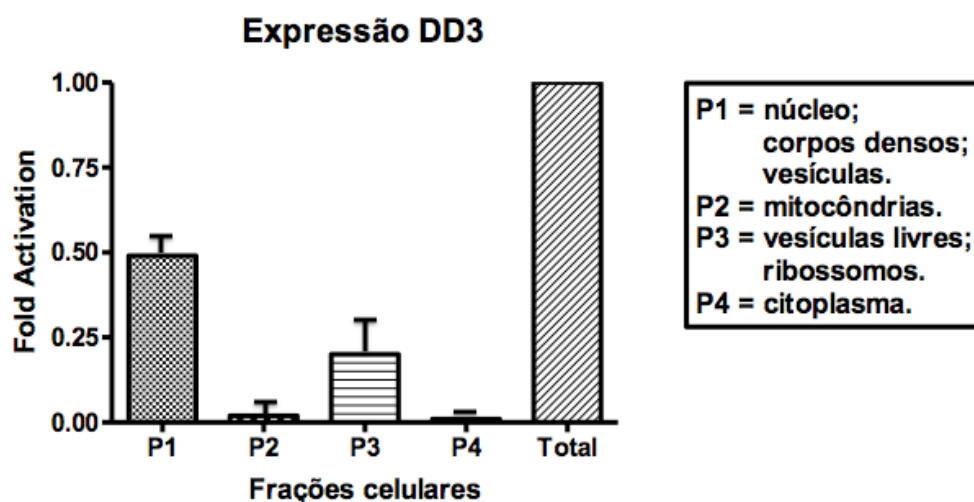


Figura 24 - Expressão do transcrito DD3 em compartimentos celulares

Análise dos dados de qRT-PCR de expressão do transcrito DD3 nos diferentes compartimentos celulares: P1 corresponde à fração celular do núcleo, corpos densos e vesículas, P2: corresponde às mitocôndrias; P3 corresponde às vesículas livres e ribossomos e P4 corresponde ao citoplasma. A amostra total corresponde ao extrato celular completo, contendo todas as frações celulares.

DISCUSSÃO

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) têm sido associados com regulação da expressão gênica por uma variedade de mecanismos, como a interferência de RNA, o silenciamento gênico, a desmetilação do DNA e a alteração da estrutura de cromatina. Essas informações indicam que essa nova classe de transcritos possui papel central na diferenciação e no desenvolvimento, embora não se conheça ainda funções específicas para a maioria dos ncRNAs (Panzitt *et al.*, 2007).

Muitos trabalhos recentes relacionam mudanças nos níveis de expressão de ncRNAs ao câncer. Como exemplos, incluem-se os ncRNAs PCGEM1 (Petrovics *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2006) e o DD3 (Schalken *et al.*, 2003; Bussemakers *et al.*, 1999), os quais apresentam superexpressão de seus transcritos no tumor de CaP. Podemos citar também a superexpressão do RNA BC200 (Perez *et al.*, 2008; Iacoangeli *et al.*, 2004), a qual tem sido correlacionada com a progressão de tumores de mama, se apresentando como um potencial novo marcador molecular para esses tumores. Ainda, o aumento da expressão do gene MALAT-1 (Tano K *et al.*, 2010) é indicativo de piora na evolução clínica em pacientes com tumores de pulmão, enfatizando o potencial papel dos ncRNAs na progressão tumoral.

Com o intuito de se desvendar os papéis funcionais que os ncRNAs podem desempenhar, várias metodologias experimentais têm sido empregadas, dentre as quais podem se destacar o silenciamento gênico através de siRNA, shRNA ou oligos antisense, superexpressão, mutagênese, CHIP e FISH (Mattick, 2009; Lin *et al.*, 2008; Mourtada-Maarabouni *et al.*, 2008; Yoshimizu *et al.*, 2008; Tsang *et al.*, 2007; Lewejohann L *et al.*, 2004).

A caracterização do DD3 como um RNA não codificante tem sido baseada em diversas abordagens experimentais e achados: (1) A sequência do DD3 não contém nenhuma sequência aberta de leitura (ORF) identificada, (2) apresenta alta densidade de códons de parada, (3) em tentativa de tradução "in vitro" não foi possível detectar nenhuma proteína como produto e (4) falta de

homologia entre possível polipeptídeo produzido e sequências depositadas em bancos de dados (Bussemakers *et al.*, 1999; Verhaegh *et al.*, 2000).

A caracterização do ncRNA DD3 também demonstrou, através de análises de qRT-PCR, que esse transcrito se apresenta expresso em baixos níveis em tecidos de próstata normal e de HPB. Por outro lado, sua expressão em tecidos tumorais de próstata mostrou-se cerca de 60 vezes maior (Bussemakers *et al.*, 1999; de Kok *et al.*, 2002). Sua expressão também foi analisada em linhagens celulares, em que se mostrou expresso apenas em uma linhagem celular prostática (LNCaP) dentre as várias analisadas (van Bokhoven *et al.*, 2003), confirmando assim a expressão próstata-específica desse transcrito. Apesar de todas estas caracterizações, até o presente momento, não há nenhum dado publicado a respeito do papel funcional do DD3 no CaP. Portanto, este trabalho foi pioneiro na investigação de sua função na biologia do CaP e de seu possível papel na regulação de eventos celulares, moleculares e vias de sinalização relacionadas à progressão do CaP.

Sendo assim, como primeiro passo para investigar o papel funcional do ncRNA DD3 no CaP, caracterizamos o modelo *in vitro* que utilizaríamos para os estudos funcionais. Assim, avaliamos o perfil de expressão do DD3 em linhagens celulares tumorais (LNCaP, PC3 e DU145) e não tumorais de próstata (RWPE-1 e PrEC). A linhagem celular que apresentou maiores níveis de expressão do transcrito DD3 foi a LNCaP, corroborando com os dados da literatura (van Bokhoven *et al.*, 2003). Esse resultado nos direcionou a selecionar a linhagem LNCaP como modelo ideal para os ensaios de silenciamento gênico por interferência de RNA, escolhido como uma das abordagens para avaliação da possível função deste transcrito no presente estudo.

Para reduzir a expressão do transcrito DD3, transfectamos a linhagem celular tumoral de próstata LNCaP com RNAs de interferência desenhados e sintetizados especificamente para esse transcrito. Observamos que a transfecção com o siRNA-2 apresentou a melhor eficiência de redução na expressão do DD3 (75%), ao passo que os demais siRNAs DD3 específicos, bem como todos os siRNAs controles, não apresentaram eficiências satisfatórias de inibição da expressão do DD3. De acordo com Rana (2007) e Schubert *et al.*, (2005), essa baixa eficiência pode ser provocada pela

inacessibilidade dos RNAs de interferência aos transcritos-alvo, devido às suas estruturas secundárias ou por ligações à proteínas.

O passo seguinte na caracterização funcional do DD3 foi avaliar os efeitos celulares e moleculares da diminuição de sua expressão. As células LNCaP transfectadas com o siRNA DD3-2, as quais apresentaram melhor eficiência na redução da expressão do transcrito DD3, apresentaram uma significativa redução na viabilidade e sobrevivência celulares, quando comparados com as células transfectadas com o siRNA controle "scramble". Esses dados sugerem que o transcrito DD3 pode estar envolvido em vias de sobrevivência em células tumorais de próstata. Vários outros ncRNAs como o GAS5 (Mourtada *et al.*, 2008), o PCGEM-1 (Mattick, 2009) e o RNA intrônico derivado do RASSF1 (Reis *et al.*, 2004) têm sido associados com sobrevivência de células de CaP, enfatizando a importância do envolvimento dessas moléculas no controle e progressão dos tumores prostáticos.

Adicionalmente à diminuição da viabilidade celular em células que foram induzidas à redução na expressão do DD3, nosso trabalho demonstrou também que as células LNCaP apresentaram um aumento de 12% na proporção de núcleos celulares com características típicas de núcleos apoptóticos. Observamos também que a linhagem tumoral PC3, a qual apresenta baixos níveis de expressão do DD3, quando tratada com o siRNA específico para o DD3 apresentou um aumento ainda maior na proporção de núcleos apoptóticos (aumento de 29%). Acreditamos que esta maior proporção de núcleos apoptóticos nessas células que apresentam menores níveis de expressão do DD3 tenha sido devido à maior eficiência da ação do siRNA específico para o DD3 na presença de menores números de cópias de seus alvos. Esses dados também evidenciaram que células que apresentaram diminuição da expressão do DD3 estão possivelmente entrando em apoptose, conforme também avaliado por outros autores (Vakkala *et al.*, 1999). É importante acrescentar que outros marcadores de apoptose deverão ser avaliados para confirmar a indução de apoptose em células que tiveram diminuição da expressão do DD3.

O processo de apoptose é sabidamente importante no papel do desenvolvimento do câncer e o escape da morte de células por apoptose é um dos fatores que favorecem o crescimento dos tumores. Sendo assim, tem sido

abordada a importância da expressão de genes envolvidos nas vias de apoptose e sua relação com a progressão tumoral (Tsang *et al.*, 2007). ncRNAs como o CURD (Tsang *et al.*, 2007), o PAR (Xu *et al.*, 2006) e o PCGEM1, são exemplos de transcritos envolvidos em sobrevivência de células tumorais. O nível de expressão desses transcritos se correlaciona com a sobrevivência dessas células. Dentro deste contexto, o DD3 além de ser um transcrito altamente específico de células de próstata, parece estar envolvido na sobrevivência dessas células, se apresentando como um promissor alvo terapêutico para esta neoplasia. Cabe ainda investigar se o DD3 estaria envolvido no escape da morte celular por apoptose ou regulando negativamente as vias pró-apoptóticas. Dessa forma, como foi descrito para o gene BRCA1 (Fan *et al.*, 2006), o qual, após descoberto seu envolvimento na sobrevivência dos tumores de mama e ovário, têm sido investigado como alvo terapêutico para essas neoplasias.

A via de sinalização do receptor de androgênio corresponde a uma via que possui um papel crítico no desenvolvimento, proliferação e diferenciação da próstata normal, assim como na sobrevivência de células tumorais prostáticas (Balk & Knudsen, 2008). Alguns ncRNAs têm sido relacionados com a via do receptor de androgênio, sendo alguns deles responsivos a esse hormônio (Louro *et al.*, 2007), assim como alguns miRNAs (Shi *et al.*, 2007).

As células LNCaP são sabidamente receptor de androgênio (AR)-positivas e responsivas a androgênios (van Bokhoven *et al.*, 2003), e são também as células que expressam os maiores níveis do transcrito DD3, conforme observado no presente estudo e por outros autores (Bussemakers *et al.*, 1999). Com base nos achados do presente trabalho, resolvemos analisar o envolvimento do transcrito DD3 com a via do receptor de androgênio (AR), por ser essa via sabidamente envolvida no controle da sobrevivência de células de CaP.

Demonstramos no presente estudo que células LNCaP tratadas com o androgênio dihidrotestosterona (DHT), a forma de androgênio mais ativa (Kang *et al.*, 2003), os níveis de expressão do DD3 se apresentaram aumentados. Dados similares foram obtidos por (Schalken *et al.*, 2003), corroborando com nossos achados. A ativação da expressão do DD3 mediante o tratamento androgênico é totalmente revertida quando o androgênio é retirado do meio de

cultura. O mesmo foi observado quando essas células foram tratadas com DHT em conjunto com a flutamida, um conhecido anti-androgênico. Verificamos nestes ensaios que os níveis de expressão do transcrito DD3 foram significativamente reduzidos quando comparado com os níveis de expressão do transcrito DD3 em células estimuladas somente com o androgênio. Por outro lado, ao tratar as células LNCaP somente com o anti-androgênio flutamida, observamos que o nível de expressão do DD3 apresentou um aumento de quatro vezes. É possível que o aumento da expressão do DD3 por este tratamento tenha ocorrido devido ao fato dessa droga agir como agonista em algumas moléculas de ARs mutantes em células LNCaP, conforme anteriormente descrito por Feldman (2001). Esses dados sugerem em conjunto que o DD3 é um ncRNA cuja expressão é regulada pela via do AR.

O envolvimento de genes superexpressos em células tumorais de próstata responsivas ao AR (LNCaP) vêm sendo amplamente estudado. Um exemplo de genes expressos na próstata envolvidos nessa via corresponde ao gene PAR (Xu *et al.*, 2006). Esse gene é altamente expresso em células LNCaP, que quando estimuladas com DHT, sua expressão é aumentada. Quando essas mesmas células são tratadas com flutamida em conjunto com DHT, a expressão de PAR é reduzida (Xu *et al.*, 2006), assim como observado em relação à resposta de expressão do DD3 mediante esses tratamentos.

A identificação de genes regulados pelo androgênio em células de CaP é considerado de suma importância para definição dos mecanismos de desenvolvimento de progressão do CaP (Ngan *et al.*, 2009). Sendo assim, para melhor caracterizar o envolvimento do transcrito DD3 com a via do receptor de androgênio, nós analisamos os níveis de expressão de genes sabidamente responsivos ao AR (os quais possuem elementos de resposta ao androgênio em suas regiões promotoras). Observamos que mediante o tratamento das células LNCaP com DHT, ocorreu aumento de pelo menos duas vezes na expressão dos genes TMRSS2, NDRG1, GREB1, PSA, AR, FGF8, CDK1, CDK2 e PMEPA1. Esses dados confirmaram que o receptor de androgênio nessas células está ativo e é capaz de estimular a transcrição de seus genes-alvo de resposta (Ngan *et al.*, 2009; Gnanapragasam *et al.*, 2002; Jariwala *et al.*, 2007). Em seguida avaliamos também a expressão dos genes-alvo do AR após tratamento das células LNCaP com RNA de interferência para o DD3. Nossos

resultados indicaram que os genes analisados apresentaram uma alteração no perfil de expressão de seus transcritos quando a expressão do DD3 foi suprimida. O mesmo não foi observado em células tratadas com o siRNA controle. Os genes GREB1 e PMEPA1 diminuíram significativamente sua expressão, assim como o próprio transcrito do DD3. Os genes TMPRSS2, FGF8 e Cdk1 apresentaram diminuição em seus níveis de expressão, porém devido aos valores do desvio padrão, essa redução não foi significativa. Por outro lado, os transcritos NDRG1 e o Cdk2 apresentaram um aumento significativo em seus níveis de expressão. É notável que a expressão do AR permaneceu inalterada após a diminuição da expressão do DD3. Os genes de resposta ao AR que apresentaram alteração de seu nível de expressão após diminuição da expressão do ncRNA DD3 são sabidamente envolvidos nos processos de proliferação, metástase, angiogênese e ciclo celular (Rae *et al.*, 2006; Pflueger *et al.*, 2009; Gnanapragasam *et al.*, 2002; Rigas *et al.*, 2007). É possível então que a redução da viabilidade celular e possivelmente a indução de apoptose mediante a diminuição da expressão do DD3 seja um resultado combinado da alteração da expressão desses genes. Sendo o DD3 um possível regulador da expressão dos mesmos, sugere-se que na progressão do CaP, a expressão aberrante do transcrito DD3 esteja promovendo um desbalanço no nível de expressão desses genes, promovendo a progressão do CaP.

Uma das hipóteses para explicar a alteração nos níveis de expressão desses genes que são sabidamente regulados pelo AR quando silenciarmos o transcrito DD3, é que o DD3 estaria envolvido na regulação da expressão destes genes após os mesmos serem transcritos, como resultado da ativação do AR. Esta hipótese é reforçada pelo fato de não termos observado a redução da expressão do RNA do AR e apenas dos seus genes de resposta mediante a redução da expressão do DD3. Em conjunto com a observação de que a expressão do DD3 é induzida pela ativação do AR, sugerimos que o DD3 seria um dos potenciais genes de resposta ao AR. No entanto, na região promotora do gene DD3 não identificamos, por meio de diversas análises de bioinformática, elementos de resposta ao AR (sequências chamadas ARES) (dados não mostrados). Outros autores realizaram de forma similar essas análises e também não identificaram essas sequências (Verhaegh *et al.*, 2000).

Por outro lado, é possível que a expressão do DD3 responda à ativação do AR por meio da ligação deste fator de transcrição ativado em sequências promotoras distintas da consenso, conforme foi observado para o gene SREBP. Este gene SREBP é ativado pelo AR através da ligação desse fator de transcrição em elementos da sequência promotora distintos da sequência consenso (Heemers *et al.*, 2004).

Com base nos dados aqui apresentados, sugerimos que o DD3, após ter sua expressão ativada pelo AR, estaria atuando como controlador da expressão de genes de resposta ao AR. A atuação do ncRNA DD3 na regulação desses genes poderia se dar de forma direta ou indireta, cabendo ressaltar que os dados até o momento disponíveis não são capazes de suportar essas hipóteses. Na possibilidade de ser uma ação direta, o DD3 atuaria como controlador na expressão destes transcritos por mecanismos onde ele possa diretamente induzir a degradação dos RNAs ou ainda alterar a estrutura da cromatina onde estariam localizadas as sequências promotoras da expressão desses genes, assim como descrito para ação de outros ncRNAs como o Xist e o HOTAIR (Mercer *et al.*, 2009). Outra possibilidade é que o ncRNA DD3 controle a expressão de outros genes, que por sua vez atuariam no controle direto da expressão dos genes de resposta ao AR. Mecanismos de regulação semelhantes a esses foram descritos para o miRNA miR-125b, capaz de controlar a expressão de genes que atuam na regulação direta da expressão de genes da via do AR (Shi *et al.*, 2007).

As investigações dos mecanismos de ação de ncRNAs podem colaborar para o entendimento de como os genes/RNAs contribuem na proliferação maligna de células de câncer de próstata independentes de androgênio. Uma vez que o DD3 poderia estar agindo em momento posterior à ativação do AR, esses genes cuja expressão estaria sendo controlada pelo DD3, assim como o próprio DD3, poderiam se tornar alvos alternativos para o câncer de próstata independente de androgênio. A alteração na expressão dos genes de resposta ao AR, sem passar pelos mecanismos de resistência apresentados no item (Câncer de Próstata Independente de Androgênio) da introdução deste trabalho, poderia constituir-se em uma estratégia para o controle da doença não responsiva ao tratamento anti-androgênico. Isto seria de extrema

importância, pois a grande causa de recidiva dos tumores metastáticos do CaP é o surgimento da resistência a estes tratamentos (Shaw *et al.*, 2008).

Paralelamente à estratégia de redução da expressão dos ncRNAs para os estudos funcionais dessas moléculas, outra abordagem amplamente utilizada para avaliar a função de ncRNAs consiste em superexpressar (Mattick, 2009) estes transcritos. Fu *et al.* (2006) superexpressou o ncRNA PCGEM-1, um transcrito específico do tecido prostático, e demonstrou que a superexpressão desse ncRNA em modelo de linhagem celular LNCaP resulta em inibição da apoptose destas células induzida por doxorubicina. Além disso, Petrovics *et al.*, (2004) demonstraram que a superexpressão do PCGEM1 em células LNCaP, bem como em células NIH3T3 (fibroblasto de camundongo) promove proliferação celular e aumento de formação de colônias de crescimento independente de ancoragem, sugerindo um papel biológico do PCGEM1 na regulação da proliferação dessas células e no controle do potencial metastático. Como base nesses dados, como abordagem alternativa para caracterizar o possível papel funcional do transcrito DD3 em células LNCaP, pensamos também em superexpressar o transcrito DD3 em linhagem celular de próstata.

Após tentativas por diversas estratégias para amplificar o fragmento completo do transcrito DD3 (tamanho de 2.553 pb), compreendido entre os exons 1 e 4b, não foi possível amplificar fragmentos de DNA correspondentes à transcritos maiores que 561 pb. Além disso, essas amplificações não eram sobrepostas. De acordo com Neves *et al.* (2007) (tese de doutorado), a análise da estrutura secundária do ncRNA do DD3 sugere a presença de regiões típicas de precursores de microRNAs ou pre-miRNAs, como os "hairpins", de ~70 nucleotídeos de comprimento. Outras características são também consideradas para que um "hairpin" de RNA seja determinado como uma região de pre-miRNA, como a presença de uma extensão de vários resíduos de pares de base além do produto final pré-miRNA (Lee *et al.*, 2003; Zeng e Cullen, 2003). Além disso, uma sequência de fita simples de RNA flanqueando a estrutura de ~70 nucleotídeos de "hairpin" é necessária para o processamento eficiente *in vitro* do pre-miRNA pela enzima Drosha (Zeng e Cullen, 2005). A presença dessas estruturas características de pre-miRNAs nas estruturas secundárias do transcrito DD3 foram identificadas por

ferramentas de bioinformática, reforçando a possibilidade de que esse transcrito possa ser um longo ncRNA precursor de miRNAs. Esses dados explicariam também o motivo de não conseguirmos detectar e amplificar o fragmento completo do transcrito, caso ele esteja sendo processado em fragmentos menores. No entanto, essas hipóteses devem ser testadas experimentalmente para demonstração do real processamento do transcrito do DD3 e geração de moléculas menores com ação na regulação da expressão gênica.

Outro importante aspecto a ser considerado no estudo da possível função do DD3 no CaP consiste na determinação de seus locais de expressão nos compartimentos celulares. A determinação da localização subcelular de ncRNAs é importante para a elucidação dos seus parceiros potenciais e das vias funcionais com os quais eles interagem. O núcleo de células de mamíferos consiste em uma organela altamente organizada com vários subcompartimentos sem membrana como corpos de Cajal, nucléolos, *paraspeckles*, os corpos PML e *speckles*, dentre outros (Spector 2001, 2006). Vários ncRNAs foram identificados e sua expressão foi associada com a localização subcelular específica (Mattick, 2009). O ncRNA MEN ϵ/β é um exemplo, que corresponde a um transcrito essencial para a composição estrutural e organizacional dos *paraspeckles* (compartimentos subcelulares que ocorrem no espaço intercromatínico) (Sunwoo *et al.*, 2009). Ainda, utilizando hibridização *in situ*, Mercer *et al.* (2007) identificaram 849 ncRNAs (dentre 1.328 ncRNAs examinados) que eram expressos em cérebro de camundongo adulto, e encontrou que a maioria desses transcritos apresentava expressão associada com regiões anatômicas, tipos celulares e compartimentos subcelulares específicos.

Tendo em vista a importância da determinação da localização subcelular para o entendimento e compreensão dos mecanismos de regulação de ncRNAs, avaliamos a expressão do DD3 em compartimentos celulares de células de CaP como complemento à caracterização dos possíveis papéis do ncRNA DD3 na biologia de células de câncer de próstata. Nossos resultados indicam que há um predomínio desse transcrito na fração correspondente à fração nuclear, composta também por corpos densos e vesículas, representando a aproximadamente 50% do total de expressão do DD3

presente nos extratos celulares totais. Observamos também que cerca de 25% da expressão celular total do DD3 é expresso em compartimentos referentes aos ribossomos e vesículas livres. Verhaegh *et al.* (2003) relatam que a maior proporção dos transcritos do DD3 está presente no compartimento nuclear. No entanto esses resultados não são muito claros, já que a metodologia utilizada para a avaliação da expressão do DD3 não foi mencionada. Por outro lado, Popa *et al.* (2007), através de hibridização *in situ* (ISH), foram capazes de detectar a expressão do DD3 e acessar sua localização celular principalmente no citoplasma de amostras de tecido de próstata. Esses dados são contraditórios aos dados publicados por Schalken *et al.* (2003), descritos acima.

Sabe-se que os ncRNAs podem participar intensamente de processamentos e regulação da expressão que ocorrem no núcleo das células, como a organização de domínios cromossômicos, o remodelamento de cromatina e a regulação da transcrição (ativação e repressão) (Costa, 2005; Barbarotto *et al.*, 2008). Da mesma forma que os ncRNAs de modo geral, os miRNAs estão envolvidos em regulação de expressão de genes no compartimento nuclear. Nossos resultados levantam a possibilidade de que o DD3 esteja sendo processado em fragmentos menores, típico do processamento de grandes ncRNAs e precursores de miRNAs e sendo expresso prioritariamente na fração nuclear. Estes dados sugerem, em adição aos demais dados que o transcrito DD3 poderia estar envolvido com mecanismos de regulação de transcrição de genes, desmetilação de DNA, estrutura dinâmica da cromatina, RNA de interferência, entre outras funções (Costa, 2007). Por outro lado, como demonstram os dados de Popa *et al.* (2007), se o DD3 se localiza principalmente na fração citoplasmática da célula, esse transcrito poderia estar atuando em modulação pós-transcricional, interagindo com mRNAs alvo, ou ainda no silenciamento de genes, como já tem sido descrito para alguns ncRNAs e miRNAs (Kenzelmann *et al.*, 2006) que se colocalizam nos corpos de processamento P-bodies (sítios de degradação de RNAs mensageiros que contém enzimas de decapeamento e exonucleases) (Newbury *et al.*, 2006). Diante desses resultados contraditórios e dos nossos dados, considerando ainda que a metodologia por nós utilizada apresenta limitações, pois as centrifugações realizadas não puderam ser

efetuadas em ultracentrífuga, se faz necessária a realização de outras abordagens de detecção para afirmar com mais segurança a respeito dos locais de expressão do transcrito DD3.

Os achados do presente estudo sugerem que o ncRNA DD3 parece estar envolvido na sobrevivência de células LNCaP e que a expressão desse transcrito é regulada pela via do AR e que o DD3, ao ter sua expressão ativada pelo AR, seria um regulador da expressão de genes de resposta à ativação do receptor de androgênio. O fato de não conseguirmos amplificar a sequência correspondente ao transcrito completo do DD3, em associação com evidências de que a estrutura secundária deste RNA apresenta similaridades com precursores de miRNAs, evidenciam que este transcrito possa exercer suas funções regulatórias após ser processado, em semelhança com as conhecidas moléculas de miRNAs sabidamente envolvidas na regulação de genes relacionados com tumorigênese e progressão tumoral (Kwak *et al.*, 2010). Os dados obtidos no presente estudo que evidenciam que este transcrito encontra-se expresso majoritariamente nas frações nucleares e em frações celulares contendo vesículas, correspondem à evidências adicionais do papel deste transcrito em mecanismos reguladores da expressão gênica. Esses resultados constituem a base de futuros projetos que permitirão averiguar quais são os alvos específicos do DD3 e seu mecanismo de ação na regulação da expressão dos mesmos.

De um modo geral, os achados deste projeto fornecem novas informações sobre funções e novas características de ncRNAs na biologia de células tumorais, em especial de células de CaP responsivas à ação de androgênios. Além disto, esses dados podem auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos moleculares controladores da progressão e sobrevivência de células de CaP associados à ncRNAs.

CONCLUSÕES

O transcrito DD3 parece estar envolvido no controle da sobrevivência de células de CaP, dados que são corroborados com os resultados que demonstram que sua expressão é positivamente regulada pelo DHT, um androgênio controlador da via do AR, a qual é sabidamente envolvida na sobrevivência de células de CaP.

Adicionalmente, é provável ainda que o DD3 seja um regulador direto ou indireto da regulação da expressão dos genes de resposta ao AR. Este último fato tem enorme importância, já que pode abrir possibilidades de melhor compreender as vias que regulam os genes de resposta ao AR, os quais podem se constituir em importantes alvos alternativos no controle do CaP refratário ao tratamento anti-androgênio.

O trabalho tem ainda como conclusão que o DD3 parece ser processado após ser transcrito, já que não foi possível amplificar fragmentos maiores que 561 pb. Isto condiz com RNAs não codificantes ou com precursores de transcritos que são rapidamente processados para exercerem suas funções.

Finalmente podemos concluir que é possível que o DD3 exerça sua função não somente na regulação gênica em nível nuclear, uma vez que sua expressão não foi encontrada somente em frações nucleares, mas também em frações correspondentes aos polissomos.

PERSPECTIVAS E PLANOS FUTUROS

Tendo em vista os resultados que este trabalho gerou, apresentamos como perspectivas e planos futuros:

- Caracterizar os mecanismos moleculares pelos quais o DD3 regula a expressão dos genes da via do AR e a sobrevivência de células de CaP.
- Investigar os mecanismos de morte celular induzida pela interferência do DD3 por siRNA;
- Investigar as principais vias de sinalização e/ou metabólicas alteradas mediante a interferência e superexpressão do DD3;
- Avaliar a ação direta ou indireta do DD3 sobre os genes-alvo da via do AR;
- Realizar fracionamentos celulares mais precisos para confirmar a localização do ncRNA DD3;
- Investigar e validar os mecanismos de processamento do DD3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate-Shen C, Shen MM.** Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development* **2011**, 14: 2410-2434.
- Akashi H, Matsumoto S, Taira K.** Gene discovery by ribozyme and siRNA libraries. *Nature Rev* **2005**, 6:413-422.
- Andriole G, Djavan B, Fleshner N, Schroder F.** The case of prostate cancer screening with prostate-specific antigen. *Eur Urol* **2004**, 5: 737–45.
- Angeloni D, ter Elst A, Wei MH, van der Veen AY, Braga EA, Klimov EA, et al.** Analysis of a new homozygous deletion in the tumor suppressor region at 3p12.3 reveals two novel intronic noncoding RNA genes. *Genes Chromosomes Cancer* **2006**, 45: 676–691.
- Ayesh S, Matouk I, Schneider T, Ohana P, Laster M, Al-Sharef W, De-Groot N, Hochberg A.** Possible physiological role of H19 RNA. *Molecular carcinogenesis* **2002**, 35: 63-74.
- Balk SP, Knudsen KE.** AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nuclear receptor signaling* **2008**, 6: e001.
- Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA.** MicroRNAs and cancer: Profile, profile, profile. *Int. J. Cancer* **2008**, 122: 969-977.
- Bishop FL, Rea A, Lewith H, Chan YK, Saville J, Prescott P, von Elm E, Lewith GT.** Complementary medicine use by men with prostate cancer: a systematic review of prevalence studies. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* **2011**, 14: 1-13.
- Borley N, Feneley MR.** Prostate cancer: diagnosis and staging. *Alesyan Journal of Andrology* **2009**, 11: 74-80.

- Bostwick DG, Gould VE, Qian J, Susani M, Marberger M.** Prostate cancer detected by uPM3: radical prostatectomy findings. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, **2006**, 19: 630-3.
- Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HFM, Schalken JA, Debruyne FMJ, Ru N, Isaacs WB.** DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research* **1999**, 59: 5975-5979.
- Cairns RA, Harris IS, Mak TW.** Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* **2011**, 11.
- Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS.** MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells, *Cancer Res* 2005, 65: 6029–6033.
- Clarke RA, Zhongming Z, Guo AY, Roper K, Teng L, Fang Z, Samaratunga H, Lavin MF, Gardiner RA.** New Genomic Structure for Prostate Cancer Specific Gene PCA3 within BMCC1: Implications for Prostate Cancer Detection and Progression. 2009, 4: e4995.
- Claverie JM.** Fewer genes, more noncoding RNA. *Science*. **2005**, 309: 1529–1530.
- Costa FF.** Non-coding RNAs: Meet thy masters. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **2010**, 32: 599-608.
- Costa FF.** Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene* **2005**, 357: 83-94.
- Costa FF.** Non-coding RNAs: Lost in translation? *Gene* **2007**, 386: 1-10.
- Culig Z, Bartsch G.** Androgen axis in prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry* **2006**, 99: 373-81.
- Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang T, Davidson B, Shih I, Zhang Y, Wood W, Becker KG, Morin PJ.** MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PloS one* **2008**, 3: 2436.

- Day JR, Jost M, Reynolds MA, Groskopf J, Rittenhouse H.** PCA3: From basic molecular science to the clinical lab. *Cancer Letters*. **2011**, 301: 1-6.
- de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, Swinkels DW, Schalken JA.** DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer research* **2002**, 62: 2695-8.
- De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG.** Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature reviews Cancer* **2007**, 7: 256-269.
- Dohle GR, Smit M, Weber RFA.** Androgens and male fertility. *World J Urol* **2003**, 21:341-345.
- Eliceiri GL.** The vertebrate E1/U17 small nucleolar ribonucleoprotein particle. *J. Cell. Biochem.* **2006**, 98: 486–495.
- Fan S, Meng Q, Auborn K, Carter T, Rosen EM.** BRCA1 and BRCA2 as molecular targets for phytochemicals indole-3-carbinol and genistein in breast and prostate cancer. *Br J Cancer*. **2006**, 94: 407-26.
- Feldman BJ, Feldman D.** Androgen-Independent Prostate Cancer. *October* **2001**, 1: 35-45
- Foley, R.** Molecular pathology of prostate cancer: the key to identifying new biomarkers of disease. *Endocrine Related Cancer* **2004**, 11: 477-488.
- Fu X, Ravindranath L, Tran N, Petrivucs G, Srivastava S.** Regulation of Apoptosis by a Prostate-Specific and Prostate Cancer-Associated Noncoding Gene, PCGEM. *DNA and cell biology*. **2006**, 25: 135-141.
- Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, Mâsse B, Piché L, Chypre C.** uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* **2004**, 64: 311–315.
- Ghadessy FJ, Liow SL, Yong EL.** Mutations in the promoter region of the androgen receptor gene are not common in males with idiopathic infertility. *Molecular Human Reproduction* **1999**, 5: 287-290.

- Gnanapragasam VJ, Robson CN, Neal DE, Leung HY.** Regulation of FGF8 expression by the androgen receptor in human prostate cancer. *Oncogene* **2002**, 21: 5069-80
- Goodrich JA, Kugel JF.** Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, 7: 612-616.
- Gosling JA, Harris PF, Humpherson JR, Whitmore I, Willan PLT.** Pelve e Períneo. *Anatomia Humana*. 5^a ed. São Paulo: Manole **1992**, 5.16-5.17.
- Groskopf J, Aubin SMJ, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, Brentano S, Mathis J, et al.** APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clinical chemistry*, **2006**. 52: 1089-95.
- Haas GP, Sakr WA.** Epidemiology of prostate cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* **1997**, 47: 273-87.
- Heemers H, Verrijdt G, Organe S, Claessens F, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV.** Identification of an Androgen Response Element in Intron 8 of the Sterol Regulatory Element-binding Protein Cleavage-activating Protein Gene Allowing Direct Regulation by the Androgen Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279: 30880–30887.
- Hessels D, Gunnewiek JMTK, van Oort I, Karthaus HFM, van Leenders GJL, van Balken B, Kiemeny LA, Witjes JA, Schalken JA.** DD3PCA3-based Molecular Urine Analysis of the Diagnosis of Prostate Cancer. *European Urology* **2003**, 44: 8-16.
- Hessels D, Rittenhouse H, Schalken JA.** Molecular diagnostics in prostate cancer, *EAU Update Series Series 3* **2005**, 200.
- Hopper AK.** Cellular dynamics of small RNAs. *Crit. Rev. Bio- chem. Mol. Biol.* **2006**, 41: 3–19.
- Hsing AW, Tsao L, Devesa SS.** International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* **2000**, 85: 60-67.

- Hughes C, Murphy A, Martin C, Sheils O, O'Leary J.** Molecular pathology of prostate cancer. *Journal of clinical pathology* **2005**, 7: 673-84.
- Hyroyoshi S, Akakura K, Igarashi T. et al,** Clinical usefulness of serum Anti-p53 antibodies for prostate cancer detection: A comparative study with prostate specific antigen parameters. *The Journal of Urology* 2004, 171: 182-186.
- Iacoangeli A, Lin Y, Morley EJ, Muslimov IA, Bianchi R, Reilly J, Weedon J, Diallo R, Böcker W, Tiedge H.** BC200 RNA in invasive and preinvasive breast cancer. *Carcinogenesis* **2004**, 25: 2125-33.
- Instituto Nacional do Câncer.** Câncer de Próstata. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>. Acesso em: 10 fevereiro 2011.
- Jariwala U, Prescott J, Jia L, Barski A, Pregizer S, Cogan JP, Arasheben A, Tilley WD, Scher HI, Gerald WL, Buchanan G, Coetzee G a, Frenkel B.** Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Molecular cancer* 2007, 6: 39.
- Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C.** MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* **2003**, 22: 8031-41
- Kang H, Tsai M, Chang C, Huang K.** Mechanisms and clinical relevance of androgens and androgen receptor actions. *Chang Chung Med J* **2003**, 26: 388-402
- Kawata H, Ishikura N, Watanabe M, Nishimoto A, Tsunenari T, Aoki Y.** Prolonged treatment with bicalutamide induces androgen receptor overexpression and androgen hypersensitivity. *The Prostate* **2010**, 70: 745-54
- Kenzelmann M, Rippe K, Mattick JS.** RNA: Networks & Imaging. *Molecular systems biology* **2006**, 2: 44

- Kung HJ, Evans CP.** Oncogenic activation of androgen receptor. *Urologic oncology* **2009**, 27: 48-52.
- Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y.** The microRNA pathway and cancer. *Cancer Science* **2010**.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN.** The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **2003**, 425: 415–419.
- Lewin B.** Genes VII. Tradução Henrique Ferreira. Porto Alegre: Artmed Editora **2001**, 627-629.
- Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ.** Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nature reviews Cancer* **2008**, 4: 268-78.
- Louro R, Nakaya HI, Amaral PP, Festa F, Sogayar MC, Silva AM, Verjovski-Almeida S, Reis EM.** Androgen responsive intronic non-coding RNAs. *BMC biology* **2007**, 5: 4
- Marangoni K, Neves AF, Cardoso AM, et al.** The endothelial nitric oxide synthase Glu-298-Asp polymorphism and its mRNA expression in the peripheral blood of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Cancer Detect Prev.* **2006**, 30: 7-13.
- Mattick, JS.** Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO reports.* **2001**, 2:986-81.
- Mattick JS.** The functional genomics of noncoding RNA. *Science.* **2005**, 309: 1527–1528.
- Mattick JS, Makunin IV.** Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, 15: R17–R29.
- Mattick JS.** The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS genetics* **2009**, 5: e1000459.
- Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS.** Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Review Genetics* **2009**, 10: 155-9.

- McNeal JE.** The zonal anatomy of the prostate. *Prostate* **1981**, 1: 35.
- Mendes Soares LM, Valcarcel J.** The expanding transcriptome: the genome as the 'Book of Sand'. *EMBO J.* **2006**, 25: 923–931.
- Melo KFS, Mendonça BB, Billibeck AEC, et al.,** Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos: Análise Clínica, Hormonal e Molecular de 33 Casos. *Arq Bras Endocrinol Metab* **2005**, 49: 87-97.
- Moore KL, Dalley AF.** Pelve e Períneo. *Anatomia orientada para a clínica.* 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan **2001**, 3: 294-376.
- Morris KV.** siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code. *Cell. Mol* **2005**. Life Sci. 62: 3057–3066.
- Mourtada-Maarabouni M, Hedge VL, Kirkham L, Farzaneh F, Williams GT.** Growth arrest in human T-cells is controlled by the non-coding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *Journal of cell science* **2008**, 121: 939-46
- Neves AF.** Variações Transcricionais dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA e implicações no diagnóstico molecular do câncer de próstata. Tese de doutorado **2007**.
- Newbury SF, Muhlmann O, Stoecklin G.** Turnover in the alps: an mRNA perspective. *EMBO* **2006**, 7: 143
- Ngan S, Stronach EA, Photiou A, Waxman J, Ali S, Buluwela L.** Microarray coupled to quantitative RT-PCR analysis of androgen-regulated genes in human LNCaP prostate cancer cells. *Oncogene* **2009**, 28: 2051-63.
- O’Gorman W, Kwek KY, Thomas B, Akoulitchev A.** Non-coding RNA in transcription initiation. *Biochem. Soc. Symp* **2006**. 73: 131–140.
- Orntein DK, Rayford VA, Fusaro VA, Conrads TP, Ross SJ, Hitt BA, Wiggins WW, Veenstra TD, Liotta LA, Petricoin EF.** III. Serum proteomic profiling can discriminate prostate cancer from benign prostates in men with total specific antigen levels between 2.5 and 25 ng/ml. *The Journal of Urology* **2004**, 172: 1.302-1.305.

- Panzitt K, Tschernatsch MMO, Guelly C, Moustafa T, Stradner M, Strohmaier HM, Buck CR, Denk H, Schroeder R, Trauner M, Zatloukal K.** Characterization of HULC, a novel gene with striking up-regulation in hepatocellular carcinoma, as noncoding RNA. *Gastroenterology* **2007**, 132: 330-42.
- Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J.** MicroRNAs: a developing story. *Genet. Dev.* **2005**, 15: 200–205.
- Penson D, Chan J.** Prostate Cancer. *The Journal of Urology* **2007**, 177: 2020-9.
- Petrovics G, Zhang W, Makarem M, Street JP, Connelly R, Sun L, Sesterhenn I a, Srikantan V, Moul JW, Srivastava S.** Elevated expression of PCGEM1, a prostate-specific gene with cell growth-promoting function, is associated with high-risk prostate cancer patients. *Oncogene* **2004**, 23: 605-11
- Perez DS, Hoage TR, Pritchett JR, Ducharme-Smith AL, Halling ML, Ganapathiraju SC, Streng PS, Smith DI.** Long, abundantly expressed non-coding transcripts are altered in cancer. *Hum Mol Genet.* **2008**, 5: 642-55.
- Pflueger D, Rickman DS, Sboner A, Perner S, LaFargue CJ, et al.,** N-myc Downstream Regulated Gene 1 (NDRG1) Is Fused to ERG in Prostate Cancer. *Neoplasia* **2009**, 11: 804–811
- Popa I, Fradet Y, Beaudry G, Hovington H, Beaudry G, Têtu B.** Identification of PCA3 (DD3) in prostatic carcinoma by in situ hybridization. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **2007**, 20: 1121-7.
- Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T.** *Cancer Res.* **2007**, 67: 6130-5.
- Presutti C, Rosati J, Vincenti S, Nasi S.** Non coding RNA and brain. *BMC Neurosci* **2006**, 7 (Suppl. 1): S5.
- Rae JM, Johnson MD, Cordero KE, Scheys JO, Larios JM, Gottardis MM, Pienta KJ, Lippman ME.** GREB1 is a Novel Androgen-Regulated Gene Required for Prostate Cancer Growth. *The Prostate* **2006**, 66: 886-894

- Rana TM.** Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2007**, 8: 23-36
- Ravasi T, Suzuki H, Pang KC, Katayama S, Furuno M, Okunishi R, Fukuda S, Ru K, Frith MC, Gongora MM, Grimmond SM, Hume DA, Hayashizaki Y, Mattick JS.** Experimental validation of the regulated expression of large numbers of noncoding RNAs from the mouse genome. *Genome Res.* **2006**, 16: 11–19
- Reis EM, Nakaya HI, Louro R, Canavez FC, Flatschart AV, Almeida GT, et al.** Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene* **2004**, 39: 6684-92.
- Reiter RE, de Kernion JB.** Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer. In: Walsh PC, Retik AB, Darracott Vaughan E, Wein AJ, editors. *Campbell's Urology*. 8th ed. Philadelphia, Pa: Saunders. **2002**, 3001- 3226.
- Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J, Schalken JA, Rittenhouse H.** Molecular markers for prostate cancer. *Cancer letters* 2007, 249: 5-13.
- Richter E, Srivastava S, Dobi A.** Androgen receptor and prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* **2007**, 10: 114-118.
- Rigas AC, Robson CN, Curtin NJ.** Therapeutic potential of CDK inhibitor NU2058 in androgen-independent prostate cancer. *Oncogene* **2007**, 26: 7611-9
- Rogers CG, YAN G, Zha S, Gonzalgo ML, Isaacs WB, Luo J, De Marzo AM, Nelson WG, Pavlovich CP.** Prostate cancer detection on uroanalysis for α -methylacy coenzyme a racemase protein. *The Journal of Urology* **2004**, 172: 1.501-1.503.
- Rohr HP, Bartsch G.** Human benign prostatic hyperplasia: a stromal disease? New perspectives by quantitative morphology. *Urology* **1980**, 16: 625-633.
- Schalken JA, Hessels D, Verhaegh G.** New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3PCA3), a highly prostate cancer?specific gene. *Urology*. **2003**, 64: 34-43.

- Schröder FH.** Progress in understanding androgen-independent prostate cancer (AIPC): a review of potential endocrine-mediated mechanisms. *European urology* **2008**, 53: 1129-37.
- Schubert S, Grunweller A, Erdmann VA, Kurreck J.** Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J. Mol. Biol.* **2005**, 348: 883–893.
- Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV.** Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction* **2003**, 9: 437-448.
- Shamovsky I, Nudler E.** Gene control by large noncoding RNAs. *Sci. STKE.* **2006**, 2006: pe40.
- Shaw G, Price AM, Ktori E, Bisson I, Purkis PE, McFaul S, Oliver RTD, Prowse DM.** Hedgehog signalling in androgen independent prostate cancer. *European urology* **2008**, 54: 1333-43.
- Shi XB, Xue L, Yang J, Ma AH, Zhao J, et al.** An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *PNAS* **2007**, 104: 19983-8.
- Smith DR.** *Urologia Geral*. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan **1979**, 505.
- Srikantan V, Zou Z, Petrovics G, et al.** PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97: 12216–12221.
- Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL.** MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res.* **2009** 3: 347-59.
- Spector DL.** Nuclear domains. *J Cell Sci* **2001**, 114: 2891–2893.
- Spector DL.** SnapShot: Cellular bodies. *Cell* **2006**, 127: 1071.

- Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y, Ijiri K, Akimitsu N.** MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Lett.* **2010** 22: 4575-80.
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H et al.** Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* **2004**, 64: 3753–3756.
- Tsang WP, Wong TWL, Cheung AHH, Co CNN, Kwok TT.** Induction of drug resistance and transformation in human cancer cells by the noncoding RNA CUDR. *RNA (New York, N.Y.)* **2007**, 13: 890-8
- Vakkala M, Pääkkö P, Soini Y.** Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *Br J Cancer.* **1999**, 4: 592-9.
- van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS.** Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate* **2003**, 57: 205-25
- Van De Graaff, KM.** Sistema genital masculino. In: *Anatomia humana*. 6^a ed. São Paulo: Manole **2003**, 20: 697-723.
- Van Gils MPMQ, Cornel EB, Hessels D, Peelen WP, Witjes JA, Mulders PFA, Rittenhouse HG, Schalken JA.** Molecular PCA3 Diagnostics on Prostatic Fluid. *Clinical Chemistry* **2007**, 887.
- Verhaegh GW, van Bokhoven A, Smit F, Schalken JA, Bussemakers MJ.** Isolation and Characterization of the Promoter of the Human Prostate Cancer-specific *DD3* Gene. *The Journal Of Biological Chemistry* **2000**, 275: 37496–37503.
- Wagenlehner FME, Elkahwaji JE, Algaba F, Bjerklund-Johansen T, Naber KG, Hartung R, Weidner W.** The role of inflammation and infection in the pathogenesis of prostate carcinoma. *BJU international* **2007**, 100: 733-7.

- Wang H, Iacoangeli A, Popp S, Muslimov IA, Imataka H, Sonenberg N, Lomakin IB, Tiedge H.** Dendritic BC1 RNA: functional role in regulation of translation initiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2002**, 22: 10232-41
- Wang J, Zhang J, Zheng H, Li J, Liu D, Li H, et al.** Mouse transcriptome: neutral evolution of 'non-coding' complementary DNAs. *Nature* **2004**, 431.
- Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL.** Long noncoding RNAs : functional surprises from the RNA world. *Genes & Development* **2009**, 1494-1504.
- Wiygul J, Babayan RK.** Watchful waiting in benign prostatic hyperplasia. *Current opinion in urology* **2009**, 19: 3-6.
- Xu XF, Zhou SW, Zhang X, Ye ZQ, Zhang JH, Ma X, Zheng T, Li HZ.** Prostate androgen-regulated gene: a novel potential target for androgen-independent prostate cancer therapy. *Asian J Androl* **2006**, 4: 455–462.
- Yamamoto T, Ito K, Ohi M, Kubota Y, Suzuki K, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H.** Diagnostic significance of digital rectal examination and transrectal ultrasonography in men with prostate-specific antigen levels of 4 NG/ML or less. *Urology* **2001**, 58: 994-998.
- Yazgan O, Krebs JE.** Noncoding but nonexpendable: transcriptional regulation by large noncoding RNA in eukaryotes. *Database* **2007**, 496: 484-496.
- Yoshihisa T.** tRNA, new aspects in intracellular dynamics. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, 63: 1813–1818.
- Zeng Y, Cullen BR.** Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* **2003**, 9: 112–123.
- Zeng Y, Cullen BR.** Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J Biol Chem* **2005**, 280: 27595–27603.