### ADAUTO ALMEIDA NETO

# ABORDAGEM QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO GENE *WFDC1* E SUA ISOFORMA DELTA 3

## *QUANTITATIVE APPROACH OF THE EXPRESSION OF WFDC1 GENE AND ITS ISOFORM DELTA 3*

Campinas, 2014

ii

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

### ADAUTO ALMEIDA NETO

## ABORDAGEM QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO GENE WFDC1 E SUA ISOFORMA DELTA 3

Orientador: Dr. Hernandes Faustino de Carvalho Coorientador: Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

## QUANTITATIVE APPROACH OF THE EXPRESSION OF WFDC1 GENE AND ITS ISOFORM DELTA 3

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor<sup>-</sup> em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Celular.

Doctorate thesis presented to the State University of Campinas in fulfillment of the requirements for the degree of Doctor on Cellular and Structural Biology Postgraduate Programme, in the Biology Institute, in the area of Cellular Biology.

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno *Adauto Almeida Neto* e orientado pelo Dr. Hernandes Faustino de Carvalho.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2014

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca do Instituto de Biologia Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

AL64a	Almeida Neto, Adauto, 1977- Abordagem quantitativa da expressão do gene <i>WFDC1</i> e sua isoforma delta 3 / Adauto Almeida Neto. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.
	Orientador: Hernandes Faustino de Carvalho. Coorientador: Paulo Roberto Eleutério de Souza. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	<ol> <li>Próstata. 2. Hiperplasia prostática benigna. 3. Neoplasias da próstata. 4.</li> <li>Processamento alternativo. I. Carvalho, Hernandes Faustino de,1965 II. Souza,</li> <li>Paulo Roberto Eleutério de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de</li> <li>Biologia. IV. Título.</li> </ol>

#### Informações para Biblioteca Digital

Г

Título em outro idioma: Quantitative approach of the expression of WFDC1 gene and its isoform delta 3 Palavras-chave em inglês: Prostate Benign prostatic hyperplasia Prostatic neoplasms Alternative splicing Área de concentração: Biologia Celular Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural Banca examinadora: Hernandes Faustino de Carvalho [Orientador] Alexandre Bruni Cardoso Eliane Antonioli Jaqueline de Carvalho Rinaldi Juliete Aparecida Francisco da Silva Data de defesa: 31-07-2014 Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 31 de julho de 2014.

#### **BANCA EXAMINADORA**

Dr. Hernandes Faustino de Carvalho (Orientador)

Dr. Alexandre Bruni Cardoso

Dra. Eliane Antonioli

Dra. Jaqueline de Carvalho Rinaldi

Dra. Juliete Aparecida Fransciso da Silva

Dra. Taize Machado Augusto

Dra. Leticia Fröhlich Archangelo

Dra. Mariana Lazarini

Assinatura tusti Assinatura

Assinatura

natura Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

#### Abstract

The prostate gland is intimately related with reproductive and urinary functions, commonly disturbed by a series of diseases. Besides reducing the quality of life, they consist in serious life risk particularly to the aging men. Dynamic interactions between the epithelium and stroma in the gland regulate various aspects of development, function and pathologies. The WFDC1 gene is expressed by smooth muscle cells in the prostate stroma and its product ps20 was shown to control epithelial cell behavior, extracellular matrix organization and angiogenesis. It is supposed to function as a serine protease inhibitor, as other members of its family do. Two transcripts are produced as a result of alternative splicing. The first (WFDC1) retains all exons and the second (Delta 3) lacks the exon 3. In this work, we investigated the quantitative relationship among these two splicing variants, using qRT-PCR (Taqman) probing the junctions between exons 2-3 and 2-4, in benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCA) samples from tissue banks. The expression of the MYH11 gene was used to estimate the content of smooth muscle cells in the samples. The results demonstrate that the samples could be divided in two groups with low or high expression of MYH11, the first corresponding to the lower quartile of expression values). WFDC1 and MYH11 expression were correlated in the BPH samples. Delta 3 expression was independent of both WFDC1 and from WFDC1. The ratio between the variants WFDC1 and Delta 3 varied exponentially in five orders of magnitude. The the ratio between the two variants also varied exponentially, with BPH and PCA samples arranged in discrete and intercalated subgroups. The distribution of populations with different expression levels preserved the ratios 10:1, 1:1 and 1:3. Either variant was absent in only a few samples. In conclusion, the expression of WFDC1 and it WFDC1 variant correlates with but is not conditioned to the differentiation of smooth muscle cells, while Delta 3 is completely independent and is positively correlated with PCA grade (as assessed by the summed Gleason score). Unknown factors independent of age, BPH or PCA incidence are likely influencing Delta 3 expression.

**Keywords:** Prostate, Benign prostatic hyperplasia, Prostatic neoplasms, alternative *splicing*.

#### Resumo

A próstata é alvo de afecções severas que comprometem a função urinária, a qualidade de vida e que consistem em risco de vida aos indivíduos do sexo masculino, particularmente com o avançar da idade. Interações dinâmicas entre o epitélio prostático e o estroma, regulam vários aspectos do desenvolvimento, da função e das patologias prostáticas. O gene WFDC1 é expresso pelas células musculares lisas do estroma prostático normal e tem função na regulação do comportamento do epitélio, na organização da matriz extracelular e na regulação da angiogênese. Dois transcritos principais são oriundos de *splicing* alternativo do transcrito primário: um com todos os éxons (WFDC1) e outro sem o éxon 3 (Delta 3). Neste trabalho, investigamos as relações quantitativas entre estas duas variantes, com emprego de qRT-PCR (Taqman) e sondas para as junções dos éxons 2-3 e 2-4, em amostras de hiperplasia prostática benigna (BPH) e de câncer de próstata (PCA) provenientes de bancos de tecidos. A expressão do gene marcador MYH11 foi utilizada como estimativa do conteúdo de células musculares lisas nas amostras. Os resultados demonstraram que as amostras puderam ser dividas em dois grupos com expressão diferencial da MYH11(um com baixa expressão e outro com alta miosina, sendo o primeiro correspondente ao quartil inferior da distribuição dos valores de expressão). Foi demonstrada correlação entre a expressão de WFDC1 e MYH11 em BPH, mas não em PCA, enquanto não houve correlação entre Delta 3 e WFDC1 e nem com MYH11. O conteúdo de Delta 3 variou em cinco ordens de magnitude em comparação ao de WFDC1. A razão entre as duas variantes apresentou variação exponencial, distribuições discretas e intercaladas das amostras de BPH e de PCA, que se distribuíram em populações que preservaram as relações 10:1; 1:1 e 1:3. Poucas amostras estiveram livres de cada uma destas variantes. Em conclusão, a expressão do gene WFDC1 e de sua variante WFDC1 correlaciona-se com a diferenciação das células musculares lisas, mas não está condicionada a ela, enquanto a expressão de Delta 3 é completamente independente deste parâmetro e tem correlação positiva com o progressão do PCA, quando o sistema de classificação de Gleason (Gleason 1 + Gleason 2) foi considerado. Adicionalmente, fatores independentes da idade, incidência de BPH ou PCA, são

mais influentes na determinação da quantidade total e da proporção entre as duas variantes.

**Palavras-chave:** Próstata, Hiperplasia prostática benigna, Neoplasias da próstata, processamento alternativo.

Abstract	vii
Resumo	ix
Dedicatória	xiii
Agradecimentos	xv
Lista de Figuras	. xvii
Lista de tabelas	xix
Lista de abreviaturas	xxi
1. INTRODUÇÃO	23
1.1 As células musculares lisas (CML) prostáticas	25
1.2 A Hiperplasia Prostática Benigna (BPH)	28
1.2.1 Papel dos andrógenos prostáticos diidrotestosterona e testosterona	31
1.2.2 A terapia medicamentosa	32
1.3 O câncer de próstata (PCA)	33
1.4 A família WAP	37
1.5 Inflamação, BPH e expressão do gene WFDC1	40
1.6 Splicing, splicing alternativo e fatores de splicing	41
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 Amostras	46
4.1.1 Processamento das amostras; extração de RNA e transcrição reversa.	46
4.1.2 Protocolo de extração de RNA	47
4.1.3 Protocolo de purificação	47
4.1.4 Síntese de cDNA	48
4.1.5 Sondas de qPCR	48
4.1.6 Reação de qPCR	50
4.1.7 Quantificação da MYH11	50

#### Sumário

4.1.8 Análise das expressões por qRT-PCR	50
4.2 Análises exploratórias e estatísticas	51
4.3 Aspectos éticos	51
5. RESULTADOS	53
5.1. Características das amostras utilizadas	53
5.2 Resultados de qRT-PCR	54
5.3 Correlações entre os valores de expressão de MYH11, WFDC1	e Delta358
6. DISCUSSÃO	71
7. CONCLUSÕES	77
ANEXO 1	85
ANEXO 2	87
ANEXO 3	88
ANEXO 4	89
ANEXO 5	90

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus queridos pais, Adauto Filho e Maria das Graças, responsáveis pela minha existência em todos os aspectos; à minha amada esposa, Emanuelle Malvim Almeida, pelo apoio e amor irrestritos; aos meus filhos, Heitor Malvim Almeida e Gabriella Malvim Almeida, pela motivação em viver. Por vocês, acordo sempre com vontade de vencer.

#### Agradecimentos

À Profa. Dra. Iscia T L Cendes, do Departamento de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo auxílio na delineação dos experimentos e por sugerir a análise da expressão da forma Delta 3.

À Profa. Dra. Kátia R. M. Leite, Prof. Dr. Miguel Srougi e Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes, da Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo, pelo fornecimento de amostras de tecido humano e dos dados clínicos a elas relacionados.

Ao Prof. Dr. **Hernandes Faustino de Carvalho**, orientador, por todo o acompanhamento e disponibilidade, tanto nos ensinamentos e discussões, quanto pelos diversos recursos e investimentos feitos, a fim de que o trabalho fosse concluído.

À Dra. Ana Carolina Deckmann, pelo auxílio no delineamento experimental, processamento de amostras e realização das quantificações utilizando qRT-PCR.

Ao Biólogo **Guilherme Oliveira Barbosa**, pelas inúmeras discussões dos aspectos quantitativos e sugestões de abordagens estatísticas.

Àos pós-doutorandos **Danilo Damas, Silvia Pimentel e Taíze Augusto** pelas técnicas aprendidas e por todo o empenho dispensado na construção dessa tese. Aos demais alunos do laboraório do Prof. Hernandes, **Rafaela Ribeiro**, **Danilo Ferrucci**, **Juliete Francisco e Umar Nishan** pelas diversas discussões e por toda a amizade dispensada ao longo desses quatro anos.

À Biologa **Sabrina Reis**, pela organização das amostras e dados clínicos, assim como pela remessa do material.

Ao Prof. Dr. Carlos Lenz César, pelo auxílio na construção da MST.

Ao prof. Dr. **Paulo Roberto Eleutério de Souza**, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pela disponibilidade e generosidade dispensadas na fase inicial do projeto de doutorado.

À Profa. Dra. Laurecir Gomes e Profa. Dra. Maria Tereza Carpaxo Muniz, responsáveis pelo Programa Dinter (Doutorado Interinstitucional entre UNICAMP e UPE), à Profa. Dra. Luciana Lourenço Bolsoni, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, aos docentes do programa e a Sra. Liliam Alves Senne-Panagio, minha querida amiga, pelos esforços para implantação e oferecimento de disciplinas, suporte constante e outros ensinamentos.

A todos os amigos feitos na UNICAMP e professores que acompanharam indiretamente todas as etapas vividas na construção da tese.

Aos meus pais, Adauto Filho e Maria das Graças, minha esposa amada, Emanuelle Malvim, meus filhos queridos, Heitor Malvim Almeida e Gabriella Malvim Almeida, pelo empenho de sempre, companheirismo, credibilidade e motivação. Por eles, acordarei sempre com desejo de vitória.

#### Lista de Figuras

- Figura 1. Esquema ilustrativo das zonas prostáticas
- Figura 2. Marcadores fenotípicos da diferenciação celular
- Figura 3. Desenho esquemático dos fenótipos das CML encontrados na próstata humana
- **Figura 4.** Prevalência idade-específica da BPH e do PCA em próstatas humanas necropsiadas
- Figura 5. Aspectos da organização glandular correspondentes aos diferentes graus de Gleason
- Figura 6. Localização e motif do gene WFDC1
- Figura 7. Esquema ilustrativo das variantes de splicing do gene WFDC1
- **Figura 8.** Esquema demonstrando a remoção dos introns no splicing e a possibilidade de splicing alternativo
- Figura 9. Ensaio das sondas para a reação da qRT-PCR
- Figura 10. Distribuição das idades dos doadores no momento da cirurgia
- Figura 11. Variação no conteúdo relativo (calculada como fold-change 2<sup>-</sup> <sup>ΔΔCt</sup>) de Delta 3, utilizando-se como referência a variante WFDC1
- Figura 12. Variação no conteúdo relativo (calculada como fold-change) de WFDC1 (A) e de Delta 3 (B), utilizando como referência o MYH11
- Figura 13. Distribuição dos valores de fold-change obtidos para MYH11 (A), WFDC1 (B) e Delta 3 (C) (10 classes distribuídas entre o menor e o maior valor)
- Figura 14. Distribuição dos logaritmos dos fold-change de WFDC1 e Delta 3 contra os valores de MYH11 (eixos do gráfico)

- Figura 15. Distribuição dos logaritmos dos valores de fold-change de WDFC1
  (A) e de Delta 3 (B), em relação à distribuição dos valores obtidos para MYH11
- Figura 16. MST obtida a partir das distâncias calculadas entre cada amostra a partir da correlação calculada com base na expressão de MYH11, WFDC1 e Delta 3
- Figura 17. Clusterização dos resultados de qRT-PCR para MYH11, WFDC1 e Delta 3, utilizando-se o software MeV
- Figura 18. Análise estatística dos valores de expressão de MYH11, WFDC1 e Delta 3, nas amostras de PCA e de BPH clusterizadas de acordo com a Figura 17
- Figura 19. Curvas de regressão obtidas para os valores de *fold-change* de WFDC1, Delta 3 e MYH11 (A) e variações dos dados reais ao redor delas para todas as amostras (B-D)
- Figura 20. Variação dos valores de fold-change obtidos para WFDC1 (A), Delta 3 (B) e *MYH11* (C), considerando as amostras de BPH (azuis) e de PCA (vermelhas)
- Figura 21. Oscilação nos valores de *fold-change* obtidos para as variante Delta 3 (tendo como referência o a expressão de WFDC1) em amostras de BPH (azuis) e PCA (vermelhas)
- Figura 22. Distribuição de probabilidades cumulativas para os valores de fold-change obtidos para Delta 3, utilizando a expressão do WFDC1 como referencia
- **Figura 23.** Distribuição de probabilidade cumulativa utilizando 1-F(x)

#### Lista de tabelas

Tabela 1. Cálculos de fold change

- Tabela 2. Correlação entre os valores dos logaritmos de *fold-change* obtidos para o gene MYH11 e as variantes de WFDC1 (WFDC1 e Delta 3) para todo o conjunto de amostras e para as amostras de PCA e BPH.
- Tabela 3. Valores das correlações obtidas entre a expressão de WFDC1, Delta
  3 e de MYH11 com a idade (em amostras de PCA e de BPH) e com os valores de PSA pré-operatório, estadiamento de Gleason e volume prostático (para as amostras de PCA).

#### Lista de abreviaturas

AR	Do inglês, "Androgen receptor", receptor de andrógenos
BPH	Do inglês, "Benign Prostate Hyperplasia", Hiperplasia Prostática Benigna
СК	Citoqueratina
CML	Célula muscular lisa (inclui o plural)
Delta3	Variante de splicing que não possui o éxon 3 do gene WFDC1
DHT	Do inglês, "Dihydrotestosterone", diidrotestosterona
FGF10	Do inglês, "Fibroblast growth factor 10", Fator de crescimento de fibroblastos 10
LUTS	Do inglês, <i>Lower urinary tract symptoms</i> , Sintomas do trato urinário inferior
MST	Do inglês, "Minimum spanning tree", Árvore de expansão mínima
MYH11	Gene da cadeia pesada da miosina específica de músculo liso
PCA	Do inglês, "Prostate Cancer", câncer de próstata
PSA	Do inglês, "Prostate specific antigen", Antígeno prostático específico
qRT-PCR	Do inglês, quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction, Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa semi-quantitativa
SM-MHC	Do inglês, "Smooth muscle myosin heavy chain", Cadeia pesada da miosina de músculo liso
TGFβ	Do inglês, " <i>Transforming growth factor beta</i> ", Fator de crescimento transformante, tipo beta
UGM	Do inglês,"Urogenital sinus mesenchyme", Mesênquima do seio urogenital
WFDC1	Variante de splicing que preserva os 7 éxons do gene WFDC1
WFDC1	Do inglês, "WAP four disulfide core domain 1 gene", gene da família WAP (expressam proteínas ácidas do soro que apresentam um domínio com quatro pontes dissulfeto)

#### 1. INTRODUÇÃO

A próstata é uma glândula acessória do aparelho reprodutor masculino, cuja principal função é secretar componentes constituintes do sêmen, proporcionando um ambiente adequado à sobrevivência dos espermatozóides no trato genital feminino, fornecendo elementos que estimulam sua mobilidade ao lado de moléculas com propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras. A próstata também faz parte do sistema imune de mucosas, com função preponderante baseada na secreção de imunoglobulinas secretórias (IgA e IgG). (Schauer and Rowley, 2011)

O epitélio secretor prostático possui um arranjo de ácinos inserido no estroma fibromuscular composto por diversos tipos celulares, representado primariamente por células musculares lisas. Enquanto o conhecimento sobre a importância da próstata na função reprodutiva ainda carece de aprofundamento, o interesse no órgão decorre principalmente em função das doenças relacionadas ao órgão, com nítido viés na direção dos aspectos relacionados a infecções, inflamações e neoplasias benignas e malignas (Farnsworth, 1999; Schauer and Rowley, 2011).

Dentre os aspectos estruturais da próstata normal, destacam-se três populações fenotipicamente distintas de células epiteliais: 1) as células epiteliais luminais secretoras que expressam o antígeno prostático específico (PSA), o receptor de andrógeno (AR) e as citoqueratinas (CKs) 8 e 18, além do marcador CD57; 2) as células basais, que expressam citoqueratinas de alta massa molecular (CK14) e o marcador CD44 e 3) as células neuroendócrinas responsáveis pela secreção de serotonina, componentes das cromograninas, calcitonina, peptídeos semelhantes à gonadotropina coriônica e ao hormônio estimulante da tireóide, peptídeos liberadores de bombesina/gastrina, somatostatina e a proteína relacionada ao hormônio da paratireóide. Além do epitélio, a próstata apresenta um rico estroma subjacente. Verifica-se a presença de dois tipos celulares predominantes no estroma prostático: as células musculares lisas (CML), responsáveis pela ação contrátil e pela interconversão do hormônio masculinizante testosterona em diidrotestosterona (DHT); e os fibroblastos. Ambos os tipos celulares estão envolvidos com a produção/manutenção da matriz extracelular prostática (Alonso-Magdalena et

23

al., 2009; Schauer and Rowley, 2011). Tem sido sugerido que as células estromais influenciam o crescimento epitelial prostático não somente durante o desenvolvimento, mas também nas neoplasias, diferindo em diferentes estágios da progressão e no estabelecimento tumoral. Além disso, parte da neovascularização do câncer, por exemplo, envolve reações do estroma prostático. As células musculares lisas produzem o fator de crescimento de fibroblastos 10 (FGF10), dentre outros, que medeia interações autócrinas e parácrinas da glândula (Taboga et al., 2008; Thomson et al., 2008)

A estrutura normal de uma próstata adulta é composta por um epitélio glandular e por um compartimento fibromuscular estromal. Ambos renovamse lentamente mediante níveis balanceados de proliferação celular e de morte. McNeal (1981) desenvolveu o conceito da zona anatômica da próstata que compreende a base atual de descrição do processo neoplásico do órgão, descrevendo que sua porção glandular é composta por uma larga zona periférica (cortical) envolvendo uma porção menor central. Estas duas regiões compõem aproximadamente 95% da próstata. O restante da glândula prostática é formada por uma região de transição e pelas glândulas periuretrais. A periferia e a zona de transição são distintas pelas suas relações anatômicas e pela composição dos elementos do estroma, embora ambas apresentem uma estrutura acinar secretora similar estabelecida pela origem comum a partir do seio urogenital. As glândulas derivadas da zona central são morfologicamente distintas, possivelmente devido à sua origem embrionária no ducto de Wolff. Entre 60 e 70% dos cânceres prostáticos ocorrem na zona periférica e de 10 a 20%, na zona de transição. Apenas de 5 a 10% dos tumores malignos originam-se da zona central. As hiperplasias prostáticas benignas desenvolvem-se principalmente a partir do estroma periuretral e das glândulas da zona de transição (Farnsworth, 1999; Macoska, 2011; Montorsi and Mercadante, 2013; Schauer and Rowley, 2011; Schulz et al., 2003; Thomson et al., 2008).



Figura 1. Esquema ilustrativo das zonas prostáticas. As regiões anatômicas da próstata indicadas pelas cores revelam as áreas mais acometidas pelo PCA (zona periférica) e pela BPH (zona de transição). (Schauer and Rowley, 2011).

#### 1.1 As células musculares lisas (CML) prostáticas

As células musculares lisas (CML) da próstata são os principais componentes celulares do estroma prostático e, além de ocuparem um grande volume e serem responsáveis pela contração da glândula durante a ejaculação, desempenham funções importantes, criando um ambiente propício para a manutenção do epitélio, tanto em situações normais como patológicas. Já foi sugerido que as CML participem do desenvolvimento prostático pela regulação da interação do mesênquima com o epitélio durante o processo de crescimento do órgão (Thomson et al., 2008; Thomson et al., 2002).

As CML representam 22% do volume total da próstata humana (Shapiro et al., 1992), predominando ao redor dos ductos, onde se encontram em íntimo contato com a lâmina basal das células epiteliais. A porção ventral do mesênquima do seio urogenital (UGM) é uma área condensada, separada do epitélio uretral por uma camada de CML diferenciadas (Thomson et al., 2002). Esta camada de CML é menos desenvolvida em machos, permitindo que os brotamentos prostáticos passem através da camada descontínua de CML para entrar no UGM, onde ocorrem os subsequentes crescimento e ramificação ductal (Thomson et al., 2002). Nas fêmeas, a camada de CML é contínua, o UGM fica isolado da uretra, o que torna raro o aparecimento de brotamentos epiteliais prostáticos. Sendo assim, as CML podem agir como um regulador da elongação ductal prostática e da ramificação do epitélio. Andrógenos inibem parcialmente o desenvolvimento da camada muscular lisa periuretral, modulam a diferenciação e induzem ao dimorfismo sexual desta camada muscular lisa (Thomson et al., 2002).

As CML expressam alguns genes importantes na manutenção da morfofisiologia prostática. Dentre eles, o gene *WFDC1*, que expressa uma proteína estromal denominada ps20, que participa do controle da proliferação das células prostáticas e na angiogênese, com possível papel na etiopatogenia da BPH e do câncer prostático (Ruijter et al., 1999; Schulz et al., 2003; Watson et al., 2004). Outro aspecto importante está relacionado aos diferentes fenótipos que as células musculares lisas apresentam e que parecem definir aspectos patofisiológicos das doenças prostáticas. Alguns marcadores moleculares, como a alfa-actina de células musculares ( $\alpha$ SMA) e a vimentina confirmam a diferenciação observada no estroma prostático (Figura 2). Essa observação confirma que a diferenciação das CML pode resultar na perda do controle estromal sobre sua interação com o epitélio prostático, tendo como consequência a carcinogênese (Ressler and Rowley, 2011).



**Figura 2. Marcadores fenotípicos da diferenciação celular**. Miofibroblastos e fibroblastos são proliferativos, enquanto as CML são quiescentes. Dentre os principais marcadores das CML, encontram-se a calponina e a miosina de cadeia pesada (MHC) (Tuxhorn et al., 2001).

Os fenótipos das células musculares lisas foram detalhados por Taboga et al. (2008) (Figura 2), a partir da análise ultraestrutural destas células em amostras de carcinoma prostático. As CML são fusiformes com presença de núcleo alongado e central e cromatina condensada associada à porção mais interna do envelope nuclear. O fenótipo atrófico é caracterizado pela diminuição da relação núcleo-citoplasma (RNP), indicando perda de componentes de contração. O núcleo celular é compacto e o espaço perinuclear é mais largo nas áreas de retração nuclear. A membrana basal é geralmente mais fina do que em células normais. O fenótipo ativado corresponde às células com um crescente aumento das organelas envolvidas em síntese protéica e/ou revelam extensiva invaginação da superfície celular, possui resíduos de placas densas e desorganização do citoesqueleto nas áreas periféricas. A associação com os componentes fibrilares da matriz extracelular sugere desempenhar um papel ativo na reorganização do estroma. O fenótipo degenerado mostra um núcleo condensado e colapsado com espaço perinuclear expandido e grande redução do citoplasma. A membrana basal é quase completamente perdida, além de apresentar pouquíssimas organelas celulares (Taboga et al., 2008).

As CML devem originar esses fenótipos diretamente. Entretanto, uma transição da forma ativada para a atrófica e, a partir daí, para um estado degenerado é também possível. Células desdiferenciadas não poderiam ser distintas de fibroblastos em nível ultraestrutural, no entanto, esse fenótipo deve existir (Taboga et al., 2008).



Figura 3. Desenho esquemático dos fenótipos das CML encontrados na próstata humana. As setas indicam as possíveis direções das mudanças fenotípicas, enquanto as setas tracejadas indicam conversões indiretas (Reproduzido de Taboga et al., 2008).

A morfofisiologia das CML é regulada pela ação hormonal, uma das explicações para a variação fenotípica observada. Hong et al. (2004) concluíram que o estrógeno estimula o crescimento das células estromais da próstata e aumenta o número de marcadores expressos pelas CML. Além disso, os autores também sugeriram que a diferenciação das CML se daria em resposta a mediadores importantes do crescimento celular, como o TGF $\beta$ . Diante disso, quimicamente pode-se perceber que existem vários marcadores que participam da variação fenotípica das CML e que esse comportamento celular deve explicar diversos aspectos relacionados à patogênese da hiperplasia e do câncer (Hong et al., 2004; Peehl and Sellers, 1997).

#### 1.2 A Hiperplasia Prostática Benigna (BPH)

A BPH representa uma das doenças prostáticas mais freqüentes em homens, acentuando-se de forma marcante com a idade. Os sintomas irritativos iniciais do trato urinário inferior (LUTS) fortemente relacionados à gênese da hiperplasia prostática, possivelmente estejam associados ao alargamento benigno da próstata e sua conseqüente obstrução, resultando em alterações significativas das atividades cotidianas relativas ao ato de urinar, bem como modificando funções associadas à espermatogênese e outras funções prostáticas ligadas à ejaculação (Fibbi et al., 2010; Sausville and Naslund, 2010; Wu et al., 2012). Clinicamente, a hiperplasia é reportada em 8% dos homens com idade entre 40 e 50 anos, avançando para 90% dos homens com idades entre 60 e 80 anos (Alhasan et al., 2008). Montorsi e Mercadante (2013) relatam a importância da LUTS no diagnóstico da hiperplasia. Foi estimado, que a incidência de LUTS de moderada a severa é de 30 a 40% em homens acima dos 50 anos de idade, além do que tem se confirmado que a incidência e prevalência de LUTS aumenta linearmente com a idade. Diante disso, LUTS estão associados não somente com a redução da assistência médica relacionada à qualidade de vida em homens na terceira idade, mas também com o aumento dos custos de assistência de prevenção das doenças prostáticas necessários para serem evitadas maiores complicações (Djavan et al., 2005; 2010; Kapoor, 2012; Sausville and Naslund, 2010);

A BPH é uma doença que se define pelo aumento irregular do número de células e pela mudança arquitetural que esse aumento provoca. Muitos registros da literatura afirmam que a hiperplasia é uma doença de caráter inflamatório, mesmo que sua etiopatogenia ainda se mantenha obscura (Schauer and Rowley, 2011). Histologicamente, a BPH é caracterizada por uma progressiva hiperplasia das células secretoras (epiteliais) e/ou estromais que circundam a uretra, com excessivo crescimento nodular localizado nos pontos onde os ductos ejaculatórios se inserem na região de transição prostática ou zona periuretral. Em relação às células, as alterações incluem mudanças nas células basais, aumento de massa estromal (em particular, o aumento das células musculares lisas), depósito de elementos de matriz (remodelação das fibras de colágeno, por exemplo), perda da elasticidade tecidual, aumento de infiltrado mononuclear ao redor dos ductos secretores, hipertrofia de ácinos e aumento de corpos amiláceos (degeneração hialínica) e calcificações nas regiões luminais (Untergasser et al., 2005). Tuxhorn et al. relataram a importância de se estudar o estroma reativo (Tuxhorn et al., 2001; 2002), caracterizado pelas modificação no estado de diferenciação das células musculares lisas em resposta ao comportamento epitelial modificado e com reflexo na relação estroma-epitélio. Além disso, as mudanças fenotípicas observadas entre as células musculares lisas, principais responsáveis pela manutenção da morfofisiologia prostática, têm revelado indícios importantes na compreensão dos mecanismos bioquímicos associados à patogênese da BPH (Schauer and Rowley, 2011).

Uma das principais discussões com relação às doenças prostáticas envolve a possível relação entre BPH e o câncer prostático. Uma revisão feita por Alcaraz et al. (2009) abordou que mais da metade da população masculina com idade acima dos 50 anos apresenta evidência histológica da presença de BPH, enquanto o câncer prostático está entre os mais comuns cânceres que

29

afetam homens, de acordo com dados registrados recentemente. A compreensão da etiologia das condições de ambos é crucial na tentativa de reduzir a crescente morbimortalidade no mundo. Evidências científicas foram identificadas que afirmam existir alguns aspectos associados entre a BPH e o câncer. Dados avaliados atualmente confirmam o papel dos andrógenos no desenvolvimento de ambas as condições patológicas. Todavia, a inflamação é possivelmente o fator majoritário da patogênese prostática, comum às duas doenças. Além disso, pesquisas sugerem que a síndrome metabólica tem desempenhado um papel importante no desenvolvimento da BPH e do câncer, enquanto um número crescente de fatores genéticos tem sido implicado nas afecções prostáticas (Wu et al., 2012; Xia et al., 2012; Yap and Emberton, 2010).

É importante salientar que a BPH e o câncer apresentam similaridades em diversos aspectos, no entanto, anatomicamente a BPH afeta principalmente a zona de transição prostática que ocupa apenas 5% a 10% do volume total do órgão, enquanto o câncer é mais freqüente e bastante restrito à região periférica, que ocupa entre 70% e 90% do volume da glândula. Aspectos epidemiológicos também são semelhantes, no entanto as evidências apontam que uma doença não poderia gerar a outra (Alcaraz, 2008; Yap et al, 2010; Xia et al, 2012; Wu et al, 2012).

Bostwick et al. (1992) revelaram algumas particularidades da BPH e do câncer de próstata (PCA), como mostrado na Figura 3. Embora ambas as doenças apresentem crescente aumento na incidência e prevalência em idades mais avançadas, não há evidências de relação causal entre elas. Estudos em próstatas necropsiadas permitiram a compreensão do crescimento da prevalência da BPH a partir da década de 40 nos homens. Já o câncer prostático ocorre de fato cerca de 20 anos mais tarde (Bostwick et al., 1992).



Figura 4. Prevalência idade-específica da BPH e do PCA em próstatas humanas necropsiadas. São apresentados os percentuais de órgãos afetados por classes de idade (dados de Bostwick et al., 1992).

#### 1.2.1 Papel dos andrógenos prostáticos diidrotestosterona e testosterona

Dihidrotestosterona (DHT) é cerca de 5 a 10 vezes mais potente que a testosterona e desempenha importante papel na progressão da BPH, mediando efeitos androgênicos na hiperplasia. Na próstata, ao contrário do plasma, os níveis de DHT são altos e maiores que os da testosterona. Além disso, os níveis de DHT intraprostático elevam-se com o avanço da idade dos homens, em detrimento de um declínio na circulação da testosterona, sugerindo, portanto, seu papel exacerbado na BPH (Djavan et al., 2010).

A testosterona é convertida em DHT em reação catalisada pelas isoenzimas 5-alfa redutase (5AR) 1 e 2. A enzima do tipo 2 é encontrada predominantemente na próstata e em outros tecidos genitais. A do tipo 1 tem distribuição mais ampla, sendo encontrado na pele, no fígado e também na próstata. Tecidos com elevadas concentrações dessas enzimas, como o tecido prostático, são, portanto, os principais sítios de conversão da testosterona em DHT. Decorre que esta conversão amplifica os efeitos da testosterona circulante, em função da formação local de um andrógeno mais potente. Dado o papel central da DHT como o mais potente andrógeno, homens com deficiência da 5AR tipo 2 tem próstatas pequenas e rudimentares e não desenvolvem BPH quando adultos (Cunha et al., 2004; Djavan et al., 2010).

#### 1.2.2 A terapia medicamentosa

Os antagonistas do adrenorreceptor tipo alfa 1 (ou  $\alpha$ -bloqueadores ou bloqueadores alfa-adrenérgicos) são importantes no tratamento da BPH. Um melhor entendimento no funcionamento dos receptores para o hormônio adrenérgico que está envolvido na doença prostática tem levado ao aumento do uso dos  $\alpha$ -bloqueadores no tratamento, substituindo a cirurgia de remoção prostática por fármacoterapia. Os  $\alpha$ -bloqueadores avaliados apresentam efeito similar sobre a hiperplasia prostática, melhorando os sintomas em aproximadamente 35% dos casos nos quais a razão máxima de fluxo urinário passou de 1,8 para 2,5 mL/s. Diante disso, conclui-se que os  $\alpha$ -bloqueadores têm eficácia comparável na melhoria dos sintomas da doença prostática (Djavan et al., 2010).

O principal hormônio andrógeno circulante, a testosterona, é convertido em diidrotestosterona (DHT) através da ação da enzima 5-alfa redutase (5 $\alpha$ R). Além de ser necessário para o crescimento e o funcionamento normais da próstata, a DHT também se encontra envolvida no desenvolvimento da BPH e na iniciação e progressão do câncer prostático. Dois inibidores de 5 $\alpha$ R, a finasterida e a dutasterida, têm sido estudadas extensivamente em triagens clínicas de pacientes com BPH. Finasterida é um inibidor da 5 $\alpha$ R tipo 2, enquanto a dutasterida é um inibidor duplo da 5 $\alpha$ R, inibindo ambas as isoenzimas. Os compostos relacionados têm se mostrado inibidores séricos do DHT, embora a dutasterida seja mais eficiente. Em grande escala, triagens clínicas em homens com sintomas de BPH, inibidores de 5AR reduzem o volume prostático, melhoram os sintomas, reduzem os riscos de retenção urinária aguda e ajudam no decréscimo da aplicação de cirurgias relacionadas à BPH. Esses medicamentos abaixam os níveis séricos de antígeno prostático específico (PSA) em aproximadamente 50% em 6 meses, assim como reduzem o volume prostático em 25% em 2 anos de tratamento. Os inibidores da enzima 5AR também apresentam capacidade de reduzir os riscos relativos ao câncer de próstata como benefício secundário da resposta ao tratamento para a BPH (Djavan et al., 2010; Tanguay et al., 2009).

#### 1.3 O câncer de próstata (PCA)

Segundo o INCA (2014), 68.800 novos casos de câncer de próstata serão diagnosticados no Brasil em 2014 e 13.129 mortes causadas por esta doença aconteceram em 2011. Este câncer é a segunda neoplasia mais freqüente em homens, atrás somente do câncer de pele não-melanoma. O câncer de próstata tem inúmeras características peculiares. Uma delas é a dependência de andrógenos. Indivíduos pré-adolescentes castrados (eunucos, *castrati*) nunca desenvolveram PCA.

O PCA consiste-se em um crescente problema de saúde pública no mundo ocidental, além de ser um dos líderes de acometimento em homens de idade avançada, cuja incidência aumenta principalmente na septuagésima década da vida. Acredita-se que, em parte, o aumento da incidência seja causado pelo envelhecimento da população. No entanto, com o acréscimo das estatísticas, tem-se verificado que, possivelmente, a não detecção preventiva do antígeno específico da próstata (PSA), com posterior tratamento eficaz, tem contribuído para o avanço de casos no mundo (Schulz et al., 2003).

A etiologia do câncer de próstata é insuficientemente entendida, uma vez que existem vários fatores presentes na carcinogênese prostática. Fatores genéticos, aspectos relacionados a hábitos de nutrição, relações com vírus, idade, dentre outros (Schulz et al., 2003; Ruijter et al., 1999), caracterizam a doença com aspectos multifatoriais. Atualmente, um crescente número de diagnósticos de PCA é detectado através da elevação sérica dos níveis de antígeno específico prostático (PSA). Antes da investigação rotineira do PSA, muitos casos eram identificados pela sintomatologia clínica ou pelo exame digital do reto (DRE) conhecido simplesmente como toque retal. Os casos diagnosticados de câncer, com características específicas da neoplasia maligna do órgão, como, por exemplo, a metástase, os níveis de PSA assumem valores bem maiores que 10 ng/mL. Contrariando estes dados, muitos casos atuais são detectados através de valores localizados entre 2,5-10 ng/mL e com confirmação histopatológica da morfologia por biópsia (Schulz et al., 2003).

Os tumores na próstata apresentam um microambiente que incluem modificações nas células estromais (fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas, nervos, vasos sanguíneos), nas células epiteliais e na persistência de células mononucleares e polimorfonucleares (PMNs) presentes na inflamação (Franco et al., 2011). Diante de tamanha complexidade morfofisiológica, existem diversos achados na literatura que buscam compreender os mecanismos celulares e moleculares que explicam a carcinogênese prostática. Epidemiologicamente, os homens de idades avançadas temem pela determinação do diagnóstico de doenças prostáticas, principalmente em função da necessidade do toque retal para anatomicamente melhor descrever o volume da glândula e, em função disso, aspectos relacionados ao grau de instrução, nacionalidade e naturalidade, hábitos, dentre outros, são importantes no desenvolvimento do câncer (Palapattu et al., 2009; Grivas et al., 2012; Brawley, 2012).

O PCA acomete predominantemente homens idosos, razão pela qual se atribui crescimento lento. Entretanto, têm sido encontrados casos em indivíduos jovens. Em um caso particular, um indivíduo de 34 anos foi diagnosticado com câncer de próstata metastático, cujos sintomas assemelharam-se ao linfoma (Ahn et al., 1997), provavelmente devido a outra característica comum deste tipo de tumor que é a metastatização para os linfonodos e para medula óssea. O bloqueio ou a privação androgênica fazem parte do tratamento do câncer avançado, sendo utilizadas drogas que bloqueiam a síntese de testosterona, sua conversão em diidrotestosterona ou sua interação com o receptor de andrógenos.

Outra característica peculiar do câncer de próstata é a comum recorrência após privação androgênica na forma do câncer de próstata resistente à castração. O receptor de andrógeno parece ter papel fundamental nesta progressão, por apresentar mutações, amplificações ou ativação independente de ligantes, todas com contribuição provável para a

34

sobrevivência das células epiteliais em baixas concentrações de andrógenos circulantes (Feldman and Feldman, 2001; Sharma et al., 2013).

Além destes mecanismos baseados no receptor de andrógeno, têm sido reportadas várias formas de alterações cromossômicas, incluindo a cromoplexia (Baca et al., 2013; Tomlins et al., 2007), contribuindo para a iniciação, crescimento/progressão tumoral, metástase e independência hormonal.

Por muito tempo tem sido postulado existir uma relação íntima entre o estroma e o epitélio prostáticos, tanto durante o desenvolvimento quanto na progressão tumoral (Cunha et al., 2004). Este conceito foi bem explorado por pesquisadores interessados na proteína ps20, expressa por células musculares lisas e com capacidade de regular o crescimento de células epiteliais (detalhamento a seguir).

Outro aspecto importante é a progressão tumoral, que foi descrita como um processo contínuo de desestruturação da organização epitelial por Gleason (1977) e que caracteriza parte do sistema de classificação da progressão tumoral. A Figura 4 mostra alguns aspectos histológicos da organização prostática no PCA.

#### Masson's Trichrome



Figura 5. Aspectos da organização glandular correspondentes aos diferentes graus de Gleason. Na próstata normal (A), observa-se a existência de ácinos desenvolvidos e organização em feixes das células musculares lisas. No Gleason 1 (B), nota-se a propagação de estruturas glandulares pequenas, ao lado daquelas de aspecto normal. No Gleason 2 (C), existe aparente desdiferenciação das células epiteliais, que são predominantemente achatadas, e das células musculares lisas adjacentes. No Gleason (D), existe 3 uma predominância de estruturas epiteliais diminutas e com células pouco diferenciadas. No Gleason 4 (E), a estrutura glandular é praticamente perdida. com alguma infiltração estromal. No Gleason 5 (F), há células tumorais predominância de indiferenciadas. sem organização permeiam glandular e que os componentes estromais. SMC=células muscualres lisas (Reproduzido de Taboga et al, 2008).
## 1.4 A família WAP

A proteína ps20 (*WAP-type four-disulfide core domain 1*; ps20 proteína do estroma prostático, 20 kDa), foi identificada em 1987 como um componente do mesênquima urogenital de rato capaz de inibir o crescimento de células NBT-II de carcinoma de bexiga *in vitro* (Rowley e Tindall, 1987). Em experimentos semelhantes, foi identificado que os mesmos componentes inibiram o crescimento da linhagem celular (PC3) derivada de carcinoma prostático (Rowley et al., 1995). A ps20 e contém um domínio WAP (proteína acídica do soro e um núcleo com 4 ligações dissulfeto entre 8 resíduos de cisteína (Bouchard et al., 2006).

As proteínas WAP mais estudadas são a *elafin* e antileucoproteinase – dois inibidores de serina proteases com atividade antimicrobiana e antiinflamatória. Além destas, podem ser incluídas a anosmina 1, eppin e WFDC2, além da WFDC1/ps20. Muitos dos genes que codificam as proteínas WAP estão agrupados no cromossomo 20, exceto o *WFDC1*, que se localiza no cromossomo 16. O modelo funcional da família *WAP* é, portanto, atuar como inibidor de serina-proteases, já conhecido para outros membros desta mesma família (Bouchard et al., 2006; Larsen et al., 2000; Watson et al., 2004). A análise imunohistoquímica revelou que a ps20 é encontrada largamente no tecido muscular liso de vários tecidos, tendo como possíveis alvos os fatores de crescimento, de regulação e de remodelação da matriz extracelular e da progressão de carcinomas, atuando, inclusive, como possível supressor tumoral (Larsen et al., 2000; Larsen et al., 1998; Watson et al., 2004).

O gene WFDC1, que codifica a ps20, encontra-se mapeado, como anteriormente citado, no cromossomo 16 (16q24), cuja região do genoma é associada a um número de cópias anormais, perda de heterozigosidade e associação com o câncer prostático (Elo et al., 1997), assim como em outros tipos tumorais, incluindo o câncer de pulmão e carcinoma hepatocelular (Larsen et al., 2000). Utilizando-se arranjo de hibridização comparativa de alta resolução, recentemente foi identificado um número de tumores prostáticos com deleção do *locus* que contém o WFDC1 (Larsen et al., 2000).

37



Figura 6. Localização e motif do gene WFDC1. O gene WFDC1 localiza-se no cromossomo 16 e apresenta um motif de 50 aminoácidos que estabelecem 4 pontes dissulfeto entre os 8 resíduos de cisteína. (Bouchard, 2006).

Outras pesquisas têm mostrado que a expressão de ps20 é significantemente variável em câncer de próstata. McAlhany e colaboradores (McAlhany et al., 2003) mostraram que a progressão do câncer prostático é caracterizada pela perda da expressão no estroma da ps20 com eventual ou ocasional ganho da expressão da ps20 no epitélio prostático, sugerindo, portanto, uma progressão de um fenótipo tumoral do epitélio mais agressivo, além da transição epitélio-mesênquima observada. Essa característica da ps20 a transforma em um potencial marcador biológico da determinação da progressão e do desenvolvimento da doença. Tuxhorn e colaboradores (Tuxhorn et al., 2002) fizeram um estudo com implantes xenográficos do câncer de próstata e revelaram que a ps20 também contribui na angiogênese e tumorigênese, além de atuar na estabilização da matriz extracelular e da neovascularização tumoral (angiogênese), possivelmente associada a sua função de inibidor de protease, assim como também deve estar associada à mudança da interação célula-matriz, resultando em crescente migração celular.

Watson e colaboradores (2004) desenvolveram uma análise molecular do gene *WFDC1* em 21 pacientes com câncer de próstata e utilizaram 5 linhagens celulares diferentes de câncer prostático, no intuito de investigar mutações relacionadas ao desenvolvimento neoplásico e alterações na expressão gênica. Os autores concluem que as mutações investigadas não se correlacionam com o câncer, que a expressão do gene *WFDC1* tem relação exponencial com o conteúdo de músculo liso presente nas amostras e determinado por histologia. Concluíram também que tamanho amostral foi insuficiente para determinar correlação entre a expressão de *WFDC1* e o PCA, embora aparecesse reduzida. Além disto, os autores descrevem a existência de um transcrito em algumas das amostras, cujo seqüenciamento demonstrou não possuir a região codificada pelo éxon 3. Se traduzido, este RNAm produziria uma deleção de 28 aminoácidos na proteína final.



Figura 7. Esquema ilustrativo das variantes de *splicing* do gene *WFDC1*. O *splicing* alternativo gerando um transcrito com o éxon 3 deletado foi descrito por Watson et al. (2004), cuja proteína expressa teria 28 aminoácidos a menos.

### 1.5 Inflamação, BPH e expressão do gene WFDC1

Após atingir a idade adulta, a próstata se insere numa fase de manutenção, cuja ocorrência da proliferação das células prostáticas diariamente se dá numa razão de 1 a 2%, contrabalanceada por uma razão semelhante de morte programada ou apoptose. A perda desse equilíbrio deve também contribuir para a BPH. Alguns estudos têm destacado que possíveis alterações nos diferentes estágios do crescimento prostático contribuem para a etiopatogênese da BPH. Algumas pesquisas *in vitro* dão suporte ao papel central da inflamação na gênese da hiperplasia. Os nódulos estromais de BPH apresentam infiltrados de linfócitos B, linfócitos T e macrófagos. Essas células se acumulam em volta dos ductos epiteliais e interrompem a secreção luminal (Birbach et al., 2011).

A sinalização entre as células basais do epitélio luminal, na renovação das células luminais e manutenção da atividade secretora, é mediada por andrógenos. As células basais são consideradas as células-tronco do epitélio prostático. Diante disso, alterações nos mecanismos de controle hormonal, ou simplesmente alguma indução microbiana ou programação genética, altera essencialmente o comportamento celular prostático, gerando a defesa imediata através da inflamação. A secreção de peptídeos passa a ser modificada, fatores de crescimento como o TGF $\beta$ , um polipeptídeo multifuncional regulador da proliferação celular e da diferenciação, é modificada, assim como várias vias inflamatórias passam a ser ativadas, como a via da cicloxigenase 2 (COX-2), mediadores químicos (como IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF $\alpha$ , prostaglandinas) são produzidos, resultando em um microambiente altamente reativo e característico da BPH (Birbach et al., 2011; McAlhany et al., 2003; Schauer et al., 2008; Schauer and Rowley, 2011; Tuxhorn et al., 2001; Tuxhorn et al., 2002; Untergasser et al., 2005).

Neste contexto de infecção e inflamação, mais recentemente foi demonstrado que a expressão do gene *WFDC1* se dá em linfócitos CD4 e que seus níveis estão relacionados com a susceptibilidade à infecção pelo HIV (Alvarez et al., 2008; Alvarez et al., 2011). Os autores demonstraram existir uma variação intrínseca na expressão de *WFDC1* em linfócitos CD4 positivos e que a subpopulação com ps20 alta apresenta maior infectividade, que foi bloqueada por anticorpos contra a proteína.

## 1.6 Splicing, splicing alternativo e fatores de splicing

Embora a transcrição seja o fator primário na expressão gênica, outros eventos estão envolvidos na manifestação final de um gene. Dentre eles, o processamento do transcrito primário, que inclui a remoção dos íntrons (segmentos do gene que são removidos e, portanto, ausentes do mRNA). Intrínseco a este processo está o *splicing* alternativo, no qual diferentes combinações dos éxons são encontradas no mRNA e que, fundamentalmente, formam proteínas diferentes (Figura 6). O mecanismo de *splicing* resulta numa ampliação do repertório das proteínas expressas por um determinado genoma (Braunschweig et al., 2013; Licatalosi and Darnell, 2010; Nilsen and Graveley, 2010).

Embora seja conhecido que diferentes variantes de *splicing* de muitos genes são expressas em diferentes tecidos, ao longo do desenvolvimento e no câncer, os mecanismos que selecionam as diferentes formas de *splicing* em cada situação são pouco conhecidos.



**Figura 8. Esquema demonstrando a remoção dos introns no** *splicing* **e a possibilidade de** *splicing* **alternativo** (Fonte: en.wikipedia.org/wiki/Alternative splicing).

Em particular, as alterações nas variantes de *splicing* e os complexos moleculares envolvidos na maquinaria de *splicing* têm sido particularmente interessantes no câncer, pela possibilidade de constituírem-se em alvos terapêuticos (Bonomi et al., 2013; Venables, 2004). Embora exista tendência de se classificar os fatores de *splicing* em dois tipos principais, SR (*serinearginine-rich*) e hnRNP (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein*), com funções antagônicas em promover ou silenciar o *splicing*, respectivamente (Bonomi et al., 2013), a regulação individual ou conjunta dos genes que sofrem *splicing* em determinado tipo celular em determinada condição ainda não foi esclarecida.

## 2. JUSTIFICATIVA

O estudo crescente da próstata tem se revelado cientificamente e clinicamente um essencial aliado no conhecimento, na prevenção e na abordagem de diversas patologias que afetam os homens na idade adulta. Cada vez mais, percebe-se que a biologia da glândula prostática apresenta mecanismos complexos de regulação e um funcionamento peculiar nas diferentes fases da vida do homem, uma vez que sintomas relacionados ao trato urogenital se tornam evidentes e comprometedores tanto da função reprodutiva como da qualidade de vida dos indivíduos do sexo masculino e de seus familiares.

As células musculares lisas (CML) prostáticas representam o principal tipo celular do estroma da glândula e apresentam diversas funções relacionadas ao controle da proliferação celular, manutenção da sinalização entre epitélio e estroma e reparo tecidual.

A hiperplasia prostática benigna (BPH) revela-se quase que inexorável na fisiologia dos homens a partir dos 40 anos e, diante disso, o crescimento do volume do órgão pode trazer consigo sinais clínicos mais graves. Além disto, a próstata está sujeita ao desenvolvimento do câncer prostático (PCA), doença que apresenta preocupante incidência e uma elevada mortandade. É verdade que o conhecimento em níveis celulares e moleculares permite explorar melhor e detalhadamente a próstata, fazendo com que se desenvolvam instrumentos terapêuticos satisfatórios e mais eficazes.

O gene *WFDC1* expresso pelas CML prostáticas parece ser um bom indicador de elementos regulatórios subjacentes, inerentes à biologia prostática e com possíveis implicações no desenvolvimento da BPH e do PCA. Sua expressão preponderante no estroma, particularmente em situações não patológicas, parece ser uma característica relevante, dissociada das diversas alterações cromossômicas e gênicas particulares das células epiteliais, ao mesmo tempo em que parece suficientemente sensível a flutuações, que permitam revelar aspectos estruturais (como polimorfismos), funcionais e regulatórios gerais (como expressão gênica e *splicing*). A presente pesquisa é importante, pois visa focar um componente genético específico (WFDC1) expresso pelas CML que pode atuar tanto regulador da proliferação das células epiteliais prostáticas na BPH e no câncer, quanto ser afetado pelas modificações epiteliais, além de ser modulado por componentes inflamatórios e, possivelmente, afetar a organização da matriz extracelular. Apesar da complexidade de fatores, a existência de duas variantes de *splicing* que podem ser quantificadas simultaneamente, pode tornar o WFDC1 um elemento relevante para o monitoramento de fatores regulatórios que colaboram na susceptibilidade e progressão das doenças prostáticas.

## **3. OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Quantificar a expressão do gene *WFDC1* em amostras de tecido humano obtidos em cirurgias para o tratamento de BPH e de PCA, com foco na relação entre as variantes WFDC1 e Delta 3, correspondentes aos produtos de *splicing* que preserva todos os éxons e a que carece do éxon 3, respectivamente.

## **Objetivos específicos**

- 1. Por qRT-PCR, quantificar os níveis dos transcritos correspondentes às variantes WFDC1 e Delta 3, utilizando-se qRT-PCR.
- Verificar a associação entre a expressão das variantes WFDC1 e Delta 3 e a expressão do gene MYH11 que codifica a cadeia pesada de miosina de músculo liso, aqui empregado como estimativa do conteúdo de células musculares lisas em cada amostra individual.
- Utilizar estatística exploratória e ferramentas de análises de dados e de agrupamento (*clustering*), para identificar determinantes quantitativos da expressão do gene WFDC1 na próstata humana e sua possível associação com a BPH e com o PCA.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1 Amostras

As características clínicas das 52 amostras utilizadas neste trabalho (32 de PCA e 20 de BPH) são apresentadas no Anexo I e foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Kátia R. M. Leite, pelo Prof. Dr. Miguel Srougi e pelo Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes da Faculdade de Medicina da USP-SP e depositadas em banco de tecidos do Hospital Sírio-Libanês e da própria FM-USP. Todos os espécimes foram examinados pelo mesmo patologista (KRML).

#### 4.1.1 Processamento das amostras; extração de RNA e transcrição reversa

Previamente à extração de RNA, buscou-se definir uma plataforma que permitisse o processamento simultâneo do maior número possível de amostras, de forma a reduzir variações técnicas nos experimentos.

Assim, foram conduzidos testes preliminares utilizando três plataformas: (i) FastPrep (MP Biomedicals); (ii) Tissuelyzer (Qiagen) e (iii) BeadBeater (Biospec Products). Nos três casos, o tecido foi transferido para um tubo contendo combinações de microesferas e/ou flocos de sílica de tamanhos variados (a depender de cada plataforma) e, após adição do tampão de extração, a maceração ocorre por ação mecânica durante ciclos de agitação vigorosa.

Foi utilizado o método de extração baseado em fenol e guanidino isotiocianato, TRIzol (Life Technologies). Todo o procedimento foi conduzido seguindo instruções do fabricante.

Após as extrações, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria e, quando as razões de absorbância a 260:280 e 260:230 nm foram inferiores a 1.70 (indicando contaminação por proteínas ou compostos fenólicos), as amostras foram purificadas através de reprecipitação com etanol. Os valores de concentração e pureza de cada amostra estão listados no Anexo 2.

46

## 4.1.2 Protocolo de extração de RNA

Todas as amostras foram manipuladas no gelo e os reagentes utilizados mantidos a uma temperatura  $< 4^{\circ}$ C. O volume de Trizol utilizado seguiu a proporção de 1 mL para cada 10 mg de tecido.

Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 12000 xg por 10 minutos para sedimentar os restos celulares e as microesferas e/ou flocos de sílica usados para a maceração. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e deixado a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir a completa dissociação das nucleoproteínas. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio, incubando-se novamente a temperatura ambiente por 3 minutos e centrifugando-se por 20 minutos a 12000 xg.

Após esta etapa, separam-se as fases orgânica e aquosa, esta última contendo as moléculas de RNA. A fase aquosa foi transferida para novo microtubo e adicionaram-se 500  $\mu$ L de álcool isopropílico para precipitar o RNA, o qual se concentra no fundo do tubo após centrifugação a 12000 xg por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA lavado com 1 mL de etanol 75%. As amostras foram novamente centrifugadas, desta vez a 7500 xg durante 5 minutos, descartando-se em seguida o sobrenadante. A operação foi repetida, adicionando-se novamente 1 mL de etanol 75% e centrifugando-se a 7500 xg durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, as amostras foram secadas brevemente ao ar, para eliminar quaisquer vestígios de etanol. Finalmente, o RNA foi ressuspendido em água ultrapura e, após eluição, analisado por espectrofotometria (ver resultados no Anexo 2). Este material foi armazenado para as reações posteriores a  $-80^{\circ}$ C.

#### 4.1.3 Protocolo de purificação

As amostras cujas leituras espectrofotométricas indicassem algum grau de contaminação (A260/280 ou A260/230 < 1.7) foram purificadas através de precipitação e lavagem por etanol, seguindo o protocolo abaixo:

Ao volume de RNA, adicionaram-se 1/10 volumes de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol 96%. As amostras foram agitadas por inversão e mantidas à temperatura ambiente por 5-10 minutos, antes de serem centrifugadas a 12000 xg durante 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, adicionado de 1 mL etanol 75%. Após centrifugação a 7 500 xg durante 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, a centrifugação foi repetida e os tubos secos à temperatura ambiente para eliminar quaisquer vestígos de etanol, antes de serem ressuspensas em água ultrapura e analisada por espectrofotometria.

### 4.1.4 Síntese de cDNA

As biópsias que atenderam os critérios de qualidade do RNA (razões A260/280 e A260/230 > 1.70) foram utilizadas para síntese de cDNA, a partir de 2  $\mu$ g de RNA total, com o emprego do kit Superscript III Supermix (Life Technologies). Os procedimentos seguiram as instruções do fabricante. Os cDNA foi armazenado a -20°C até momento do uso.

### 4.1.5 Sondas de qPCR

Para estudo da variante Delta 3 foi utilizada a seqüência gi|578829107 depositada no GenBank (ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/578829107). Foi empregado o *software* PrimerQuest (idtdna.com/primerquest/Home/Index) para desenho do ensaio e a síntese foi realizada pela Life Technologies, proprietária da marca TaqMan.

As demais sondas TaqMan utilizadas foram beta glucuronidase (*GUSB*, cat. Hs00939627\_m1), TATA binding protein (*TBP*, cat. Hs0042762\_m1), *GAPDH* (car. Hs99999905\_m1) e beta2-microglobulina (*B2M*, cat. Hs00984230\_m1), testados como controles endógenos, e *MYH11* (cat. Hs00224610\_m1) e *WFDC1* (cat. Hs00221849\_m1).

Em todos os casos, as sondas consistem de um par de *primers* não marcados e uma sonda central contendo o fluoróforo FAM na extremidade 5' e um *quencher* não fluorescente na extremidade 3'. Esta sonda central hibridiza com o DNA-alvo em um sítio específico e, durante a amplificação, sofre degradação devido à atividade exonucleásica da DNA polimerase. Consequentemente, a separação do *quencher* e do fluoróforo resulta no aumento da intensidade da fluorescência pela reação. Assim, durante o processo de amplificação, a emissão de fluorescência é aumentada exponencialmente.

Como esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a amplificação da sequência-alvo é estabelecida na presença da sonda central, a ausência de um sítio específico para ela elimina a possibilidade de emissão de sinal, apesar de ainda poder haver amplificação pelos *primers* não marcados. Este é o caso do ensaio para Delta 3. Apesar dos *primers* não marcados não distinguirem o transcrito principal do transcrito alternativo (pois as suas se localizam nos éxons 2 e 4, respectivamente, os quais existem em ambas as espécies de transcritos), a existência de uma sonda central que reconhece o sítio criado na junção entre os éxons 2 e 4 garante a especificidade da sonda, uma vez que esta junção só existe no transcrito alternativo (a ausência do éxon 3 estabelece a junção 2-4).



**Figura 9. Ensaio das sondas para a reação da qRT-PCR.** A sonda para as variantes WFDC1 e Delta 3 ligam-se na junção entre os éxons 4 e 5 e, portanto, para ambas ocorrerá emissão de fluorescência (ensaio WFDC1 e Delta 3 A e B). Já a sonda desenhada para a variante Delta 3 liga-se na junção entre os éxons 2 e 4 e, portanto, apenas Delta 3 emite fluorescência (ensaio Delta 3 A e B). Isso explica o porquê da expressão Delta 3 sempre corresponde a uma fração da expressão de WFDC1.

## 4.1.6 Reação de qPCR

As reações de qPCR utilizaram 20 ng cDNA como molde num volume final de 10  $\mu$ L, utilizando o sistema TaqMan Universal PCR Mastermix. A quantidade de cDNA foi estimada a partir da quantidade de RNA total utilizado na reação de transcrição reversa.

## 4.1.7 Quantificação da MYH11

Watson et al. (2004) mostraram existir correlação exponencial positiva entre a expressão do gene *WFDC1* e o conteúdo de células musculares lisas identificadas nas amostras por eles utilizadas. Para estimar este provável viés em nossas análises, utilizamos a expressão do gene MYH11 que codifica a cadeia pesada de miosina de músculo liso, um marcador bastante específico (Antonioli et al., 2004; Lin et al., 2000; Madsen et al., 1998), medida simultaneamente nas mesmas amostras. Foram utilizadas as mesmas condições de reação descritas anteriormente.

## 4.1.8 Análise das expressões por qRT-PCR

Foram utilizados os seguintes cálculos de conteúdo relativo de *fold change* para se analisar as diferenças de expressão entre as variantes WFDC1 e Delta 3 e *MYH11* (Tabela 1):

Tabela 1. Cálculos de fold change

Ct cDNA:Ct endógeno	$\Delta\Delta\mathbf{Ct}$	2 <sup>-ΔΔCt</sup>	
WFDC1:TPB	ΔCt WFDC1 - ΔCt MYH11	Expressão relativa de WFDC1	
Delta 3:TBP	ΔCt Delta 3 - ΔCt MYH11	Expressão relativa de Delta 3	
MYH11:TBP	ΔCt WFDC1 - ΔCt Delta 3	Expressão relativa entre WFDC1 e Delta 3	

### 4.2 Análises exploratórias e estatísticas

Comparações entre dois grupos foram feitas utilizando o teste-t de Student. Comparações entre mais de dois grupos foram feitas utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguida de teste *post hoc* de Tukey para identificação de diferenças entre os diferentes grupos. As correlações foram determinadas utilizando os programas Excel (Microsoft), MeV ou Graph Pad Prisma.

As Minimum Spanning Trees (MST) foram construídas utilizando-se o software Pajek. Uma matriz de distâncias de correlação criada de acordo com a equação  $d_{ij} = \sqrt{2(1-r_{ij})}$ , onde  $r_{ij}$  é o coeficiente de correlação entre os valores de expressão gênica para as variáveis (amostras no presente caso), como publicado anteriormente (Rosa-Ribeiro et al., 2014).

### 4.3 Aspectos éticos

Neste trabalho foram utilizadas amostras depositadas em bancos de tecidos das Instituições Hospital Sírio Libanês e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Por se tratarem de amostras coletas uma única vez, sem acompanhamento ou intervenções junto ao paciente, tratam-se unicamente de "cessão de material biológico" coletados com consentimentos livres e esclarecidos dos doadores e que permanecem na posse das Instituições onde foram realizadas as coletas.

#### **5. RESULTADOS**

#### 5.1. Características das amostras utilizadas

Foram utilizadas 32 amostras de PCA e 20 amostras de BPH. Os aspectos clínicos relacionados estão listados no Anexo 1. As idades dos doadores com PCA variou de 44 a 77 anos (X=61,5 $\pm$ 8.6) e dos doadores com BPH, de 49 a 85 anos (X=71,0 $\pm$ 9.9) (p<0.001) (Figura 10).



Figura 10. Distribuição das idades dos doadores no momento da cirurgia. São apresentadas as distribuições por faixas de idade em 10 grupos estabelecidos entre os extremos 44 e 85. As idades dos doadores das amostras de BPH foram significativamente maiores que as dos doadores das amostras de PCA (Teste-t; p<0.001).

Como mencionado, algumas informações associadas aos doadores das amostras de PCA como os valores de PSA (antígeno específico da próstata) antes da cirurgia, os valores de Gleason 1 e Gleason 2, o estádio clínico e o volume prostático encontram-se no Anexo 1.

## 5.2 Resultados de qRT-PCR

Para definição do controle interno, foi realizado um teste preliminar com oito amostras tomadas ao acaso utilizando os genes *GUSB* (utilizando anteriormente por Watson et al. 2004), *GAPDH*, *TBP* e *B2M*. O *GUSB* e o *TBP* mostraram a menor variação entre as amostras e foram incluídos nas análises subsequentes. Destes, o *TBP* mostrou melhor desempenho, ou seja, menor desvio padrão, no conjunto das amostras e foi utilizado nos cálculos subsequentes.

Como primeira aproximação dos dados, utilizamos a fórmula de cálculo de *fold-change*, empregando como parâmetros o controle interno *TBP* e os valores de CT para WFDC1 (Anexo 3). A distribuição dos valores de *fold-change* obtida é apresentada na Figura 7. Observa-se uma ampla distribuição sobre cinco ordens de magnitude, o que corresponderia a existirem amostras com uma unidade de Delta 3 menores que 1 para cada 10 unidades de WFDC1 até um extremo de uma unidade de Delta 3 para 9.523 unidades de WFDC1.

Ainda para se obter uma visão panorâmica das relações quantitativas entre as duas variantes e a expressão da MYH11, utilizamos o mesmo tipo de cálculo, usando o *MYH11* como referência. Como explicado anteriormente, células musculares são as responsáveis pela expressão do gene WFDC1 e seu produto protéico ps20 e podem ser identificadas pelo marcador fenotípico *MYH11*. A Figura 8 apresenta as distribuições dos valores obtidos. Observa-se que, em algumas poucas amostras, a expressão da WFDC1 (Figura 8A) atinge quase 8 vezes a expressão da MYH11 (Amostras PCA28, PCA60 e BPH105), enquanto a Delta 3 (Figura 8B) foi sempre uma fração (maior valor correspondendo a aproximadamente 1/10 da expressão da MYH11).



Figura 11. Variação no conteúdo relativo (calculada como fold-change - 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$ </sup>) de Delta 3, utilizando-se como referência a variante WFDC1. A linha tracejada representa a curva de regressão obtida a partir dos pontos individuais obtidos para cada amostra. Os valores indicados correspondem à proporção entre unidades de Delta 3 e de WFDC1, nos dois extremos de distribuição.

Embora a utilização da *MYH11* como gene de referência tenha permitido uma boa visão da relação geral entre a expressão de MYH11 com as duas variantes de *splicing* do gene *WFDC1*, ela não permite o estabelecimento de correlações entre os seus conteúdos relativos o que pode indicar o grau de dependência na expressão do gene *WFDC1* ou da expressão seletiva da variante de *splicing*, com as células musculares lisas e com o gene *MYH11* em particular.



Figura 12. Variação no conteúdo relativo (calculada como *fold-change*) de WFDC1 (A) e de Delta 3 (B), utilizando como referência o *MYH11*. São indicados os valores individuais obtidos para cada amostra. Nota-se que três amostras tiveram valores de WFDC1 relativamente maiores que *MYH11*.

Por esta razão, os dados obtidos na quantificação da expressão de MYH11, WFDC1 e Delta3 foram calculados como *fold-change*, segundo a equação do  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , utilizando como controle interno o gene TBP e, a seguir, o valor da mediana para cada situação, como grupo de referência. A distribuição dos valores de *fold-change* são apresentados na Figura 13.



Figura 13. Distribuição dos valores de *fold-change* obtidos para *MYH11* (A), WFDC1 (B) e Delta 3 (C) (10 classes distribuídas entre o menor e o maior valor). São também apresentados os valores médios e 1/10 do desvio padrão dos valores de *fold-change* para cada gene ou variante nas amostras de BPH e PCA (D). O teste-*t* indicou diferença significativa entre as amostras de PCA e BPH apenas para o Delta 3 (\**p*=0.0116).

57

### 5.3 Correlações entre os valores de expressão de MYH11, WFDC1 e Delta3

Como mencionado na introdução, Watson et al. (2004) reportaram a existência de relação exponencial entre o conteúdo de células musculares lisas e a expressão do gene WFDC1. Com esta informação, decidimos utilizar o gene MYH11, um marcador de células musculares lisas, como medida da quantidade de células musculares lisas nas amostras utilizadas para extração de RNA, o que deveria apresentar maior fidelidade e menos arbitrariedade que a informação do percentual de células musculares lisas observadas em cortes histológicos de fragmentos obtidos do mesmo paciente, como feito naquele trabalho. A Tabela 2 mostra não existir correlação entre os logaritmos de *fold-change* entre as variantes WFDC1 entre si e com o gene MYH11, quando considerado todo o universo amostral. Da mesma forma, não foi encontrada correlação entre os mesmos parâmetros para as amostras de PCA. Nas amostras de BPH, foi identificada correlação positiva apenas entre a variante WFDC1 e a MYH11.

**Tabela 2.** Correlação entre os valores dos logaritmos de *fold-change* obtidos para o gene *MYH11* e as variantes de *WFDC1* (WFDC1 e Delta 3) para todo o conjunto de amostras e para as amostras de PCA e BPH.

	WFDC1/ <i>MYH11</i>	Delta 3/ <i>MYH11</i>	WFDC1/Delta 3
Total	0.31	0.01	-0.07
PCA	0.13	0.22	-0.05
BPH	0.53	-0.22	-0.07

Procuramos também identificar se haveria correlação entre a expressão das variantes do gene WFDC1 e características dos pacientes (Tabela 3). A única variável correlacionada nas amostras de PCA foi o estadiamento de Gleason total (soma dos dois valores de Gleason mais prevalentes identificados na biópsia) e o conteúdo de Delta 3. Já nas amostras de BPH, houve correlações positiva entre a idade do paciente e o conteúdo de WFDC1 e de *MYH11*.

**Tabela 3.** Valores das correlações obtidas entre a expressão de WFDC1, Delta 3 e de *MYH11* com a idade (em amostras de PCA e de BPH) e com os valores de PSA pré-operatório, estadiamento de Gleason e volume prostático (para as amostras de PCA).

		WFDC1	Delta 3	M YH11
	Idade	0.05	0.13	-0.07
PCA	PSA-pre	-0.19	0.19	-0.29
	Gleason-1	-0.20	0.09	-0.10
	Gleason-total	0.03	0.42	-0.07
	Volume prostático	-0.08	-0.16	-0.05
HPB	Idade	0.40	0.17	0.20

Ao serem analisadas as distribuições dos valores de logaritmos dos *fold-change* das variantes WFDC1 e Delta 3 contra os logaritmos dos *fold-change* determinados para *MYH11*, observamos que havia um grupo de amostras em que tanto WFDC1 quanto Delta 3 estavam altos, a despeito da baixa expressão de *MYH11* (área indicada no quadrante superior esquerdo da Figura 14. Tanto os dados de correlação da (Tabela 2) quanto a inspeção visual desta plotagem indicam relativa independência entre a expressão destes genes/variantes. Entretanto, quando isoladas as amostras que apresentaram baixos valores de *MYH11*, foi encontra relação positiva entre ambos (WFDC1 e Delta 3) e *MYH11*.



Figura 14. Distribuição dos logaritmos dos fold-change de WFDC1 e Delta 3 contra os valores de MYH11 (eixos do gráfico). Nota-se que algumas amostras apresentam valores elevados de uma ou ambas variantes de WFDC1, independentemente da expressão de MYH11 (área indicada pela caixa tracejada). Ao se considerarem os valores de expressão da MYH11 acima da mediana identificam-se correlações positivas entre a expressão das duas variantes e da MYH11.

Esta observação concorda com a observação anterior de que células epiteliais no PCA avançado podem expressar a WFDC1. Para checar esta possibilidade, procuramos determinar se haveria correlação entre a expressão das variantes de WFDC1 com a progressão tumoral. A Figura 15 mostra uma tentativa de refinar esta análise, separando as amostras de BPH e de PCA e fazendo distinção entre as duas populações observadas com respeito à expressão de *MYH11*.



Figura 15. Distribuição dos logaritmos dos valores de *fold-change* de WDFC1 (A) e de Delta 3 (B), em relação à distribuição dos valores obtidos para *MYH11*. Nesta análise, as amostras que ocupavam o quartil inferior da distribuição de valores da *MYH11* foram isoladas, revelando correlação positiva entre *WFDC1* e *MYH11*, nas amostras de BPH, mas não nas de PCA. Por outro lado, não houve correlação entre Delta 3 e *MYH11* em nenhuma situação.

Os resultados mostram correlação positiva entre a expressão de WFDC1 e a presença de células musculares lisas (indicada pela expressão de *MYH11*) nas amostras de BPH, mas não nas amostras de PCA. Por outro lado, são observadas amostras de BPH e de PCA, com baixíssima expressão de *MYH11* e expressão relativamente alta de WFDC1. Em contrapartida, ficou evidente que a expressão da variante Delta 3 não tem correlação com a expressão de *MYH11*, nas amostras de PCA ou de BPH. Ficou mais claro também que mais amostras apresentam alta expressão de Delta 3, com baixíssima expressão de *MYH11*.

Ainda interessados nos aspectos gerais da expressão das variantes de WFDC1, utilizamos duas formas de análises globais dos dados. Na primeira delas, utilizamos uma forma bastante visual denominada Minimum Spanning Tree (MST). Para sua construção, criamos uma matriz de distâncias entre as correlações obtidas entre cada amostra e todas as demais, baseadas nos logaritmos dos valores de fold-change para a expressão de WFDC1, Delta 3 e MYH11. A inspeção visual da MST construída (Figura 16) permitiu verificar a intercalação de amostras de BPH e de PCA, sem associação com os valores correspondentes à MYH11, indicados pelos diâmetros dos vértices. Ficou também evidente que algumas amostras de BPH e algumas amostras de PCA ficaram segregadas em determinados segmentos da árvore. Ao utilizarmos parâmetros como os valores de PSA antes da cirurgia (Anexo 4) ou mesmo os valores de Gleason total (Anexo 5), ficou claro não existir qualquer padrão de distribuição.



Figura 16. MST obtida a partir das distâncias calculadas entre cada amostra a partir da correlação calculada com base na expressão de *MYH11*, WFDC1 e Delta 3. Amostras de PCA são apresentadas em vermelho e as de BPH aparecem indicadas em azul. Os diâmetros dos vértices correspondem aos valores de expressão da *MYH11*.

Na segunda tentativa, utilizamos o software MeV na tentativa de clusterização das amostras. Os resultados mostrados na Figura 17 indicam que as amostras são organizadas em dois *clusters*, no primeiro identifica-se correlação entre WFDC1 e *MYH11* e na segunda, entre Delta 3 e *MYH11*. O que deriva desta observação é que existem amostras de PCA que se distinguem quanto à expressão de *MYH11*, WFDC1 e de Delta 3 e amostras de BPH que se distinguem quanto à expressão de *MYH11* e Delta 3 (Figura 17).



Figura 17. Clusterização dos resultados de qRT-PCR para MYH11, WFDC1 e Delta 3, utilizando-se o software MeV. As amostras foram divididas em dois clusters. O Cluster 1 indica correlação positiva entre WFDC1 e MYH11 e o Cluster 2 indica correlação positiva entre Delta 3 e MYH11.



# "Unpaired*t*-test"

Figura 18. Análise estatística dos valores de expressão de *MYH11*, WFDC1 e Delta 3, nas amostras de PCA e de BPH clusterizadas de acordo com a Figura 17. Foram observadas diferenças estatísticas (p<0.05) de acordo com o teste-t para o WFDC1, nas amostras de PCA e para Delta 3 tanto nas amostras de PCA como nas de BPH.

No conjunto, os resultados acima demonstram que existem variações nas expressões da *MYH11*, WFDC1 e Delta 3 entre as diferentes amostras e que algumas amostras de PCA e de BPH segregam-se em pequenos grupos.

Procurando investigar possíveis eventos embebidos nas análises quantitativas, buscamos avaliar em mais detalhes a distribuição dos valores de expressão para cada gene ou variante.

Primeiramente, investigamos o padrão de variação de expressão de cada gene/variantes. Observamos que há uma variação exponencial nos valores de *fold-change*, mais marcantes para as variantes de *splicing* do transcrito codificado pelo gene *WFDC1* do que para *MYH11* (Figura 19A). Na sequência, procuramos investigar os valores de expressão desviavam-se da curva de variação exponencial obtida para cada um deles (Figura 19B-C) e notamos oscilações positivas ou negativas, o que nos levou a perguntar se elas estariam associadas ao fato de serem oriundas de amostras de BPH ou PCA. A identificação das amostras mostrou certa segregação dos dois grandes grupos.

Observamos que os valores de expressão para WFDC1 variam harmonicamente ao redor da curva de regressão, com amostras de PCA e de BPH intercaladas entre si, exceto para três pequenos subgrupos, que se segregaram (indicados pela caixa verde, na Figura 19A). A intercalação entre amostras de PCA e de BPH foi mais marcante para Delta 3, exceto para um grupo de amostras de PCA que apresentaram os maiores valores de expressão (indicados pela caixa verde na Figura 19B). Igualmente intercaladas ficaram as amostras de BPH e de PCA, com respeito à expressão de *MYH11*, à exceção de dois pequenos grupos de BPH e de PCA com os maiores valores de expressão (caixa verde na Figura 19C).

65

O que estes dados indicaram foi que havia distribuição exponencial dos valores de expressão do WFDC1, Delta 3 e de *MYH11*, e uma certa segregação das amostras quanto aos valores de expressão individual.



Figura 19. Curvas de regressão obtidas para os valores de *fold-change* de WFDC1, Delta 3 e *MYH11* (A) e variações dos dados reais ao redor delas para todas as amostras (B-D).

Concentrando-nos no fato de que WFDC1 e Delta 3 são expressos pelo mesmo gene e nas segregações parciais entre as amostras de PCA e BPH observadas até o momento, procuramos determinar se haveria relações quantitativas entre as duas variantes. Assim, procuramos verificar a distribuição das razões entre as expressões das duas variantes para cada amostra, eliminando a dependência do conteúdo de células musculares lisas (e, portanto, da expressão de *MYH11*) em cada amostra utilizada. As Figuras 20 e 21 apresentam a distribuição de valores, mostrando uma variação de quase mil vezes (três unidades na escala logarítmica). Além disto, observamos uma nítida segregação das amostras de PCA e de BPH, com uma oscilação harmônica com respeito à curva de regressão. Ao serem analisadas as diferenças entre os valores individuais e aqueles calculados, notamos a distribuição discreta em subpopulações, cujos valores médios indicavam proporções específicas entre WFDC1 e Delta 3 (Figura 18). Assim, identificamos populações oscilantes ao redor das proporções 1:3, 1:1 e 10:1, e extremos indicando ausência da variante WFDC1 (1:25) ou da Delta 3 (50:1).





Figura 20. Variação dos valores de fold-change obtidos para WFDC1 (A), Delta 3 (B) e *MYH11* (C), considerando as amostras de BPH (azuis) e de PCA (vermelhas).



Figura 21. Oscilação nos valores de *fold-change* obtidos para as variante Delta 3 (tendo como referência o a expressão de WFDC1) em amostras de BPH (azuis) e PCA (vermelhas). O gráfico mostra que amostras de BPH e de PCA apresentam distribuições discretas e intercaladas entre si, indicando não haver associação entre PCA ou BPH com a predominância na expressão das duas variantes de WFDC1. Observa-se a segregação das amostras de BPH e PCA.



Figura 22. Distribuição de probabilidades cumulativas para os valores de *fold-change* obtidos para Delta 3, utilizando a expressão do WFDC1 como referencia. As diferentes cores indicam diferentes segmentos da distribuição. Fica clara a existência de pequenos subgrupos virtualmente idênticos (azul, vinho, verde de vazado), com relações quantitativas aproximadas indicadas nas caixas. Os valores de *fold-change* são os mesmos apresentados na Figura 6.



Figura 23. Distribuição de probabilidade cumulativa utilizando 1-F(x). Dados iguais ao da Figura 6, analisados da mesma maneira que na Figura 17 (escala invertida em Y e sem escala logarítmica. Os dados parecem se distribuir em quatro classes principais. Na primeira, há predomínio de WFDC1 (preto). Em duas delas, parecem haver relações aproximadas de 1:100 e 1:40 (Delta 3:WFDC1). No quarto grupo, constituido de apenas quatro amostras, há grande predomínio de Delta 3.

# 6. DISCUSSÃO

A glândula prostática apresenta um importante papel na produção de componentes do líquido seminal e na regulação da eliminação da urina. Sua embriogênese classicamente descrita por McNeal (1981) relata que os botões prostáticos vão se desenvolvendo, formando as regiões luminais e toda a organização epitélio-mesênquima que compõe o órgão a partir de uma estimulação hormonal que experimenta um período de repouso do nascimento até a puberdade, mas se mantém durante toda a vida dos homens.

A próstata cresce naturalmente à medida que seu desenvolvimento ultrapassa os 40 anos de vida e, diante disso, muitos questionamentos são feitos a respeito desse distúrbio de crescimento, patologicamente classificado como hiperplasia. De acordo com Schauer e Rowley (Schauer and Rowley, 2011) parece existir uma "biologia da prioridade" que tenta explicar evolutivamente a manutenção de um ciclo de eventos morfofisiológicos que passa a ocorrer na próstata a partir do envelhecimento. Tudo leva a crer que as células apresentam uma programação genética que define a multiplicação celular nesse período de vida. A embriogênese de mamíferos dentro de um ambiente, a princípio, completamente estéril, seguindo um padrão específico e simétrico de divisão celular, e a diferenciação regulada de tecidos e órgãos, mantêm a perspectiva inicialmente organizada e controlada de desenvolvimento biológico. No entanto, a homeostasia teoricamente preservada por esse ambiente, passa a ser interrompida por diversos tipos de ocorrências externas, lesões físicas e químicas, nutricionais e microbianas, induzindo necessariamente uma biologia de reparo contínua, mesmo no envelhecimento. Uma vez a lesão corrigida e o reparo finalizado, a biologia dos tecidos e órgãos retorna à sua prioridade de diferenciação funcional, uma vez que mesmo nos adultos, a presença de células-tronco ratifica a diferenciação celular. Entretanto, no envelhecimento ou senescência, os processos inflamatórios característicos do reparo tecidual mantêm-se crônicos, favorecendo que outras doenças associadas à idade afetem a eficiência da transição reparo-homeostase e diferenciação (Campisi, 2011; Davalos et al., 2010; Madar et al., 2009; Schulz et al., 2003),

71

A inflamação gerada pelas lesões associadas à diferenciação é uma resposta inata do organismo (cuja caracterização de eventos e recrutamento celular varia de acordo com o grau de lesão e com a própria biologia do indivíduo) tem proporcionado diversas hipóteses com relação à patogênese das doenças prostáticas. Kramer *et al.* (Kramer et al., 2007) fizeram uma minuciosa revisão bibliográfica, concluindo que há fortes indícios de que a Hiperplasia Prostática Benigna (BPH) seja uma doença inflamatória.

Diante disso, criam-se alguns paradoxos: 1) as doenças relacionadas à próstata são geradas em função de uma programação genética da prioridade (Schauer and Rowley, 2011) que, na tentativa de retorno à homeostase e à diferenciação após lesões, determina os efeitos inflamatórios, ou 2) as doenças prostáticas são apenas geradas por uma resposta imunológica (Kramer et al., 2007; Palapattu et al., 2005), ou 3) a próstata é um órgão que biologicamente teria "prazo de validade" (principalmente ao se analisar as baixíssimas expectativas de vida da humanidade no passado) (Ressler and Rowley, 2011) ou 4) se as doenças prostáticas são uma associação entre um legado genético e o meio ambiente (exposição aos agrotóxicos, tabagismo, etilismo, parasitas, etc.) e, portanto, sua etiopatogenia é aleatória (Alhasan et al., 2008; Bingle and Vyakarnam, 2008; Farnsworth, 1999; Schulz et al., 2003; Thomson et al., 2008). Sabe-se, de fato, que as alterações prostáticas ocorrem a partir da quarta década de vida nos homens (Alcaraz et al., 2009; Schauer and Rowley, 2011; Xia et al., 2012; Yap and Emberton, 2010). Independente da origem, faz-se necessário atentar para o que a biologia do órgão pode revelar. Possivelmente, a sinergia de fatores genéticos ou evolutivos, hormonais, andropausa ou alimentação, está associada às mudanças da morfofisiologia da próstata que ocorrem gradativamente com o envelhecimento (Campisi, 2011; Madar et al., 2009).

A presente tese objetivou explorar um aspecto particular da biologia prostática. O alvo do estudo foi centrado na expressão do gene *WFDC1* pelas células musculares lisas (CML), com distinção entre suas duas variantes de *splicing* WFDC1 e Delta 3.

Além de ser responsável pela contractilidade da glândula, pela regulação parácrina entre o epitélio prostático e o estroma e pela remodelação da matriz extracelular (Vilamaior et al., 2000), as células musculares lisas são
responsáveis pela secreção de diversas proteínas e polipeptídeos importantes para o controle do crescimento celular, para o reparo, angiogênese e remodelação prostática (Cunha et al., 2004; Thomson et al., 2002). Tudo leva a crer que as CML apresentam fenótipos diferentes mediante a atividade exercida (Antonioli et al., 2007; Antonioli et al., 2004) No entanto, não se pode ainda caracterizar com certeza se a diferenciação e desdiferenciação das CML apresentam uma coordenação específica e bem orquestrada, que possa resultar na compreensão do comportamento patológico da próstata. Wong e Tam (2002) desenvolveram um modelo animal de carcinogênese prostática que usava uma combinação de testosterona e estrógeno. Eles concluíram que durante o processo de carcinogênese da glândula, mudanças ocorrem nos perfis das proteínas de secreção, expressão de fatores de crescimento e expressão de oncogenes e genes de supressão tumoral. Afirmaram que essas mudanças estão associadas à desdiferenciação das CML.

Tuxhorn *et al.* (Tuxhorn et al., 2001; Tuxhorn et al., 2002) afirmam que essa mudança fenotípica característica do estroma prostático estaria relacionada à Hiperplasia Prostática Benigna (BPH) e denominaram de estroma reativo, bastante retratado em diversas publicações (McAlhany et al., 2003; Ressler and Rowley, 2011; Untergasser et al., 2005). Contudo, parece óbvio perceber que a reatividade estromal está diretamente ligada aos processos inflamatórios característicos da BPH e que não necessariamente apresentam alguma importância aparentemente causal da doença, e sim uma imensa contribuição morfológica.

As CML expressam uma proteína estromal, a ps20, que possivelmente controla a proliferação celular e está envolvida na manutenção da sinalização epitélio-estroma, com a angiogênese e com a secreção de diversos fatores de crescimento. O gene *WFDC1* foi identificado como possível supressor tumoral, uma vez que sua expressão é reduzida nas próstatas com PCA. Além disso, o gene apresenta baixa regulação no câncer de próstata e essa observação foi a primeira indicação de que o microambiente estromal do tumor era diferente do estroma normal, corroborando a importância da ps20 nos estudos sobre a patologia da próstata (Ressler and Rowley, 2011).

Watson *et al.* (Watson et al., 2004) estudaram alguns polimorfismos genéticos que pudessem ter correlação com o câncer prostático, no entanto,

comprovaram que as mutações conhecidas no gene *WFDC1* não tem associação com o câncer.

O presente estudo é original, no sentido de se fazer uma investigação do padrão de expressão do gene WFDC1 em amostras de tecido humano oriundas de casos de BPH e de PCA, buscando estabelecer correlações quantitativas entre as variantes WFDC1 e Delta 3.

Muitos trabalhos atuais estão revelando a importância de se conhecer o papel do estroma prostático na prostatite crônica, processo inflamatório que apresenta células mononucleares específicas, mediadores químicos específicos como as interleucinas 8, 12 e 23, diversos fatores imunológicos envolvidos e fatores de crescimento regulados por hormônios (Fibbi et al., 2010).

Nossas amostras foram obtidas a partir de cirurgias utilizadas no tratamento de BPH e PCA. O padrão de idades dos doadores difere daquele identificado em necropsias (Bostwick et al., 1992). A possível explicação para esta diferença reside no fato de que as primeiras foram diagnosticas a partir de sintomas urinários ou parâmetros clínicos, enquanto as outras foram identificadas em tecido prostático, mas não estavam necessariamente associadas a manifestações da doença. Em outras palavras, a detecção da doença depende da manifestação de sintomas e estes demoram mais para serem notados nos casos de hiperplasia. Outra explicação possível é que a cirurgia tenha sido protelada nos casos de BPH, em função de tentativas de tratamento medicamentoso.

Embora tenha sido reportada uma relação exponencial entre os valores de expressão de WFDC1 e o percentual de células musculares lisas nas amostras (Watson et al., 2004), nossos dados não identificaram correlação entre a expressão de WFDC1 (ou Delta 3) com *MYH11* em amostras de PCA. Esta correlação só foi estabelecida nas amostras de BPH, particularmente quando a subpopulação com baixa expressão de *MYH11* foi excluída. Por outro lado, as análises também demonstram que são encontradas amostras com expressão elevada de WFDC1 e/ou de Delta 3, quando a expressão de *MYH11* foi muito baixa. Este resultado pode revelar que a expressão de WFDC1 ocorre de forma independente da expressão de *MYH11*, indicando que a desdiferenciação das células musculares lisas não tem impacto na expressão do gene WFDC1 (ao contrario do que se espera para os marcadores de células

74

musculares lisas, como actina de músculo liso ou *MYH11*). Por outro lado, a estes resultados podem ser explicados pelo fato de que o gene WFDC1 é expresso por outros tipos celulares. A demonstração de que a WFDC1 pode ser expressa tanto por células epiteliais nos PCA avançados (McAlhany et al., 2004) e em determinadas populações de linfócitos CD4 (Alvarez et al., 2008; Alvarez et al., 2011), podem estar associadas a este novo padrão de expressão.

Ainda na busca de padrões gerais de expressão das variantes WFDC1 e Delta 3, identificamos que a segunda mostra correlação com os valores de Gleason somados. Este parâmetro pode estar associado tanto com a modificação fenotípica das células musculares lisas, comumente observadas na progressão do câncer de próstata, à expressão pelas células tumorais, ou, ainda, pela presença de linfócitos CD4 recrutados para o tecido.

Um a observação relevante oriunda das presentes análises foi a de que as amostras de PCA e BPH formam subgrupos que por sua vez se intercalam entre si. Isto foi identificado tanto na formação de clusters, quanto na MST. Sem a identificação de parâmetros adicionais, com predominância celular ou aspecto inflamatório, ou existência de polimorfismos, torna-se praticamente impossível estabelecer fatores determinantes para estes padrões.

Por outro lado, os resultados também revelaram que no conjunto, as amostras apresentam um padrão oscilatório ao redor das curvas de regressão. Este padrão foi reforçado quando foi analisada a razão entre os valores de expressão da variante WFDC1 e Delta 3, que preservaram igualmente o agrupamento de amostras de BPH e de PCA, variando em proporções de quase 1000 vezes.

A interpretação lógica e mais imediata para este padrão é que existem fatores determinantes da proporção entre as variantes de *splicing* que se manifestam nas populações, resultando em oscilações ao redor dos valores 1:3, 1:1 e 10:1, mas com extremos em 1:25 e 50:1. Estes dois últimos devem indicar a preponderância de uma variante ou da outra.

Determinações das relações quantitativas entre variantes de *splicing* são infrequentes. Num trabalho recente utilizando pirosequenciamento, foram determinadas as proporções entre as formas  $G\alpha s_L+CAG$ ,  $G\alpha s_L-CAG$ ,  $G\alpha s_S+CAG$  e  $G\alpha s_S-CAG$  da subunidade alfa das proteínas G heterotriméricas

75

(Frey et al., 2005), com duas formas variáveis  $G\alpha s_s+CAG$  (0,32 a 0,57 do total) e  $G\alpha s_L$ -CAG (0,14 a 0,41 do total) (ou seja 1:1,8 a 1:7,1) (e as demais relativamente constantes) em diferentes células e tecidos, que se tratam de faixas bem mais estreitas que aquelas reportadas aqui para a WFDC1 e Delta 3. Em outras abordagens, há referências apenas quanto à abundância maior ou menor de uma ou outra variante.

Embora os parâmetros quantitativos aqui apresentados sejam suficientemente sólidos para ditar aspectos da regulação da expressão do gene *WFDC1*, análises adicionais serão necessárias para buscar os fatores responsáveis pela regulação da sua expressão nas células musculares lisas, pela adoção da expressão pelas células tumorais e pela variação na expressão de *WFDC1* em linfócitos CD4, todos com contribuição provável para a determinação do conteúdo final de WFDC1 e Delta 3 na próstata humana.

## 7. CONCLUSÕES

1. As variantes de *splicing* WFDC1 e Delta 3 do gene *WFDC1* podem ser quantificadas por RT-PCR, utilizando conjunto de *primers*/sondas específicos.

2. A expressão das variantes WFDC1 e Delta 3 são independentes entre si. Foi identificada correlação entre a variante WFDC1 e MYH11 (utilizado como marcador de células musculares lisas) nas amostras de BPH, mas não nas amostras de PCA. A variante Delta 3 expressa-se de forma independente de MYH11.

3. Existe correlação positiva entre Delta 3 e a progressão do câncer de próstata, identificado pela somatória dos dois graus de Gleason predominantes.

4. As amostras de BPH e de PCA apresentam comportamento oscilante nos valores de expressão da variante WFDC1 e, mais evidentemente, da razão entre WFDC1 e Delta 3.

5. BPH e PCA apresentam distribuições discretas e intercaladas entre si, na distribuição dos valores de expressão das variantes WFDC1, Delta 3 e da razão entre WFDC1 e Delta 3.

6. Existem subpopulações que incluem tanto amostras de BPH quanto de PCA que apresentam valores discretos da razão WFDC1 e Delta 3 centrados em 1:3, 1:1 e 10:1, mas com extremos em 1:25 e 50:1.

# 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, M.J., Oh, S.J., Lee, Y.Y., Jung, T.J., Kim, I.S., Choi, I.Y., Jang, S.J., Park, Y.W., Shin, K.Y., Kim, Y.S. (1997) A case of prostate cancer in 34 year old man presenting with generalized lymphadenopathy mimicking malignant lymphoma. J Korean Med Sci 12: 262-265.
- Alcaraz, A. (2008) Management of the hormone sensitivity of prostate cancer: where are we now? Eur Urol 54: 247-250.
- Alcaraz, A., Hammerer, P., Tubaro, A., Schroder, F.H., and Castro, R. (2009).Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. Eur Urol 55, 864-873.
- Alhasan, S.U., Aji, S.A., Mohammed, A.Z., and Malami, S. (2008). Transurethral resection of the prostate in Northern Nigeria, problems and prospects. BMC Urol 8, 18.
- Alonso-Magdalena, P., Brossner, C., Reiner, A., Cheng, G., Sugiyama, N., Warner, M., and Gustafsson, J.A. (2009). A role for epithelialmesenchymal transition in the etiology of benign prostatic hyperplasia. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 2859-2863.
- Alvarez, R., Reading, J., King, D.F., Hayes, M., Easterbrook, P., Farzaneh, F., Ressler, S., Yang, F., Rowley, D., and Vyakarnam, A. (2008).
  WFDC1/ps20 is a novel innate immunomodulatory signature protein of human immunodeficiency virus (HIV)-permissive CD4+ CD45RO+ memory T cells that promotes infection by upregulating CD54 integrin expression and is elevated in HIV type 1 infection. J Virol 82, 471-486.
- Alvarez, R.A., Thorborn, G., Reading, J.L., Reddy, S.K., and Vyakarnam, A. (2011). WFDC1 expression identifies memory CD4 T-lymphocytes rendered vulnerable to cell-cell HIV-1 transfer by promoting intercellular adhesive junctions. Retrovirology 8, 29.
- Antonioli, E., Cardoso, A.B., and Carvalho, H.F. (2007). Effects of long-term castration on the smooth muscle cell phenotype of the rat ventral prostate. J Androl 28, 777-783.
- Antonioli, E., Della-Colleta, H.H., and Carvalho, H.F. (2004). Smooth muscle cell behavior in the ventral prostate of castrated rats. J Androl 25, 50-56.

- Baca, S.C., Prandi, D., Lawrence, M.S., Mosquera, J.M., Romanel, A., Drier,
  Y., Park, K., Kitabayashi, N., MacDonald, T.Y., Ghandi, M., et al. (2013).
  Punctuated evolution of prostate cancer genomes. Cell 153, 666-677.
- Bingle, C.D., and Vyakarnam, A. (2008). Novel innate immune functions of the whey acidic protein family. Trends Immunol 29, 444-453.
- Birbach, A., Eisenbarth, D., Kozakowski, N., Ladenhauf, E., Schmidt-Supprian, M., and Schmid, J.A. (2011). Persistent inflammation leads to proliferative neoplasia and loss of smooth muscle cells in a prostate tumor model. Neoplasia 13, 692-703.
- Bonomi, S., Gallo, S., Catillo, M., Pignataro, D., Biamonti, G., and Ghigna,
  C. (2013). Oncogenic alternative splicing switches: role in cancer progression and prospects for therapy. Int J Cell Biol 2013, 962038.
- Bostwick, D.G., Cooner, W.H., Denis, L., Jones, G.W., Scardino, P.T., and Murphy, G.P. (1992). The association of benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate. Cancer 70, 291-301.
- Bouchard, D., Morisset, D., Bourbonnais, Y., and Tremblay, G.M. (2006). Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. Lancet Oncol 7, 167-174.
- Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A.M., Graveley, B.R., and Blencowe, B.J. (2013). Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. Cell 152, 1252-1269.
- Campisi, J. (2011). Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. Curr Opin Genet Dev 21, 107-112.
- Cunha, G.R., Ricke, W., Thomson, A., Marker, P.C., Risbridger, G., Hayward, S.W., Wang, Y.Z., Donjacour, A.A., and Kurita, T. (2004).
  Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. J Steroid Biochem Mol Biol 92, 221-236.
- Davalos, A.R., Coppe, J.P., Campisi, J., and Desprez, P.Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. Cancer Metastasis Rev 29, 273-283.
- Djavan, B., Milani, S., Remzi, M. (2005) Prostate biopsy: who, how and when. An update. Can J Urol 12 (Suppl 1): 44-48.

- Djavan, B., Eckersberger, E., Finkelstein, J., Espinosa, G., Sadri, H., Brandner, R., Shah, O., and Lepor, H. (2010). Benign prostatic hyperplasia: current clinical practice. Prim Care 37, 583-597, ix.
- Elo, J.P., Harkonen, P., Kyllonen, A.P., Lukkarinen, O., Poutanen, M., Vihko,
  R., and Vihko, P. (1997). Loss of heterozygosity at 16q24.1-q24.2 is significantly associated with metastatic and aggressive behavior of prostate cancer. Cancer Res 57, 3356-3359.
- Farnsworth, W.E. (1999). Prostate stroma: physiology. Prostate 38, 60-72.
- Feldman, B.J., and Feldman, D. (2001). The development of androgenindependent prostate cancer. Nat Rev Cancer 1, 34-45.
- Fibbi, B., Penna, G., Morelli, A., Adorini, L., and Maggi, M. (2010). Chronic inflammation in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. Int J Androl 33, 475-488.
- Frey, U.H., Nuckel, H., Dobrev, D., Manthey, I., Sandalcioglu, I.E.,
  Eisenhardt, A., Worm, K., Hauner, H., and Siffert, W. (2005).
  Quantification of G protein Gaalphas subunit splice variants in different
  human tissues and cells using pyrosequencing. Gene Expr 12, 69-81.
- Gleason DF (1977) The Veteran's Administration Cooperative Urologic Research Group: histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In Tannenbaum M (ed.) Urologic Pathology: The Prostate. Lea and Febiger, Philadelphia, 1977; 171-198.
- Hong, J.H., Song, C., Shin, Y., Kim, H., Cho, S.P., Kim, W.J., and Ahn, H. (2004). Estrogen induction of smooth muscle differentiation of human prostatic stromal cells is mediated by transforming growth factor-beta. J Urol 171, 1965-1969.
- Kapoor, A. (2012). Benign prostatic hyperplasia (BPH) management in the primary care setting. Can J Urol 19 Suppl 1, 10-17.
- Kramer, G., Mitteregger, D., and Marberger, M. (2007). Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? Eur Urol 51, 1202-1216.
- Larsen, M., Ressler, S.J., Gerdes, M.J., Lu, B., Byron, M., Lawrence, J.B., and Rowley, D.R. (2000). The WFDC1 gene encoding ps20 localizes to 16q24, a region of LOH in multiple cancers. Mamm Genome 11, 767-773.

- Larsen, M., Ressler, S.J., Lu, B., Gerdes, M.J., McBride, L., Dang, T.D., and Rowley, D.R. (1998). Molecular cloning and expression of ps20 growth inhibitor. A novel WAP-type "four-disulfide core" domain protein expressed in smooth muscle. J Biol Chem 273, 4574-4584.
- Licatalosi, D.D., and Darnell, R.B. (2010). RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. Nat Rev Genet 11, 75-87.
- Lin, V.K., Wang, D., Lee, I.L., Vasquez, D., Fagelson, J.E., and McConnell, J.D. (2000). Myosin heavy chain gene expression in normal and hyperplastic human prostate tissue. Prostate 44, 193-203.
- Macoska, J.A. (2011). Chemokines and BPH/LUTS. Differentiation 82, 253-260.
- Madar, S., Brosh, R., Buganim, Y., Ezra, O., Goldstein, I., Solomon, H., Kogan, I., Goldfinger, N., Klocker, H., and Rotter, V. (2009). Modulated expression of WFDC1 during carcinogenesis and cellular senescence. Carcinogenesis 30, 20-27.
- Madsen, C.S., Regan, C.P., Hungerford, J.E., White, S.L., Manabe, I., and Owens, G.K. (1998). Smooth muscle-specific expression of the smooth muscle myosin heavy chain gene in transgenic mice requires 5'-flanking and first intronic DNA sequence. Circ Res 82, 908-917.
- McAlhany, S.J., Ayala, G.E., Frolov, A., Ressler, S.J., Wheeler, T.M., Watson, J.E., Collins, C., and Rowley, D.R. (2004). Decreased stromal expression and increased epithelial expression of WFDC1/ps20 in prostate cancer is associated with reduced recurrence-free survival. Prostate *61*, 182-191.
- McAlhany, S.J., Ressler, S.J., Larsen, M., Tuxhorn, J.A., Yang, F., Dang, T.D., and Rowley, D.R. (2003). Promotion of angiogenesis by ps20 in the differential reactive stroma prostate cancer xenograft model. Cancer Res 63, 5859-5865.
- McNeal, J.E. (1981) The zonal anatomy of the prostate. Prostate 2: 35-49,
- Montorsi, F., and Mercadante, D. (2013). Diagnosis of BPH and treatment of LUTS among GPs: a European survey. Int J Clin Pract 67, 114-119.
- Nilsen, T.W., and Graveley, B.R. (2010). Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. Nature 463, 457-463.

- Palapattu, G.S., Sutcliffe, S., Bastian, P.J., Platz, E.A., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (2005). Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. Carcinogenesis 26, 1170-1181.
- Peehl, D.M., and Sellers, R.G. (1997). Induction of smooth muscle cell phenotype in cultured human prostatic stromal cells. Exp Cell Res 232, 208-215.
- Ressler, S.J., and Rowley, D.R. (2011). The WFDC1 gene: role in wound response and tissue homoeostasis. Biochem Soc Trans 39, 1455-1459.
- Rosa-Ribeiro, R., Nishan, U., Vidal, R.O., Barbosa, G.O., Reis, L.O., Cesar, C.L., and Carvalho, H.F. (2014). Transcription factors involved in prostate gland adaptation to androgen deprivation. PLoS One 9, e97080.
- Rowley, D.R., Tindall, D.J. (1987) Responses of NBT-II bladder carcinoma cells to conditioned medium from normal fetal urogenital sinus. Cancer Res. 47: 2955-2960.
- Rowley, D.R., Dang, T.D., Larsen, M., Gerdes, M.J., McBride, L., Lu, B. (1995) Purification of a novel protein (ps20) from urogenital sinus mesenchymal cells with growth inhibitory properties in vitro. J Biol Chem 270: 22058-65.
- Ruijter, E., van de Kaa, C., Miller, G., Ruiter, D., Debruyne, F., and Schalken, J. (1999). Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. Endocr Rev 20, 22-45.
- Sausville, J., and Naslund, M. (2010). Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: an overview for primary care physicians. Int J Clin Pract 64, 1740-1745.
- Schauer, I.G., Ressler, S.J., Tuxhorn, J.A., Dang, T.D., and Rowley, D.R. (2008). Elevated epithelial expression of interleukin-8 correlates with myofibroblast reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. Urology 72, 205-213.
- Schauer, I.G., and Rowley, D.R. (2011). The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. Differentiation 82, 200-210.
- Schulz, W.A., Burchardt, M., and Cronauer, M.V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. Mol Hum Reprod 9, 437-448.

- Shapiro, E., Hartanto, V., and Lepor, H. (1992a). Anti-desmin vs. anti-actin for quantifying the area density of prostate smooth muscle. Prostate 20, 259-267.
- Shapiro, E., Hartanto, V., and Lepor, H. (1992b). The response to alpha blockade in benign prostatic hyperplasia is related to the percent area density of prostate smooth muscle. Prostate 21, 297-307.
- Sharma, N.L., Massie, C.E., Ramos-Montoya, A., Zecchini, V., Scott, H.E., Lamb, A.D., MacArthur, S., Stark, R., Warren, A.Y., Mills, I.G., et al. (2013). The androgen receptor induces a distinct transcriptional program in castration-resistant prostate cancer in man. Cancer Cell 23, 35-47.
- Taboga, S.R., Scortegagna, E., Siviero, M.P., and Carvalho, H.F. (2008). Anatomy of smooth muscle cells in nonmalignant and malignant human prostate tissue. Anat Rec (Hoboken) 291, 1115-1123.
- Tanguay, S., Awde, M., Brock, G., Casey, R., Kozak, J., Lee, J., Nickel, J.C., and Saad, F. (2009). Diagnosis and management of benign prostatic hyperplasia in primary care. Can Urol Assoc J 3, S92-S100.
- Thomson, A.A., Cunha, G.R., and Marker, P.C. (2008). Prostate development and pathogenesis. Differentiation 76, 559-564.
- Thomson, A.A., Timms, B.G., Barton, L., Cunha, G.R., and Grace, O.C. (2002). The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. Development 129, 1905-1912.
- Tomlins, S.A., Mehra, R., Rhodes, D.R., Cao, X., Wang, L., Dhanasekaran, S.M., Kalyana-Sundaram, S., Wei, J.T., Rubin, M.A., Pienta, K.J., et al. (2007). Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. Nat Genet 39, 41-51.
- Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E., and Rowley, D.R. (2001). Reactive stroma in prostate cancer progression. J Urol 166, 2472-2483.
- Tuxhorn, J.A., McAlhany, S.J., Dang, T.D., Ayala, G.E., and Rowley, D.R. (2002). Stromal cells promote angiogenesis and growth of human prostate tumors in a differential reactive stroma (DRS) xenograft model. Cancer Res 62, 3298-3307.
- Untergasser, G., Madersbacher, S., and Berger, P. (2005). Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. Exp Gerontol 40, 121-128.

- Venables, J.P. (2004). Aberrant and alternative splicing in cancer. Cancer Res 64, 7647-7654.
- Vilamaior, P.S., Felisbino, S.L., Taboga, S.R., and Carvalho, H.F. (2000).Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. Prostate 45, 253-258.
- Watson, J.E., Kamkar, S., James, K., Kowbel, D., Andaya, A., Paris, P.L., Simko, J., Carroll, P., McAlhany, S., Rowley, D., *et al.* (2004). Molecular analysis of WFDC1/ps20 gene in prostate cancer. Prostate 61, 192-199.
- Wu, N., Sun, J., Yu, P., and Sun, Z. (2012). Chinese urologists' views of practice patterns in the diagnosis and treatment of benign prostatic hyperplasia: a nationwide survey. Int Neurourol J 16, 191-195.
- Xia, S.J., Cui, D., and Jiang, Q. (2012). An overview of prostate diseases and their characteristics specific to Asian men. Asian J Androl 14, 458-464.
- Yap, T., and Emberton, M. (2010). Behaviour modification and benign prostatic hyperplasia: replacement for medications. Curr Opin Urol 20, 20-27.

Biópsias de PCA	Idade	PSA- Pre	Gleason_1	Gleason_2	Gleason total	Estadio clinico	volume prostático	
1	56	5	3	4	7	T1c	35	
9	60	2.4	5	4	9	T2c	30	
17	48	3.8	3	3	6	T2b	35	
18	63	21.9	4	4	8	T3a	50	
19	74	8.1	4	4	8	T2b	60	
20	65	2.9	4	4	8	T3a	60	
21	71	3.5	4	3	7	T1c	40	
22	61	8.5	3	4	7	T2a	40	
23	51	2.8	3	4	7	T1c	40	
24	24         75         5.46           28         NI         NI           29         NI         NI           31         62         12           33         65         NI		4	4	8	T1c	40 NI NI	
28			NI	NI	NI	NI		
29			NI	NI	NI	NI		
31			3	4	7 7	T3a	40 80	
33			NI	NI		T1c		
34	70	2.3	3	4	7	T2c	50	
36	61	5.3	NI	NI	6	NI T2a	NI	
37	44	4.8	3	4	7		25	
41	48	9.2	4	4	8	T1c	30	
45	58	19	4	4	8	T1c	40	
47	65	9	3	4	7	T2a	40 40	
50	52	6.6	4	3	7	T1c		
51	51         67         2.6           54         62         8.2           56         66         9.3           59         77         5.7		4	4	8	T2a	35	
54			4	3	7	T2b	30 45 40	
56			4	4	8	T2b		
59			4	4	8	T1c		
60	56	2.7	3	3	6	T2c	30	
64	74	4.9	3	4	7	T1c	40	
65	57	5.7	3	3	6	T1c	90	
69	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	
73	58	5.6	4	3	7	T1c	40	
74	56	5.2	3	3	6	T2a	50	
79	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	

Dados clínicos relacionados às amostras de PCA e BPH. NI= não informado.

Biópsias de BPH	Idade	Resultado do Anatomo-patológico
83	82	HIPERPLASIA NODULAR DA PRÓSTATA ASSOCIADA
84	77	HIPERPLASIA NODULAR DA PRÓSTATA
85	60	HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA
97	74	HIPERPLASIA PROSTÁTICA MIOADENOMATOSA BENIGNA, COM
07		PREDOM ÍNIO DO COM PONENTE ESTROMAL.
88	85	HIPERPLASIA NODULAR PROSTÁTICA HEM ANGIOM A (ACHADO
		M ICROSCÓPICO)
89	74	AP: HPB
90	58	HIPERPLASIA NODULAR DA PRÓSTATA COM IMPORTANTE
90		COM PONENTE ESTROM AL
91	63	HIPERPLASIA NODULAR DA PRÓSTATA
02	74	Sem AP pós RTU em 2010:ATROFIA ACINAR PROSTÁTICA
52		MULTIFOCAL
94	61	HIPERPLASIA NODULAR PROSTÁTICA
96	78	HIPERPLASIA NODULAR PROSTÁTICA
98	76	HIPERPLASIA NODULAR PROSTÁTICA
100	49	HIPERPLASIA NODULAR DE PRÓSTATA
101	55	HIPERPLASIA NODULAR PROSTÁTICO BENIGNA
102	79	HIPERPLASIA NODULAR DA PRÓSTATA
103	78	HIPERPLASIA NODULAR PROSTÁTICA
104	71	HIPERPLASIA PROSTÁTICA MIOADENOM ATOSA
105	73	HIPERPLASIA ADENOM IOM ATOSA
106	81	HIPERPLASIA NODULAR DA PRÓSTATA
108	71	sem retorno

Biópsia	ID	C (ng/ μL)	A260/ 280	A260/230
1	2954	912	1,88	1,92
9	2887	912	1,84	1,97
17	2891	908	1,85	1,96
18	2962	1014	1,84	1,85
19	2942	1006	1,83	1,93
20	2862	268	1,92	1,71
21	2901	593	1,91	1,95
22	2790	737	1,9	1,97
23	2877	385	1,92	2,05
24	2910	762	1,87	1,89
28	2973	1862	1,90	1,77
29	2945	707	1,89	1,61
31	2775	822	1.84	1.75
33	2802	1085	1.79	1.71
34	2870	1022	1.79	1.74
36	2968	1023	1.81	1.64
37	2850	2155	1.72	1.65
41	2909	859	1.82	1.81
45	2783	156	1.93	1.76
47	2777	814	1.87	1.88
50	2878	3123	1.68	1.86
51	2881	3042	1.71	1.87
54	2955	2551	1.82	2.03
56	2800	923	1.83	1.82
59	2768	688	1.87	1.90
60	2903	670	1.90	2.03
64	2846	830	1,87	1.89
65	2767	404	1.93	1 70
69	2866	755	1,86	1,89
73	2930	566	1.87	2.04
74	2770	2427	1.82	1.80
79	2908	1755	1.91	2.15
83	99	1100	1.78	1.87
84	100	250	1,93	1,92
85	101	364	1.92	1.81
87	103	936	1.8	1.61
88	104	234	1,84	2,02
89	108	634	1,89	2,1
90	109	210	1,88	2,21
91	110	965	1,79	1,77
92	111	27	1,88	2,45
94	115	159	1,9	2,15
96	121	239	1,87	2,01
98	129	148	1,91	2,22
100	143	497	1,97	1,78
101	135	235	1,94	2,1
102	136	828	1,88	1,46
103	137	170	1,89	2,19
104	138	565	1,95	2,12
105	140	197	1,88	2,08
106	141	255	1,88	2,1
108	146	404	1,91	1,69

# Valores de concentração e qualidade do RNA total extraído das amostras de PCA (amarelo) e BPH (verde).

Biopsias PCA	TBP	WFDC1	Delta3	MYH11	Biopsias BPH	TBP	WFDC1	Delta3	MYH11
1	37.08	37.94	ND	30.84	83	32.83	33.62	34.40	30.54
9	31.68	31.03	34.47	24.70	84	30.54	31.89	34.66	24.87
17	26.65	28.65	32.39	21.20	85	32.97	33.49	36.47	26.67
18	31.49	32.24	34.15	29.35	87	25.71	26.61	30.75	19.78
19	30.44	30.25	33.61	24.81	88	35.94	32.06	36.37	26.26
20	31.14	27.86	34.49	23.99	89	33.00	34.16	34.77	31.26
21	26.80	28.02	33.18	20.84	90	37.09	33.91	41.49	31.73
22	32.34	33.21	35.52	28.24	91	25.82	26.57	29.64	19.82
23	30.12	25.18	33.18	22.78	92	35.63	32.98	39.89	27.19
24	31.66	32.52	34.64	29.65	94	31.84	32.39	33.34	29.97
28	30.45	27.47	36.09	30.47	96	32.03	33.01	34.51	30.29
29	32.71	33.74	37.10	26.08	98	33.11	32.01	37.16	25.88
31	29.30	25.40	33.00	22.89	100	25.92	28.42	29.70	19.42
33	32.59	33.57	35.92	29.72	101	32.10	33.41	33.79	30.81
34	34.00	31.20	38.11	30.65	102	32.31	28.40	35.38	25.22
36	33.83	35.05	37.82	28.83	103	31.11	26.78	34.07	23.59
37	32.61	32.05	35.56	25.60	104	33.05	34.58	33.70	29.00
41	28.62	30.37	31.53	23.75	105	32.19	30.00	37.29	30.70
45	32.92	33.77	36.06	30.29	106	35.62	33.11	37.98	26.85
47	33.87	33.08	36.44	26.19	108	35.72	35.57	41.08	28.58
50	32.17	31.53	36.93	27.12					
51	31.88	32.62	34.53	30.59					
54	31.72	30.93	34.71	25.11					
56	35.39	32.67	41.88	31.18					
59	34.01	33.35	36.94	25.99					
60	33.23	30.10	37.11	30.217					
64	33.24	32.42	35.65	25.59					
65	38.42	39.69	ND	30.99					
69	32.54	34.12	36.67	26.89					
73	33.58	33.39	37.47	26.27					
74	33.10	32.42	39.10	30.48					
79	37.08	37.94	ND	30.84					

Valores de CT obtidos para *TBP*, WFDC1, Delta 3 e *MYH11* para as amostras de PCA e BPH. ND = Não determinado.

MST obtida a partir das distâncias calculadas entre cada amostras a partir da correlação calculada com base na expressão de *MYH11*, WFDC1 e Delta 3. Amostras de PCA são apresentadas em vermelho e as de BPH aparecem indicadas em azul. Os diâmetros dos vértices correspondem aos valores de PSA pré-operatório. As amostras de BPH receberam um valor arbitrário 1.



MST construída a partir da matriz de distâncias de correlação calculadas entre as amostras com base na expressão de *MYH11*, WFDC1 e Delta 3. Amostras BPH são indicadas em azul. As amostras de PCA são indicadas em diferentes cores (branco, não informado; amarelo, Gleason 6; laranja, Gleason 7; vermelho, Gleason 8; vinho, Gleason 9). Os diâmetros dos vértices correspondem aos valores de expressão da *MYH11*.

