

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia

Serviço de Urologia – HCPA

Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia –

Departamento de Fisiologia

**Polimorfismo CAG do Gene do Receptor de Androgênios e Risco de Câncer
de Próstata: Análise de Uma Amostra da População Brasileira**

Dissertação de Mestrado

Aluno: Brasil Silva Neto

Orientador: Prof. Dr. Walter José Koff

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre, novembro de 2005.

Dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam que uma nação torna-se verdadeiramente livre e soberana quando investe na formação de seus recursos humanos, desenvolve sua própria tecnologia, investe e solidifica as suas instituições.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, à Faculdade de Medicina e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre por proporcionar a minha formação acadêmica e por terem sido a minha segunda casa nos últimos treze anos.

Ao curso de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, seus professores e funcionários.

Ao Serviço de Urologia por permitir, logisticamente e financeiramente, a realização deste projeto. A todos os membros deste serviço, pela contribuição à minha formação.

Ao Laboratório de Endocrinologia molecular e neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da UFRGS, e a todos os seus integrantes, pelo auxílio na execução deste projeto e pela maneira carinhosa com que fui recebido por todos.

Ao acadêmico de Medicina Cleber Brenner e ao Dr. Karlo Dornelles Biolo, pelo inestimável auxílio no atendimento aos pacientes e na condução deste projeto.

Ao colega Vanderlei Biolchi, pela competência e dedicação a este projeto. Pelo trabalho incansável durante todas as fases desta pesquisa. Pela paciência em ensinar-me os procedimentos do laboratório.

Agradeço a amizade e o privilégio do convívio dos colegas Dr. Mauro Weiss, Dr. Pedro Nery da Luz Jr., Dr. Renato Scaletsky, Dr. Emanuel Burck dos Santos, Dr. Leonardo Petteffi, Dr. Gustavo Piazza Toniazzo, e, em especial, ao Dr. Jeverson Wagner.

Ao Dr. Milton Berger, pela amizade e pelo exemplo pessoal e profissional, que vem servindo de modelo para a minha trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Walter José Koff, a minha admiração pela grande capacidade profissional e competência com que conduz o Serviço de Urologia. Meu agradecimento por aceitar-me como seu aluno de mestrado, orientando e incentivando desde o início a realização deste projeto de pesquisa. Pelos ensinamentos diários. Pela confiança depositada em mim para a criação e execução deste projeto.

À Minha Co-Orientadora, Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, por ter aceitado a condução deste projeto em seu laboratório. Pela orientação em todas as etapas desta pesquisa, em especial, nesta fase final, onde foste incansável para que tudo desse certo. Pela infinita paciência em explicar e ensinar, para um cirurgião, das questões mais básicas até as mais complexas, sobre biologia molecular. Os teus ensinamentos foram inestimáveis para mim e o teu exemplo como professora e pesquisadora já fazem parte dos meus referenciais.

À minha família por ser a base de tudo. Pelo amor, carinho, respeito e amizade que compartilhamos. Aos meus pais, Antônio e Sandra, pela formação de meu caráter, pelo exemplo constante, pela dedicação e empenho que tiveram para me proporcionar uma educação exemplar.

À minha esposa Andréia. Para te agradecer, seria preciso escrever uma segunda dissertação. Pelo amor. Por tudo que vivemos e compartilhamos. Pelos desafios enfrentados juntos. O nosso convívio me faz uma pessoa melhor a cada dia.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
INTRODUÇÃO	1
FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA -----	2
<i>Idade</i> -----	2
<i>Etnia</i> -----	3
<i>Dieta</i> -----	3
<i>Androgênios</i> -----	4
<i>Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (Insulin-Like Growth Factor – I (IGF-I))</i> -----	5
<i>História Familiar</i> -----	5
<i>Outros Fatores</i> -----	6
ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER DE PRÓSTATA -----	6
O RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS -----	7
POLIMORFISMOS GENÉTICOS -----	12
<i>Polimorfismo CAG do receptor androgênico</i> -----	13
<i>Polimorfismo GGC do receptor androgênico</i> -----	16
<i>Interação entre polimorfismos</i> -----	17
OBJETIVOS	19
OBJETIVO GERAL -----	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS -----	19
PACIENTES E MÉTODOS	20
DELINEAMENTO -----	20
PACIENTES -----	20
MÉTODOS -----	20
<i>Extração do DNA</i> -----	22
<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação das repetições CAG do RA</i> -----	23
<i>Análise Bioquímica</i> -----	26
<i>Análise Estatística</i> -----	27
<i>Financiamento</i> -----	28

RESULTADOS	29
CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA -----	29
CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES RELACIONADAS AO ESTADIAMENTO DO CAP -----	31
CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA RELACIONADAS AO POLIMORFISMO CAG -----	31
POLIMORFISMO CAG E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS NO GRUPO CAP -----	35
POLIMORFISMO CAG E CARACTERÍSTICAS ANÁTOMO-PATOLÓGICAS -----	35
CORRELAÇÃO DA TESTOSTERONA SÉRICA E REPETIÇÕES CAG -----	36
ANÁLISE DA TESTOSTERONA SÉRICA E CARACTERÍSTICAS DO GRUPO COM CAP -----	38
DISCUSSÃO	40
LIMITAÇÕES DO ESTUDO -----	44
CONCLUSÕES	46
PERSPECTIVAS FUTURAS	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	57
ANEXO 1 -----	58
ANEXO 2 -----	59
ANEXO 3 -----	60
ANEXO 4 -----	61
ARTIGO	62

RESUMO

Introdução: O câncer de próstata (CaP) é uma neoplasia muito freqüente entre os homens em todo o mundo. No Brasil, o estado do Rio Grande do Sul possui uma alta incidência desta neoplasia. A idade, história familiar, diferenças étnicas, exposição aos androgênios e fatores relacionados à dieta constituem-se em fatores de risco para o CaP. O câncer de próstata hereditário está ligado a genes de alta concordância entre os familiares afetados, porém de baixa freqüência na população. A busca por genes que influenciam a carcinogênese prostática e que estejam presentes com maior freqüência na população poderá ajudar na identificação de pacientes com maior chance de desenvolver a neoplasia. Os polimorfismos são variações alélicas de um mesmo gene, resultando em diferenças significativas na expressão de proteínas em diferentes indivíduos. O gene do receptor de androgênios (RA) possui variantes polimórficas localizadas no exon 1. O número de repetições CAG nesta região está inversamente associada a atividade transcricional do receptor de androgênios e com um maior risco de CaP.

Objetivos: Verificar a associação entre o número de repetições do polimorfismo CAG do gene do receptor de androgênios e o risco de CaP em uma amostra da população brasileira.

Pacientes e métodos: Foram avaliados 50 pacientes com câncer de próstata e 77 controles. Foi realizada a extração do DNA por sangue periférico e a região do gene do RA foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR). O produto da PCR foi analisado no seqüenciador ABI3100 Avant e a seqüência do polimorfismo analisada pelo software Genemapper. A análise estatística foi feita através do teste *t* para amostras independentes, teste de qui-quadrado e análise

de regressão linear múltipla. Para variáveis sem distribuição normal foi utilizado o teste *U* de Wilcoxon-Mann-Whitney.

Resultados: A média de repetições CAG foi de $21,58 \pm 3,32$ nos pacientes e $22,19 \pm 3,09$ no grupo controle ($p=0,28$). Variáveis clínicas e anátomo-patológicas também não se correlacionaram com o polimorfismo. A testosterona sérica diferiu significativamente entre os grupos ($p < 0,001$).

Conclusão: Estes resultados sugerem que não há correlação entre o número de repetições CAG e o risco de CaP na amostra estudada. Outros fatores, tais como idade de diagnóstico e estadiamento do tumor também não estiveram associados com o polimorfismo no presente estudo. A variação da testosterona sérica precisa ser melhor avaliada em estudos específicos.

ABSTRACT

Background: Prostate cancer (PCa) is very frequent among men worldwide. In Brazil, Rio Grande do Sul state has one of the greatest incidence of this neoplasia. Age, family history, ethnicity, androgens and diet factors are involved in a higher risk for Pca. Hereditary prostate cancer is linked to high penetrance and low frequency genes in general population. Looking for genetic alterations with higher frequency among individuals could help identify patients under risk of developing PCa. Polymorphisms are allelic variations of a single gene, resulting in significant differences in proteins expression. The androgen receptor (AR) has polymorphic forms located on exon 1. The CAG repeat length in this region is inversely associated with the AR transcriptional activity and with a higher risk of PCa.

Objectives: To verify the association between CAG repeat length and PCa risk in a sample of the Brazilian population.

Patients and Methods: We included 50 PCa patients and 77 controls. DNA was extracted from peripheral leucocytes and the AR gene was amplified by PCR. PCR product was analysed with ABI 3100 avant sequencer and Genemapper software. Statistical methods were Student T test, Qui-square test and Linear Regression analysis. For variables without normal distribution, it was used the Wilcoxon-Mann-Whitney *U* test.

Results: CAG mean length was $21,58 \pm 3,32$ in cases and $22,19 \pm 3,09$ in control group ($p=0,28$). Clinical and pathological variables did not correlated with CAG polymorphisms either. Serum total testosterone differed significantly between groups ($p<0,001$).

Conclusion: Our results suggest that there is no correlation between the androgen receptor CAG repeat length and prostate cancer. Other factors, such as age of diagnosis and tumor stage are not associated with this polymorphism in this study. Serum total testosterone variation needs to be better explained in further reports.

LISTA DE ABREVIATURAS

CaP	Câncer de Próstata
CAG	Citosina, Adenina, Guanina
DHT	Dihidrotestosterona
GGC	Guanina, Guanina, Citosina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HDL	High Density Lipoprotein
HPC1	Hereditary Prostate Cancer 1
IC	Intervalo de Confiança
IGF-I	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I
ml	mililitro
μl	microlitro
mM	milimol
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PSA	Antígeno Prostático Específico
RA	Receptor Androgênico
RC	Razão de Chances
rpm	Rotações por minuto
RR	Risco Relativo

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em homens, sendo a sexta causa mais comum de câncer no mundo e o câncer mais comum em homens nos Estados Unidos e Europa.¹ O risco de desenvolver a doença é de 1 em cada 6 homens e o risco de morte pela doença é de 1 em 30.² Nos Estados Unidos, a incidência desta neoplasia atingiu seu pico no início dos anos 90, provavelmente refletindo o uso do antígeno prostático específico (PSA) como ferramenta de rastreamento, ocorrendo um declínio nos anos subsequentes. Nos últimos anos, houve uma nova elevação na incidência de CaP neste país. Em 2002, a incidência entre Afro-Americanos foi estimada em mais de 250 casos por 100.000 habitantes e entre caucasianos esta incidência é de, aproximadamente 175 casos por 100.000 habitantes, em dados ajustados para a idade.³ A estimativa para 2005, nos EUA, é de 232.000 novos casos da doença. Neste país, é a segunda causa mais freqüente de morte por câncer, porém a mortalidade vem reduzindo lentamente nos últimos anos.⁴ O número de mortes estimado para 2005 é de, aproximadamente, 30.000 mortes nos EUA e 8500 mortes no Reino Unido.⁵ No Brasil, a taxa de mortalidade bruta por câncer de próstata aumentou de 3,73/100.000 homens em 1979 para 8,93/100.000 homens em 1999.⁶ A incidência estimada para o ano de 2005 é de 43.000 novos casos. Os estados da região Sul e Sudeste apresentam uma freqüência maior do tumor. No Rio Grande do Sul, a estimativa de incidência da doença para 2005 é de 83,48 casos/100.000 habitantes, constituindo-se na mais alta taxa de incidência do país.⁷

Apesar dos dados acima sugerirem um aumento na taxa de detecção precoce da neoplasia, não há comprovação, até o momento, de que o rastreamento populacional, através da dosagem do PSA e a realização de toque

retal, diminua a mortalidade doença-específica. Especula-se também que um grande número de tumores detectado precocemente teria um comportamento indolente, não colocando a saúde do paciente em risco ou trazendo um prejuízo à qualidade de vida.⁸

Um melhor entendimento de como interpretar os valores de PSA e seus subtipos, o desenvolvimento de novos marcadores tumorais, assim como a identificação de fatores de risco e de grupos populacionais suscetíveis para o desenvolvimento do CaP mais precoce e de caráter mais agressivo, possibilitarão um melhor rendimento dos programas de rastreamento populacional, permitirão ao Urologista oferecer a terapia mais adequada para cada paciente e diminuirão, efetivamente, a morbimortalidade da doença.

Fatores de Risco para o Câncer de Próstata

Embora pouco se saiba sobre a etiologia do CaP, evidências sugerem a combinação de fatores genéticos e ambientais na iniciação e progressão do tumor.² A Idade, etnia e história familiar são fatores que influenciam, substancialmente, o risco de desenvolver o CaP.⁹ Fatores relacionados à dieta e ao metabolismo de hormônios androgênicos também contribuem para a carcinogênese prostática.²

Idade

O câncer de próstata é considerado uma doença do idoso. Oitenta e cinco por cento dos pacientes têm seu diagnóstico após os 65 anos de idade. Estudos de autópsia demonstraram que a maioria dos homens acima dos 85 anos apresenta câncer de próstata.¹ A incidência do CaP na faixa etária entre 50-59 anos vêm aumentando progressivamente, provavelmente em conseqüência do rastreamento

mais intenso realizado nestes pacientes nos últimos anos, tornando o CaP um problema de homens de meia-idade .¹⁰

Etnia

A incidência do câncer de próstata varia muito entre diferentes populações étnicas e países. As taxas mais baixas estão entre os países asiáticos e as mais altas na América do Norte e Escandinávia. Os afro-americanos apresentam uma incidência 1,5 vezes maior que os caucasianos daquele país e quase três vezes maior que homens de origem asiática.^{11,12} O risco de CaP aumenta entre os asiáticos quando eles imigram para a América do Norte, reforçando a idéia de que fatores ambientais atuam conjuntamente com fatores genéticos na carcinogênese.² A população brasileira apresenta características étnicas altamente heterogêneas, com grande miscigenação entre Europeus, Africanos e Ameríndios na sua constituição. Populações consideradas como sendo de raça branca, através de características físicas, apresentam uma significativa fração de traços genéticos característicos de africanos e ameríndios. O mesmo foi observado quando tentou-se identificar indivíduos da raça negra através da observação de características fenotípicas. A exceção foi encontrada na população da cidade de Veranópolis/RS onde existe uma manutenção dos traços genéticos que caracterizam ancestralidade européia.^{13,14} Em virtude dessas observações, a correlação entre a etiologia do CaP e a raça na população brasileira, torna-se uma tarefa difícil, senão sem relevância clínica.

Dieta

Fatores nutricionais são os principais fatores ambientais que podem influenciar o desenvolvimento da neoplasia prostática. Em uma recente meta-análise,

Dagnelie et al. mostraram, através da análise de estudos prospectivos, um papel protetor do selênio, licopeno, fitoestrógenos e, possivelmente, da vitamina E.¹⁵ Uma ingestão diária alta de cálcio (>2000 mg/dia) parece estar positivamente associada com o risco de CaP, assim como a dieta rica em ácidos graxos.⁹ A obesidade pode estar relacionada com o desenvolvimento de neoplasias mais agressivas.¹⁶

Androgênios

Os androgênios são importantes no desenvolvimento, maturação e manutenção da próstata, afetando a proliferação e diferenciação epitelial;¹⁷ desempenhando também um papel importante no crescimento do câncer de próstata. Evidências deste fato surgiram a partir da indução de carcinogênese prostática em modelos animais através de estimulação hormonal e do fato que homens castrados antes da puberdade e pacientes com deficiência da enzima 5 α -redutase não desenvolvem CaP.¹⁸ Além disso, a terapia andrógeno-ablativa inibe o crescimento do câncer de próstata durante um certo período, antes da neoplasia tornar-se refratária ao bloqueio androgênico.¹⁹ Contudo, estudos clínicos apresentam achados conflitantes em relação aos níveis séricos e celulares de testosterona e seus metabólitos, e o risco de CaP. Vários estudos prospectivos, reunidos em uma meta-análise, não encontraram diferenças nos níveis séricos de testosterona, dihidrotestosterona (DHT) e androstanediol em pacientes com CaP e controles. Destes, somente um estudo de caso-controle observou uma associação positiva entre os níveis de testosterona e androstanediol em pacientes com neoplasia prostática, enquanto os níveis de SHBG e estradiol correlacionaram-se negativamente neste grupo. Em alguns destes estudos, o risco de CaP foi maior nos pacientes com maior relação testosterona: DHT.¹⁷ Apesar de trabalhos bem

conduzidos, ainda não há uma demonstração da relação direta entre os níveis de andrógenos circulantes e neoplasia prostática e de que maneira o nível sérico do hormônio reflete o nível intraprostático do mesmo. Adicionam-se a isso, as dificuldades que são causadas por questões técnicas, por exemplo, o momento do dia em que a dosagem hormonal foi realizada e a própria variação fisiológica individual da liberação da testosterona circulante. O momento da vida do indivíduo em que a exposição aos andrógenos influencia a carcinogênese é outro ponto a ser esclarecido.^{1,17}

Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (Insulin-Like Growth Factor – I (IGF-I))

O IGF– I é um peptídeo que regula a proliferação, diferenciação e apoptose das células neoplásicas. Altas concentrações do IGF– I estão relacionadas com um aumento no risco de desenvolver CaP¹, indicando uma possível interação com fatores nutricionais. Uma dieta rica em ácidos graxos aumentaria a necessidade de produção insulínica, sendo um estímulo para a produção deste fator de crescimento.

História Familiar

A história familiar é um fator de risco estabelecido para o câncer de próstata. Homens com um familiar em primeiro-grau acometido pela doença têm uma chance duas vezes maior de desenvolver CaP. Esta chance eleva-se em até 11 vezes se há 2 ou 3 membros da família acometidos. Homens com um irmão com CaP têm maior probabilidade de ter a neoplasia em relação àqueles cujo pai teve a doença.¹⁰ A presença de história familiar também foi associada ao surgimento mais precoce da doença, o que levou à recomendação de avaliação mais precoce

desses pacientes. Apesar desta forte associação, apenas 5 – 10% dos casos de câncer de próstata estão ligados a genes de alta penetrância.²⁰

Outros Fatores

Estudos sobre outros fatores como tabagismo, álcool, atividade sexual e vasectomia prévia não foram conclusivos.²¹

Aspectos Genéticos do Câncer de Próstata

Estudos de frequência de neoplasias entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos mostraram uma taxa de concordância alta entre gêmeos monozigóticos no desenvolvimento de CaP. Nos países nórdicos, a hereditariedade estimada para o CaP foi de 42%. Estudos em outras populações, com análise específica na raça branca, confirmaram a característica autossômica dominante de genes de alto risco e penetrância. Porém a ocorrência destes genes nestas populações é bastante baixa. Lócus suscetíveis para o CaP foram identificados nos cromossomos 1, 8,17,20 e X.¹

Localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q 24-25), o HPC1 (Hereditary Prostate Cancer 1) foi o primeiro, e mais amplamente estudado, lócus relacionado ao câncer de próstata. Vários genes estão sendo avaliados como responsáveis pelo CaP nesta região.²² Mutações no gene RNASEL, entre outros, podem estar relacionadas com hereditariedade no CaP. O International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG) mostrou uma ligação do HPC1 com o CaP em apenas 6% das famílias estudadas.¹ Estas famílias apresentavam vários membros com a doença e uma idade média de diagnóstico abaixo dos 65 anos.

Estudos com outros loci suscetíveis, como o PCAP (1q42.2 –q43), HPCX (Xq27-q28), CAPB (1p36) e HPC20 (20q13)^{23,24}, apresentam achados semelhantes, ou seja, uma forte concordância entre os familiares afetados, naqueles onde o locus foi identificado, porém uma baixa frequência dos mesmos na população em geral. A confirmação de outros loci, por exemplo o ELAC2/HPC2 (17p11), tem sido difícil e reflete a dificuldade de identificar a predisposição genética em doenças complexas e, ao mesmo tempo muito frequentes.²⁵⁻²⁷

Em torno de 90% dos tumores de próstata não são originados por herança familiar. Os chamados tumores esporádicos também não possuem um entendimento claro sobre o mecanismo molecular que origina a carcinogênese prostática, nem se este mecanismo é semelhante ao dos tumores de origem familiar. Mutações em genes localizados em diferentes regiões do cromossomo 8 candidatam-se como iniciadores e/ou promotores do CaP esporádico. Acredita-se que genes de baixa penetrância, mas de ocorrência muito mais comum na população também contribuam para o surgimento de neoplasias.¹⁰

O receptor de androgênios

O receptor de androgênios (RA) pertence à superfamília dos receptores esteróides. Como outros membros desta família de receptores, a função de transativação é dependente do seu ligante, no caso do RA, os androgênios.^{28,29} O RA é composto de um domínio C-terminal de ligação do hormônio, um domínio central de ligação do DNA e um domínio N-terminal que influencia na eficiência da transcrição.^{30,31}

A testosterona é transportada para a célula através de proteínas carreadoras e difunde-se através da membrana plasmática. A testosterona é convertida em

DHT através da ação da enzima 5 α -redutase. O DHT liga-se ao RA e forma um complexo que ativa o receptor. Uma vez ativado, o receptor dirige-se ao núcleo, dimeriza-se e liga-se a seqüências específicas em regiões regulatórias de genes alvo. A Figura 1 mostra de maneira esquemática a ação dos andrógenos.³⁰

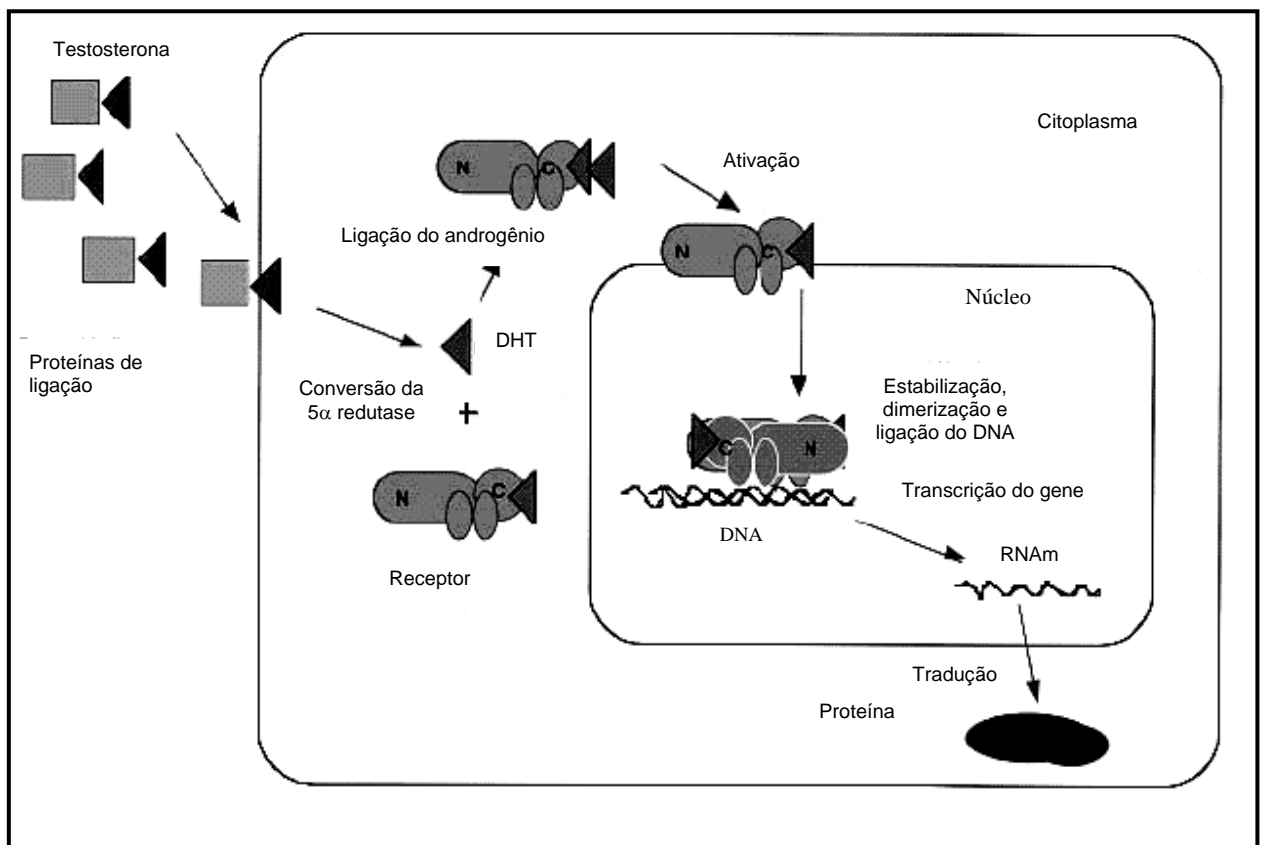


Figura 1. Diagrama esquemático dos eventos na ação androgênica. DHT, dihidrotestosterona. Adaptado de Choong CS, 1998.³⁰

Em conjunto com co-fatores e fatores de transcrição, o RA regula o crescimento e a diferenciação da célula prostática, além de ativar a expressão de outros genes e o transporte dos androgênios.¹⁹

O gene do RA está localizado no cromossomo X (Xq 11-12), e possui oito exons. (Figura 2). O domínio de ativação transcricional N-terminal é codificado pelo exon 1. Os exons 2 e 3 codificam o domínio de ligação do DNA, e os exons de 4 a 8 codificam o domínio de ligação do hormônio esteróide. Os domínios de ligação do DNA e do hormônio esteróide permaneceram conservados através da evolução, enquanto que a região N-terminal de transativação é altamente polimórfica.³²

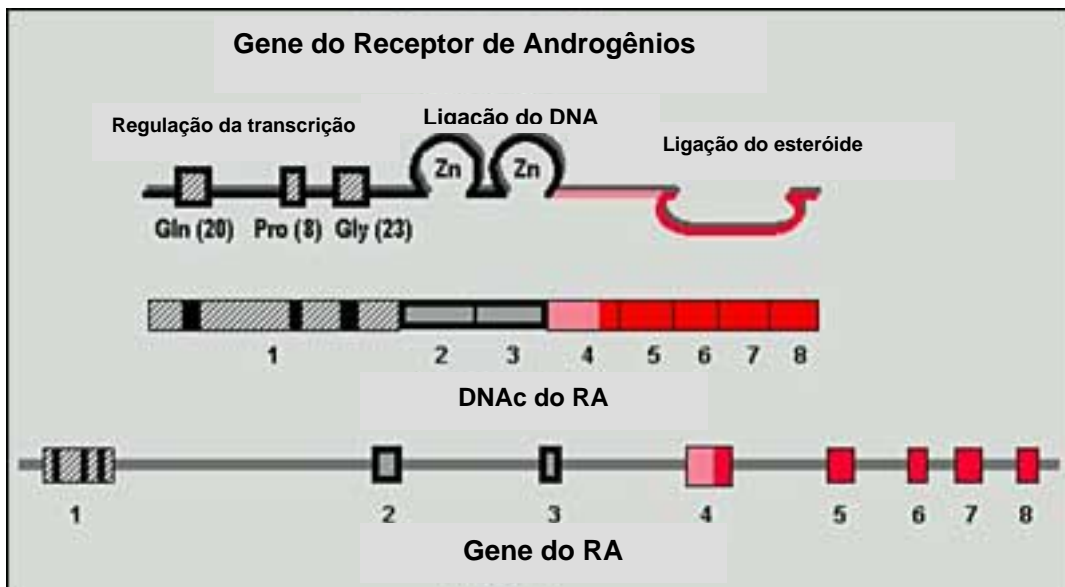


Figura 2. Desenho esquemático do gene do receptor de androgênios. Adaptado de Josso N, Rey R, Gonzaléz J. Pediatric Endocrinology: Sexual Differentiation, no endereço eletrônico WWW.ENDOTEXT.ORG. Acesso em setembro de 2005.

Polimorfismos Genéticos

Polimorfismos são variantes genéticas que ocorrem em pelo menos 1% da população. Variantes polimórficas significam diferenças alélicas no gene e, conseqüentemente, diferenças na função das proteínas. São exemplos de polimorfismos os grupos sanguíneos ABO, o fator Rh e o complexo de histocompatibilidade maior. A análise dos polimorfismos genéticos permite analisar o grau de diversidade genética em uma determinada população. Os polimorfismos podem ocorrer pela troca em um único nucleotídeo no gene (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) ou pela presença de grandes variações no número de repetições de trinucleotídeos, encontrados em alguns indivíduos, mas não em outros (Polimorfismos de Números de Cópias).³³ Enquanto a maioria das repetições de trinucleotídeos ocorrem em seqüências não codificadoras do genoma, portanto sem influência na expressão do gene, aqueles localizados em regiões codificadoras podem influenciar a expressão do gene, modular a estrutura do RNAm e alterar a função das proteínas resultantes.³⁴

Os polimorfismos de genes que estão envolvidos na cascata do metabolismo dos androgênios podem influenciar geneticamente o risco de câncer de próstata. A variação polimórfica da seqüência do DNA destes genes altera a função das proteínas envolvidas no metabolismo dos androgênios e pode resultar em diferenças no risco e apresentação da doença; assim como a distribuição destes polimorfismos, de maneira variável nos diversos grupos populacionais pode implicar em diferentes prevalências da neoplasia.²⁰

Os polimorfismos mais estudados, envolvidos na ação androgênica, são os polimorfismos dos genes do RA, do citocromo P-450 (CYP), da vitamina D (VDR), do PSA e da 5 α -redutase tipo II (SRD5A2).³⁵⁻³⁷

Variantes polimórficas localizadas no exon 1 do gene do RA alteram a atividade transcricional do mesmo, modificando a regulação da ação do androgênio nos tecidos, inclusive na próstata. Nesta localização, encontram-se os tratos poliglutamínico e poliglicínico, que são codificados por dois segmentos polimórficos de repetições de trinucleotídeos, CAG (citosina, adenina, guanina) e GGC (guanina, guanina, citosina), respectivamente.³¹

Polimorfismo CAG do receptor androgênico

O número de repetições do CAG é altamente polimórfico. A média na população é de 20 a 23 repetições, variando entre 8 a 35. A ocorrência de 40 repetições ou mais está associada com desordens neurodegenerativas, como por exemplo, a atrofia muscular espinhal e bulbar ou Doença de Kennedy.^{20,38}

Variações mais longas do polimorfismo diminuem a atividade de transativação e afinidade de ligação dos androgênios. Estudos experimentais em ratos confirmaram esta hipótese. Quando o trato poliglutamínico era deletado, a atividade de transativação do RA aumentava. Quando espécies com 35 a 77 repetições CAG eram geradas, uma relação inversa ocorria.³⁹ A associação do menor número de repetições CAG e maior atividade do receptor de andrógenos também foi demonstrada *in vitro* por Mahtre et al.⁴⁰ Variações mais curtas do trato poliglutamínico tornam a célula prostática mais sensível à ação dos andrógenos, podendo aumentar o risco de câncer de próstata pela hiperestimulação crônica a este hormônio.²⁰ Outros estudos têm relacionado o número de repetições CAG com a hiperplasia benigna da próstata (HBP), e infertilidade.^{41,42} A média de repetições em afro-americanos tende a ser ligeiramente mais baixa quando comparada à média da população caucasiana, assim como populações asiáticas possuem média mais altas comparadas às outras populações estudadas,

coincidindo com o padrão de distribuição do CaP no mundo.^{20,43} Na população brasileira, Ribeiro M.L. et al. encontraram uma média de 20,65 repetições CAG em um grupo de doadores de sangue do interior de São Paulo, não havendo distinção, na análise, de características étnicas.²¹

Vários estudos foram realizados, em diferentes populações, avaliando o número de repetições CAG e o risco de CaP, apresentando resultados conflitantes.

Giovanucci et al., em um estudo de caso-controle, avaliou pacientes de origem caucasiana, com e sem CaP, encontrando um risco relativo (RR) = 1,52 – intervalo de confiança (IC) 0,92 – 2,49, $p=0,04$ em pacientes com repetições CAG ≤ 18 quando comparados com pacientes com repetições CAG ≥ 26 . O RR elevou-se para 2,14 (IC 1,14–4,01) $p=0,001$ para pacientes com doença extraprostática, metástases à distância ou escore de Gleason ≥ 7 .⁴⁴ Em um estudo de casos (N=109), analisando uma população americana com predomínio de caucasianos, foi verificada uma relação entre um número menor de repetições e a idade mais precoce de diagnóstico da neoplasia.⁴⁵ Ingles et al. encontraram um risco maior de desenvolver CaP em pacientes com menos de 20 repetições comparados com pacientes com 20 ou mais repetições, com uma razão de chances (RC) = 2,1 (IC 1,11 – 3,99).⁴⁶

A avaliação de outras populações mostrou que a ocorrência de menores repetições CAG é mais freqüente em pacientes com CaP, tanto em grupos com médias de repetições mais baixas (afro-americanos), quanto naqueles com médias mais altas (asiáticos).⁴⁷⁻⁵⁰

Por outro lado, Correa-Cerro et al. analisando a variabilidade dos trinucleotídeos em estudo de caso-controle em uma população Franco-Germânica, não identificou predisposição relacionada ao CaP.⁵¹ Estes achados também foram reproduzidos em estudos similares em diferentes populações.⁵²

Em trabalhos avaliando predisposição familiar e o polimorfismo CAG, não houve diferença no risco de neoplasia quando comparados casos com história familiar positiva e CaP esporádico.⁵³

Um único estudo brasileiro, avaliando uma amostra da população do estado de São Paulo (133 casos, 279 controles), não encontrou diferenças entre o número de repetições CAG e o risco de CaP, porém houve uma correlação significativa entre a idade mais precoce de diagnóstico (≤ 55 anos) e um número de repetições menor ou igual a 21.⁵⁴

Uma recente meta-análise analisou 19 estudos de caso-controle, compreendendo um total de 4274 casos e 5275 controles. A presença de menores repetições CAG apresentou uma associação positiva com CaP (RC 1,19; 95%IC 1,07-1,31), porém com uma diferença absoluta de risco menor que uma repetição. O estudo interroga se esta diferença modesta alcançaria, efetivamente, um impacto biológico no desenvolvimento do CaP.⁹

Na tentativa de tornar mais claro o entendimento da participação do polimorfismo CAG no câncer de próstata, Freedman et al. analisaram o polimorfismo utilizando participantes do Multiethnic Cohort Study (MEC), uma coorte que envolve pacientes dos estados da Califórnia e Havaí, nos Estados Unidos. Foram identificados 2036 pacientes com câncer de próstata e, aleatoriamente, selecionados 2160 controles. Os pacientes incluídos foram subdivididos pela característica étnica (ancestralidade autodeclarada) em Afro-Americanos, Japoneses, Latinos e Brancos. Não houve correlação entre o número de repetições CAG e o risco de CaP, tanto na análise de regressão logística (repetições como variável contínua), quanto utilizando diferentes pontos de corte (< 22 , ≥ 22 ou 23 , ≥ 23). Esta ausência de correlação foi identificada analisando os grupos étnicos separadamente e em conjunto.⁵⁵

A relação entre o número de repetições CAG e o nível sérico de testosterona e seus metabólitos também possui resultados divergentes na literatura.^{42,56}

Polimorfismo GGC do receptor androgênico

A segunda região polimórfica do exon 1 do cromossomo X é o trato poliglicínico. Ainda não tão amplamente estudada como o polimorfismo CAG, nesta região ocorre uma variação no número de repetições de trinucleotídeos, inicialmente identificada como GGN ($GGT_3GGG_1GGT_2GGC_n$). A análise deste segmento demonstrou que não há mutações ou variações polimórficas nas regiões GGT e GGG, sendo a região GGC variável.⁴⁷ Esta variante polimórfica GGC no trato poliglicínico também teria influência na função de transativação do RA, regulando a ação do androgênio sobre a célula prostática. A média de repetições do GGC é de 17 (GN=23), ocorrendo na maioria da população.⁴⁷ Embora o número de repetições GGC não seja tão variável quanto os encontrados no trato poliglutamínico, alguns estudos demonstraram que há uma correlação inversa entre o número de repetições do polimorfismo GGC e o risco de CaP, sendo que este risco pode ser de maior magnitude que o CAG. Stanford et al., em um estudo de caso-controle de base populacional em caucasianos entre 40-60 anos, encontrou um risco maior de desenvolver CaP (RC=1,6 - 95% IC 1,07-2,41) nos pacientes com 16 repetições ou menos comparados com pacientes com mais de 16 repetições.⁵⁷ Achados semelhantes foram encontrados em outro estudo de caso-controle envolvendo 159 pacientes com CaP hereditário, 245 pacientes com CaP esporádico e 211 controles.⁵³ Outros trabalhos mostraram resultados inconsistentes na diferença entre casos e controles e o risco de CaP.^{47,58-59} Até o presente momento, não há estudos correlacionando o polimorfismo GGC e o risco de CaP na população brasileira.

Na mesma meta-análise citada anteriormente, oito estudos de caso-controle que avaliaram o polimorfismo GGC foram incluídos. A associação entre menores repetições GGC e CaP foi positiva, também modesta, mas de maior magnitude que o CAG (RC 1,31; 95%IC 1,06-1,61).⁹

Interação entre polimorfismos

Quando analisada a associação do número de repetições CAG e GGC e o risco de CaP, os achados também são conflitantes. Stanford encontrou um aumento no risco de CaP em homens com CAG < 22 e GGC ≤ 16 repetições (RC 2,05).⁵⁷ Outro estudo encontrou um risco de CaP no grupo com < 23 repetições CAG e ≥ 17 repetições GGC.⁴⁷ Chang et al., não encontrou associação entre os grupos CAG e GGC, independentemente do número de repetições, exceto quando comparados o grupo de pacientes com CaP familiar com o grupo controle, onde o grupo com repetições CAG ≥ 22 e GGC ≤ 16 apresentou um risco maior de CaP.⁵³ A razão para estas discrepâncias entre os resultados não fica clara. Não há análise da interação entre estes polimorfismos na população brasileira.

Outra interação entre polimorfismos relacionados ao receptor androgênico é a correlação entre o número de repetições CAG e a variação polimórfica entre os alelos do gene do PSA. O gene do PSA apresenta 2 alelos, A e G, com diferentes afinidades com o RA. Alguns estudos mostraram um risco maior de CaP ou de doença mais agressiva nos pacientes que apresentavam repetições do CAG menores que 20 e o genótipo G/G do gene do PSA.⁶⁰⁻⁶²

Os polimorfismos de genes importantes para o desenvolvimento e função da próstata podem resultar em diferenças significativas na expressão de proteínas envolvidas na fisiologia normal da célula, modificando o seu funcionamento. Estas variações também podem ser influenciadas por fatores ambientais ou pela

interação entre diferentes polimorfismos. Polimorfismos associados com CaP são muito mais comuns na população do que os genes de suscetibilidade de alta penetrância.²⁰ Portanto, a identificação de marcadores de risco para o CaP que apresentem uma frequência alta em diferentes populações torna-se um grande atrativo e traz a possibilidade de um rastreamento populacional mais efetivo e do reconhecimento precoce de pacientes sob risco de desenvolver a neoplasia.

A população do estado do Rio Grande do Sul, como já abordado anteriormente, apresenta uma alta incidência desta doença. É provável que fatores genéticos, ambientais ou a interação entre eles propiciem um risco aumentado para esta população. A avaliação dos polimorfismos do gene do RA, que apresentam uma frequência maior que os genes de alta penetrância do CaP hereditário, em uma população de risco com características étnicas bastante heterogêneas pode ajudar a demonstrar a real participação destes polimorfismos na carcinogênese prostática, atuando isoladamente ou interagindo com outros polimorfismos e com fatores ambientais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a associação do polimorfismo CAG do gene do receptor de androgênios com o risco de câncer de próstata em uma amostra da população brasileira.

Objetivos específicos

1. Avaliar a distribuição do número de repetições do polimorfismo CAG em uma amostra de indivíduos com câncer de próstata e em um grupo controle;
2. Correlacionar o número de repetições do polimorfismo CAG com características clínicas e laboratoriais em indivíduos com câncer de próstata e em um grupo controle;
3. Correlacionar o número de repetições do polimorfismo CAG com características anátomo-patológicas do câncer de próstata.

PACIENTES E MÉTODOS

Delineamento

Estudo de caso-controle, prospectivo.

Pacientes

Casos – Pacientes provenientes do ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com idade entre 45 e 80 anos, com diagnóstico de câncer de próstata, que não tenham recebido tratamento com hormonioterapia ou quimioterapia e que não possuam diagnóstico de outra neoplasia concomitante.

Controles – Pacientes provenientes do ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e indivíduos voluntários, com idade entre 45 – 80 anos, com dosagem sérica do PSA menor ou igual a 2,0 ng/ml, exame de toque retal normal e sem diagnóstico de outra neoplasia concomitante.

Métodos

Os pacientes com diagnóstico de câncer de próstata entre os anos de 2003 a 2005 foram recrutados a partir dos registros do ambulatório do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os controles, que preenchem os critérios de inclusão do estudo, foram obtidos através do recrutamento de pacientes do ambulatório de Urologia do HCPA ou foram recrutados através de um banco de dados de indivíduos voluntários que participaram de atividades de prevenção de câncer de próstata no mesmo hospital.

Esses indivíduos realizaram dosagem de PSA total naquela ocasião. Os pacientes foram contatados por telefone e encaminhados para atendimento em ambulatório específico desta pesquisa. Todos os pacientes foram atendidos no período entre Setembro/2004 a Maio/2005. Inicialmente eram explicados os objetivos e os procedimentos da pesquisa e aplicado termo de consentimento livre e esclarecido. (Anexos 1 e 2) Após, era realizada coleta de sangue venoso periférico (5 ml) para avaliação dos polimorfismos. Os pacientes eram orientados a procurar o laboratório de análises clínicas do HCPA para coletar, na semana seguinte, outra amostra sangüínea para dosagem sérica de testosterona total, colesterol total, colesterol HDL e triglicerídios. Era realizada entrevista e preenchida ficha para coleta de dados (Anexo 3) referentes a dados pessoais e demográficos, história médica e familiar, idade de diagnóstico, estágio e grau do tumor, volume da próstata e valor do PSA na época do diagnóstico.

Os controles realizaram procedimentos semelhantes. Após a explicação dos objetivos da pesquisa e aplicação do termo de consentimento, era realizado exame de toque retal para complementação dos critérios de inclusão. A realização dos exames sangüíneos foi idêntica àquela feita pelos pacientes com câncer de próstata. Os dados relacionados aos dados de identificação e informações da história clínica eram registrados em ficha específica (Anexo 4).

O projeto foi submetido e aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, registro 04-064, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição. Como o estudo envolvia pesquisa em Genética Humana, o projeto foi apreciado e aprovado também pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

Todos os procedimentos laboratoriais envolvidos na análise dos polimorfismos foram realizados no Laboratório de Endocrinologia Molecular e

Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Extração do DNA

Foi realizada a extração do DNA genômico a partir de leucócitos periféricos obtidos das amostras de sangue de todos os participantes do estudo. As amostras eram coletadas em tubos com EDTA (EDTA 25 mM). Após era realizada a lise de hemácias com 2 volumes de solução para lise de hemácias (NH₄Cl 114 mM, NH₄HCO₃ 1mM) e incubada a solução a 4°C por 30 min. Centrifugava-se a solução por 15 min, 3000rpm, desprezando-se o sobrenadante. Repetia-se mais uma vez a lise de hemácias. Realizava-se, então, a lise de leucócitos com 1,8 mL de solução específica (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0), 36 µl de SDS a 10% e 30 µL de Proteinase K (10 mg/mL). Homogeneizava-se a solução e incubava-se a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após a incubação, era adicionada à solução 0,72 ml de solução saturada de NaCl (6M) e a mesma era centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Transferia-se o sobrenadante e acrescentavam-se 2 volumes de etanol absoluto gelado para precipitar o DNA. O DNA era retirado e colocado em tubo Eppendorf contendo 0,9 mL de etanol 70% gelado e a solução era centrifugada por 3 minutos a 140000 rpm. Esta manobra era repetida por mais duas vezes. Subseqüentemente, desprezava-se o sobrenadante, o álcool era evaporado no ar ambiente, permanecendo o *pellet* de DNA. O DNA era re-suspendido em tampão TE 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação das repetições CAG do RA

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 50µl. Um µl de DNA genômico foi denaturado a 96°C por 2 minutos na presença de 20 mM de TrisHCL pH 8,4 com 50 mM de KCL e 1,5 mM de MgCl₂. Após este “hot start”, 1,25 U de Taq DNA polimerase foi adicionada junto com o mesmo tampão Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM de *primers sense* e *antisense* e 0,2 mM de dNTP mix

As reações de PCR foram realizadas utilizando *primers* específicos da região polimórfica CAG do RA: *sense* 5' TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC 3' marcado com corante fluoresceínico FAM e *antisense* 5' GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT 3'.

As amplificações foram realizadas utilizando termociclador automático (MJ Research, Waltham, MA,USA) nas seguintes condições: “hot start”, 2 minutos a 96°C; 3 ciclos com temperatura de anelamento de 61°C; 3 ciclos com temperatura de anelamento de 59°C e 25 ciclos com temperatura de anelamento de 55°C. A qualidade dos produtos da PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 3).

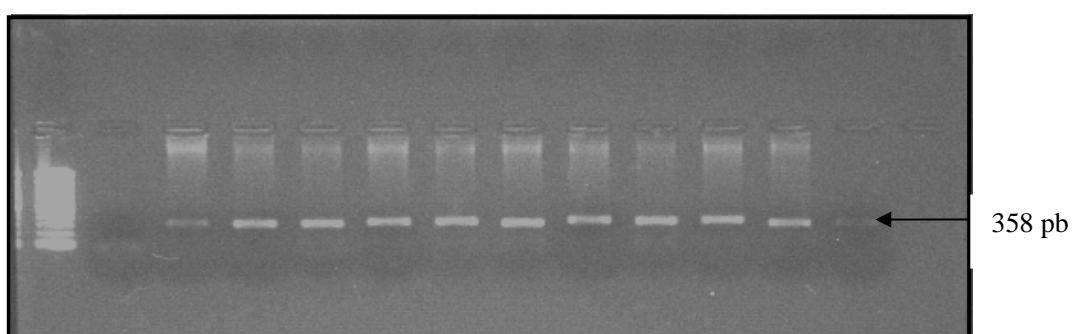
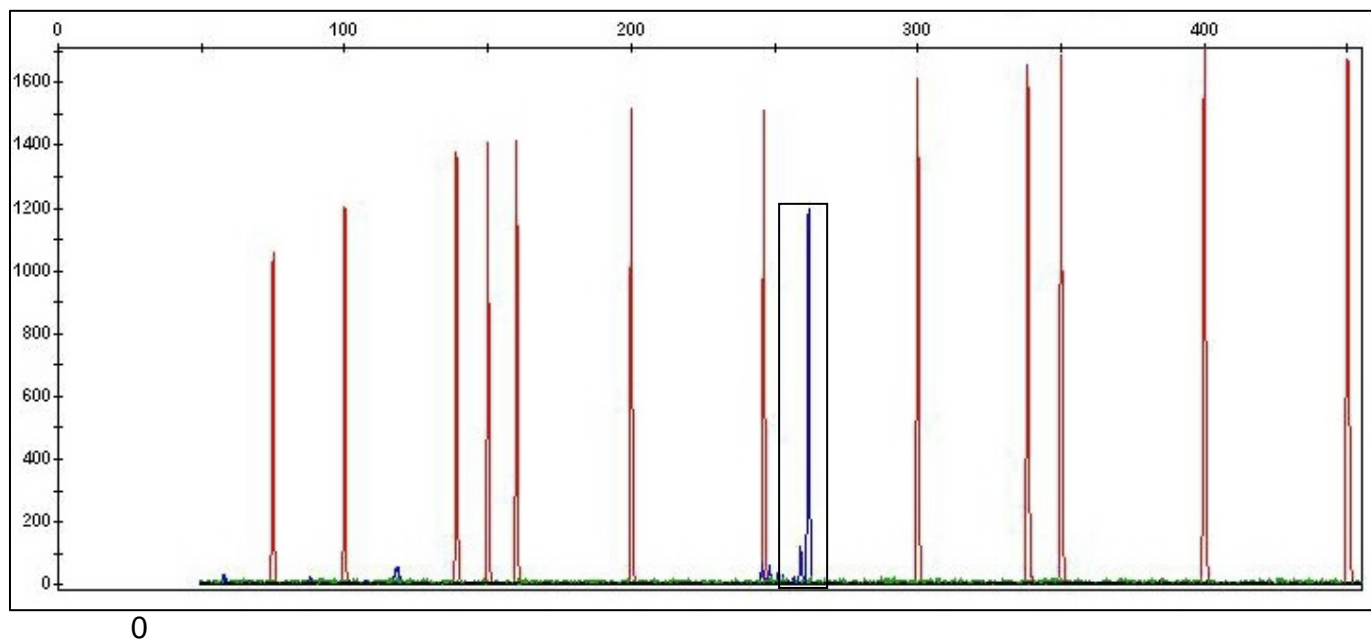


Figura 3 – Amplificação do produto da PCR analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Cada produto da PCR foi diluído em água (10x) para análise e 2 μ l foram misturados com formamida deionizada e um marcador de peso molecular fluorescente. [GeneMapper 500HD (ROX) Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA]. Após denaturação por 1 minuto a 95°C, cada amostra foi analisada por eletroforese capilar no seqüenciador automático ABI 3100 AVANT. A análise do fragmento amplificado foi realizada pelo software Genemapper versão 3.5 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) (Figura 4). O número de repetições CAG foi calculado a partir do tamanho do produto de PCR em relação a uma série de padrões obtidos por seqüenciamento direto de produtos de PCR.



0
Figura 4 – Análise do fragmento amplificado realizada pelo software Genemapper.

Análise Bioquímica

Os procedimentos de dosagem do PSA total, testosterona total e perfil lipídico foram realizados no laboratório de análises clínicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A análise do PSA total foi realizada através do método de eletroquimioluminescência, equipamento Elecrys 2010, kit Roche para PSA.

A testosterona total foi dosada por radioimunoensaio, kit DSL (Diagnostic Systems Laboratory INC.)

O colesterol total, HDL e triglicerídios foram analisados através de método enzimático colorimétrico, equipamento Hitachi 917.

Análise Estatística

Cálculo de tamanho de amostra:

Inicialmente foi calculado o tamanho da amostra através do programa PEPI 3, utilizando-se dados de um estudo de Santos et al, que avaliou o polimorfismo CAG e constitui-se no único trabalho que analisou uma amostra populacional brasileira (13). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90%, diferença entre as médias = 2 repetições e diferenças entre os desvios-padrão entre os grupos = 1 repetição, chegando-se a um n de 49 pacientes por grupo.

Foi feita a elaboração do banco de dados através do programa Excel e a análise estatística pelo programa SPSS versão 12.0 .

Foi realizada análise de distribuição de freqüências para o polimorfismo CAG. As variáveis contínuas foram comparadas através de teste t para amostras independentes. O teste de qui-quadrado foi utilizado para análise entre variáveis categóricas. Foi utilizada análise de regressão linear múltipla para verificação da correlação entre variáveis independentes. Para variáveis sem distribuição normal

foi utilizado o teste *U* de Wilcoxon-Mann-Whitney. O nível de significância foi de 95%.

Financiamento

Este projeto foi realizado utilizando recursos do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) e do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, além da infra-estrutura disponível no Laboratório de endocrinologia molecular e neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da UFRGS.

RESULTADOS

Características da população estudada

Foram avaliados 150 pacientes no ambulatório específico para o estudo, sendo cinquenta pacientes e 100 indivíduos para o grupo controle. Todos os pacientes com CaP preenchem os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo. No grupo controle, 23 pacientes foram excluídos, na sua grande maioria devido ao valor do PSA. O total de pacientes foi 127 (50 casos, 77 controles). A tabela I mostra os principais dados relativos ao perfil clínico e metabólico da população estudada. A idade média do grupo com CaP foi mais alta, variando entre 50 a 75 anos. O grupo controle apresentou idades entre 45 e 79 anos. A diferença entre as médias foi estatisticamente significativa ($p=0,02$). Houve predominância de pacientes com raça branca (observada pelo examinador), perfazendo 75% do grupo casos e 80% do grupo controle, sem diferença estatística entre os grupos. Os casos tiveram uma frequência maior de história familiar positiva para o CaP (30%) com significância limítrofe ($p=0,051$). Com relação aos exames laboratoriais, os grupos apresentaram análise do perfil lipídico semelhante, não havendo diferenças entre as dosagens de colesterol total, HDL e triglicéridios entre eles. O valor médio de testosterona total foi maior no grupo controle ($4,70 \pm 1,35$ ng/dl) e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,001$) em relação aos casos ($3,84 \pm 1,43$ ng/dl). A dosagem sérica de PSA total e a avaliação do volume prostático foram maiores no grupo com neoplasia, apresentando diferença significativa entre as médias.

Tabela I. Principais características da população em estudo (n=127)

	Casos (n=50)	Controles (n=77)	p
Idade (anos)	63,84±6,3	60,95±7,39	0,02
Raça (branca)	36 (75%)	60 (80%)	NS
Testosterona (ng/dl)	3,84±1,43	4,70±1,35	0,001
PSA (ng/ml)*	8,88±5,3	0,8±0,35	<0,001
Colesterol total (mg/dl)	198,45±43,1	192,66±33,13	NS
HDL (mg/dl)	46,2±14,1	45,3±10	NS
Triglicerídios (mg/dl)*	162±137	166±148	NS
Volume (cm ³)*	37,3±17	22,9±12,5	<0,001
História Familiar CaP	15 (30%)	11 (15,3%)	0,051

Os valores são expressos como média ± desvio-padrão. NS, não significativo

* Variáveis sem distribuição normal.

Características dos pacientes relacionadas ao estadiamento do CaP

Entre os casos, 35 pacientes (70%) apresentavam escore de Gleason = 6, enquanto o restante do grupo apresentava escore de Gleason ≥ 7 . O estadiamento patológico foi dividido em dois grupos: CaP localizado (T2 – tumor confinado à próstata) e CaP extraprostático (T3 – tumor extracapsular ou invasão de vesícula seminal ou T4 – invasão de órgãos adjacentes). Vinte e cinco pacientes (50%) possuíam exame anátomo-patológico da peça cirúrgica da Prostatectomia Radical com a neoplasia restrita à próstata. Três pacientes (6%) foram tratados exclusivamente por radioterapia, não possuindo dados sobre o estágio patológico da doença.

Características da amostra relacionadas ao polimorfismo CAG

A distribuição de freqüências do número de repetições do polimorfismo CAG nos dois grupos é mostrada na Figura 5. A variação no número de repetições nos pacientes foi de 14 a 30 repetições, com a média = $21,58 \pm 3,32$ e mediana = 21. Doze pacientes (24%) deste grupo tinham 21 repetições CAG. O grupo controle apresentou variação do número de repetições entre 16 a 31, com média = $22,19 \pm 3,09$ e mediana = 22. Quinze pacientes (19,5%) apresentavam 21 repetições. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos ($p=0,28$).

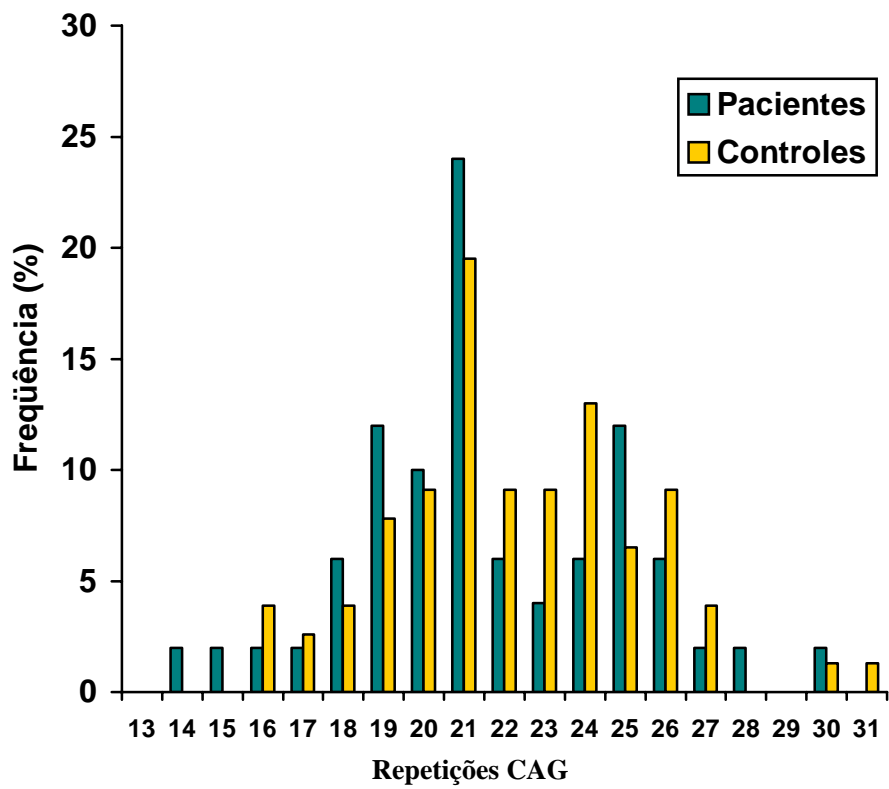


Figura 5. Distribuição da frequência de repetições do CAG nos casos e controles.

Os dois grupos foram divididos, em relação ao número de repetições CAG, em diferentes subgrupos. A divisão foi feita entre os percentis 25/75, criando-se os grupos com ≤ 19 repetições, 20 –23 repetições e ≥ 24 repetições. A tabela II descreve os resultados desta análise. A distribuição entre os subgrupos foi bastante uniforme e, apesar dos pacientes apresentarem uma frequência maior de repetições CAG inferior a 19, esta diferença não foi significativa, assim como todas as outras comparações entre os subgrupos.

Tabela II. Distribuição do número de repetições do CAG categorizadas por tertis.

Repetições CAG	N total	Casos	Controles	<i>p</i> *
≤ 19	26	13 (26%)	13 (17%)	NS
20-23	58	22 (44%)	36 (47%)	NS
≥ 24	43	15 (30%)	28 (36%)	NS

Valores expressos em número (porcentagem dos pacientes).

* Valor de *p* para comparação da distribuição dos casos e controles entre os tertis, obtido por teste de qui-quadrado 3x2.

Esta análise por subgrupo também foi realizada dividindo-se a amostra entre casos e controles e repetições CAG ≤ 19 e >19 , CAG ≤ 21 e >21 e CAG ≤ 23 e >23 . Foi realizado teste de qui-quadrado para comparação de distribuição entre os grupos, não havendo diferença significativa em nenhuma das análises de subgrupo acima mencionadas.

Polimorfismo CAG e características clínicas no grupo CaP

Os pacientes foram comparados com relação ao número de repetições CAG e a idade de diagnóstico do CaP. Não houve diferença significativa entre o número de repetições CAG (≤ 19 e >19 , ≤ 21 e >21) e a idade média de diagnóstico dos pacientes. Quando subdivididos os grupos por idade (≤ 55 e >55 anos) e comparados com o número médio de repetições CAG também não houve diferença entre os grupos, porém cabe ressaltar que a média de repetições CAG foi de 19,57 no grupo com idade de diagnóstico de 55 anos ou menos (14% dos pacientes), enquanto a média no grupo com idade acima de 55 anos foi 21,91 repetições ($p=0,08$).

A proporção de pacientes com repetições CAG menor ou igual a 19 foi exatamente igual entre os pacientes quando considerada a classificação por raça. Não houve diferença entre os grupos quando utilizados outros pontos de corte (21 e 24 repetições).

Polimorfismo CAG e características anátomo-patológicas

O número de repetições CAG foi analisado considerando características anátomo-patológicas do tumor (Tabela III). Quando comparados o escore de Gleason (6 vs. ≥ 7) e o número de repetições CAG, não foi identificada diferença entre os grupos. Da mesma forma, não foi encontrada relação entre tumores com acometimento extraprostático e o número de repetições CAG.

Correlação da testosterona sérica e repetições CAG

Como visto na Tabela I, a testosterona sérica diferiu entre os grupos de pacientes e controles, sendo menor no grupo com CaP. A comparação entre os níveis de testosterona sérica na população estudada e o número de repetições CAG não foi significativa, tanto nas análises comparando estas duas variáveis contínuas, quanto categorizando os grupos do CAG em 19, 21 e 24 repetições, e a testosterona sérica dividida em grupos pelos valores dos percentis 25 e 75 ($\leq 3,5$; $3,6-4,9$; $\geq 5,0$) .

Tabela III. Relação entre o número de repetições CAG e o estadiamento patológico e grau histológico do CaP

	n	CAG*	p
Grau histológico			
Gleason 6	35	21,4 ± 3,6	NS
Gleason ≥ 7	15	22 ± 2,6	
Estadiamento patológico			
CaP localizado	25	21,2 ± 3,8	NS
CaP extraprostático	22	21,8 ± 2,8	

*Os valores são expressos como média ± desvio-padrão. NS, não significativo

Análise da testosterona sérica e características do grupo com CaP

Analizamos também a variação da testosterona sérica dentro do grupo CaP e correlacionamos com dados de história familiar, raça, escore de Gleason e estadiamento patológico do tumor.

A média da dosagem de testosterona sérica diferiu entre os pacientes com CaP localizado ($4,45 \pm 1,16$) em relação aos pacientes com CaP extraprostático ($3,12 \pm 1,43$), $p=0,001$. Não se observou diferença significativa na testosterona sérica quando comparados os subgrupos de escore de Gleason, raça e história familiar.

Foi realizada análise de regressão linear múltipla para esclarecer os achados relacionados à testosterona com possíveis fatores de confusão (Tabela IV). Dentre os fatores considerados nesta análise, foram incluídos número de repetições CAG, idade e grupo, mostrando uma correlação significativa entre testosterona e grupo.

Tabela IV. Análise de regressão / fatores associados com a testosterona total na análise multivariada

Variável	b	IC 95%	p
Grupo	0,265	0,133 - 0,645	0,003
Idade	-0,152	-0,066 – -0,005	0,088
Repetições CAG	-0,43	-0,097 – 0,058	0,625

b= coeficiente de regressão

IC, intervalo de confiança

DISCUSSÃO

No presente estudo, utilizamos uma amostra da população masculina do Rio Grande do Sul. Não identificamos diferenças entre o número de repetições CAG e o risco de CaP, tanto na análise das repetições como variáveis contínuas, quanto categorizando-as em diferentes pontos de corte. Analisando isoladamente o grupo CaP, não houve correlação entre o polimorfismo CAG e características clínicas ou anátomo-patológicas. O nível sérico de testosterona total foi significativamente menor no grupo de pacientes com CaP e entre os pacientes com tumor extraprostático no estadiamento patológico.

A associação entre o polimorfismo CAG e o risco de desenvolver câncer de próstata ainda é controverso. Considera-se que exista uma correlação inversa entre o número de repetições CAG e o risco de neoplasia prostática. Diversos estudos avaliaram a relação entre o número de repetições do trinucleotídeo CAG e o risco de desenvolver câncer de próstata. Nossos resultados estão em concordância com alguns destes estudos, onde não foi identificada associação entre este polimorfismo e o risco de CaP. Bratt et al. não encontraram diferença entre pacientes com CaP e controles em um estudo na população sueca.⁵² Resultados similares foram obtidos por Correa-Cerro et al. em uma população franco-germânica.⁵¹ Santos ML et al., no primeiro estudo avaliando a influência do polimorfismo CAG no CaP em pacientes brasileiros, não encontrou diferença entre os casos e controles. Neste estudo, a média de repetições CAG entre os pacientes foi de 21,8 repetições e no grupo controle de 22,1 repetições.⁵⁴ Estes achados foram semelhantes aos da população estudada no presente trabalho.

Outros estudos, já mencionados, encontraram associação positiva entre o risco de CaP e repetições menores do CAG.⁹ Ainda não há uma explicação

adequada para justificar essa variabilidade nos achados entre os estudos. Trabalhos com número de pacientes adequado, com mesmas técnicas de análise do polimorfismo e populações semelhantes, foram utilizados chegando a conclusões divergentes. Tem sido proposto que a função do polimorfismo CAG sobre a carcinogênese prostática pode necessitar a adição de outros fatores genéticos, ou de fatores ambientais, para exercer um aumento no risco da neoplasia.²⁰

Além da relação de risco do CaP com a variação polimórfica do CAG, vários autores analisaram características como a idade de diagnóstico da neoplasia, o estadiamento anátomo-patológico, o grau de diferenciação do tumor, a etnia, a presença de história familiar de câncer de próstata, dados antropométricos e nível sérico de testosterona com o número de repetições CAG.²⁰ Em todas as variáveis citadas, os achados são bastante conflitantes.

Estudos sugerem que o número de repetições CAG estaria relacionado com o grupo étnico. Estudos em populações afro-americanas demonstraram um número médio de repetições menor que os de caucasianos, enquanto a população asiática apresentaria um número médio de repetições maior. Isto poderia explicar em parte a distribuição de freqüências do câncer de próstata nas diferentes regiões do mundo.⁴³

Em nosso estudo não houve diferença entre o número de repetições CAG e a raça dos pacientes. Na população brasileira a avaliação da raça é particularmente difícil, devido a grande heterogeneidade genética formadora de nossa população e a superposição de características genéticas entre europeus, africanos e ameríndios. O registro da raça (ou cor), feito pelo examinador ou declarado pelo paciente, não consegue definir de maneira adequada a ancestralidade do paciente

em nossa população.^{13,14} Desta maneira, a verificação da raça (ou cor) e a comparação com o CAG deve ser analisada com cautela em nosso estudo.

Outro fator relacionado com o número menor de repetições CAG foi a idade precoce de início do CaP. Forrest et al. avaliaram pacientes que tiveram o diagnóstico de CaP antes dos 55 anos de idade, na população britânica. Surpreendentemente, os pacientes com repetições menores que 22 apresentaram uma redução de 32% no risco de CaP precoce, contrariando os achados anteriores.⁶³ Em um trabalho de Chen et al. não houve diferença de risco entre o número de repetições CAG e a idade de diagnóstico de CaP, quando divididos em três faixas etárias (<60, 60-69, ≥ 70 anos).⁶⁴ Nosso estudo encontrou uma diferença importante na média de repetições CAG em pacientes com diagnóstico do CaP abaixo dos 55 anos de idade (19,54 repetições) em relação à média de repetições do grupo com idade mais avançada (21,91 repetições). Apesar da tendência identificada, não houve diferença estatística na análise ($p=0,08$). No estudo anterior avaliando uma amostra da população brasileira, foi identificado um número de repetições menor no grupo de pacientes com idade menor que 55 anos de idade.⁵⁴

Na análise de nossa amostra, não identificamos diferenças significativas entre o número de repetições CAG e o grau de diferenciação do tumor e o estadiamento patológico. Estes achados estão em concordância com os de Mir et al., que não identificaram diferenças no número médio de repetições CAG em pacientes com tumores em estágio T1 a T4 e escore de Gleason (2-4, 5-7, 8-10).⁶⁵ Outros estudos não encontraram diferenças do polimorfismo, subdividindo os pacientes em grupos de estadiamento patológico e diferenciação histológica em T1/ T2 e T3/T4 e escore de Gleason <7 e ≥ 7, respectivamente.^{29, 50, 61}

Fatores nutricionais têm sido implicados com o risco de CaP. A dieta rica em lipídios apresenta algumas evidências de aumento do risco de câncer de próstata, assim como variações no índice de massa corporal e outras medidas antropométricas. Visvanathan et al., não encontraram diferenças no índice de massa corporal (IMC) entre casos e controles.⁶⁶ Contrariamente, Stanford et al. concluíram que havia um risco maior de CaP em pacientes com IMC menor que 24.⁵⁷ Nossos dados não mostraram diferenças entre a dosagem sérica de colesterol total, HDL e triglicerídios entre os grupos. Estamos avaliando, nesta mesma amostra, dados antropométricos e o perfil alimentar dos pacientes e a correlação com repetições CAG. Estas avaliações estão em andamento, não possuindo resultados conclusivos até o presente o momento.

Os andrógenos possuem importância vital no desenvolvimento e função da próstata. Qual o fator que mais influencia na proliferação da célula prostática benigna ou maligna é desconhecido. Ainda não é possível determinar qual o nível sérico ou intracelular de testosterona total, testosterona livre, SHBG ou DHT seria preditor do risco de desenvolver CaP.⁵⁶ Na nossa amostra, encontramos uma diferença significativa entre as médias dos níveis de testosterona total sérica entre casos e controles. A análise multivariada confirmou esta correlação. O gene do PSA é dependente da ação do receptor de androgênios, sendo que o nível sérico do PSA pode ser influenciado pelo nível sérico ou intracelular de testosterona.⁶⁰ Segundo Mifsud et al, o nível de PSA correlaciona-se com a testosterona sérica em situações de hipoandrogenismo. Por esta razão, realizamos, separadamente, uma análise multivariada incluindo a variável PSA total, que não teve influência sobre a diferença da testosterona entre os grupos.⁴² A avaliação concomitante de metabólitos da testosterona, como testosterona livre ou SHBG, poderia ter caracterizado de modo mais completo, o status androgênico desta amostra.

Limitações do estudo

Seleção dos pacientes

A inclusão dos controles foi limitada a indivíduos com dosagem sérica de PSA total menor que 2,0 ng/ml. Santos et al. realizaram recrutamento similar no seu estudo sobre o polimorfismo CAG e risco de CaP na população do Estado de São Paulo.⁵⁴ Outros autores utilizaram o valor de PSA inferior a 2,5 ng/ml ou 4,0 ng/ml como ponto de corte para critério de inclusão dos seus grupos controle.⁴⁹ O objetivo desta restrição era diminuir o risco de recrutar pacientes com CaP para o grupo controle. Esta restrição trouxe algumas diferenças no perfil entre casos e controles. A exclusão de indivíduos do grupo controle com PSA maior que 2,0 ng/ml, excluiu deste grupo pacientes com volume prostático maior. Sabemos que o valor do PSA total correlaciona-se fortemente com o volume prostático e esta seleção foi uma das responsáveis pela diferença entre os grupos para esta variável. Porém, o objetivo principal do estudo era a identificação de um fator preditor para o desenvolvimento de CaP, sendo este rigor no recrutamento necessário para a semelhança dos pacientes com relação à variável principal em estudo.

A aferição do volume prostático foi determinada de maneira diversa entre os grupos. Os dados provenientes do grupo dos pacientes com CaP foram obtidos das medidas de ultrassonografia transretal, enquanto o grupo controle teve o volume prostático medido por ultrassonografia transabdominal. Este viés de aferição somado as diferenças determinadas na seleção dos grupos, torna a análise e interpretação desses dados mais difícil.

Tamanho da amostra

Calculamos o tamanho da amostra considerando uma diferença entre as médias, de casos e controles, de duas repetições e desvio-padrão de 1 repetição. O nível de significância foi de 0,05 e o poder 90%. Isto levou a uma amostra estimada de 50 casos e 50 controles. Para detectar uma diferença mais estrita entre os grupos, necessitaríamos uma amostra maior. Uma recente meta-análise, incluiu 19 estudos de caso-controle e encontrou um risco maior de desenvolvimento de CaP nos pacientes com menor número de repetições CAG. Esta diferença, no entanto, foi menor do que um trinucleotídeo e os autores questionam se esta pequena diferença traria algum impacto biológico.⁹ Consideramos que a nossa amostra foi adequada para identificar diferenças realmente significativas entre os grupos, apresentando poder estatístico adequado para esta proposta.

CONCLUSÕES

- Não há correlação entre o número de repetições do polimorfismo CAG do gene do receptor androgênico e o risco de câncer de próstata na amostra estudada;
- A média de repetições CAG nesta população assemelha-se à média obtida previamente na população brasileira;
- Não houve correlação entre fatores clínicos ou anátomo-patológicos relacionados ao câncer de próstata e o número de repetições CAG;
- A testosterona total sérica apresentou diferenças entre os grupos, inclusive quando corrigida para outras variáveis esta diferença foi significativa. Não há consenso se o nível de testosterona sérica influencia diretamente a replicação celular prostática, benigna ou maligna.

PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir destes estudos iniciais, sobre polimorfismos genéticos do receptor de androgênios, podemos projetar estudos futuros:

1. A análise de outros polimorfismos do gene do receptor de androgênios; por exemplo, o polimorfismo do trato poliglicínico – GGC. Este estudo já está em andamento, desenvolvido pelo nosso grupo com a mesma amostra de pacientes do presente trabalho. Existe a possibilidade de correlacionar as variantes polimórficas simultaneamente, e verificar se a interação entre os polimorfismos modifica significativamente a atividade do receptor de androgênios e o risco de câncer de próstata;
2. Conforme já mencionado na discussão deste trabalho, também estamos avaliando de maneira mais detalhada os perfis alimentar e antropométrico destes pacientes, para compará-los com o número de repetições CAG. A realização destes dois objetivos supra-citados, permitirá avaliar a influência de outros fatores genéticos e de fatores ambientais sobre a variante polimórfica do CAG, o que tornaria o conhecimento deste polimorfismo muito mais abrangente;
3. Desenvolver estudos relacionando o polimorfismo CAG em pacientes com neoplasia prostática metastática, em hormonioterapia e o risco de refratariedade ao tratamento hormonal.

REFERÊNCIAS

1. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*. 2003;361:859-864.
2. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;349:366-381.
3. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. Public-Use Data (1973-2002), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch. Acesso no endereço eletrônico <http://www.seer.cancer.gov> em setembro de 2005.
4. What are the key statistics about prostate cancer? American Cancer Society. Reference Information. Revised in 25/05/2005. Acesso no endereço eletrônico <http://www.cancer.org> em setembro de 2005.
5. Frankel S, Smith GD, Donovan J, Neal D. Screening for prostate cancer. *Lancet*. 2003;361:1122-1128.
6. Câncer de próstata: consenso. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde, Brasil. 2002
7. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Ministério da Saúde, Brasil. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2005. Acesso no endereço eletrônico <http://www.inca.gov.br> em setembro de 2005.
8. Carter HB, Partin AW. Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Walsh: *Campbell's Urology*, 8th edition: WB Saunders; 2002. p. 3055-3064
9. Zeegers MP, Kiemeneijer LALM, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG e GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2004;13(11):1765-1771.

10. Reiter RE, de Kernion JB. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Walsh: Campbell's Urology, 8th edition: WB Saunders; 2002. p. 3002-3003.
11. Platz EA, Rimm EB, Willett WC, Kantoff PW, Giovannucci E. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92:2009-2017.
12. Bennett CL, Price DK, Kim S, Liu D, Jovanovic BD, Nathan D, Johnson ME, Montgomery JS, Cude K, Brockbank JC et al. Racial variation in CAG repeat lengths within the androgen receptor gene among prostate cancer patients of lower socioeconomic status. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20:3599-3604.
13. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(1):177-182.
14. Marrero AR, Leite FPN, Carvalho BA, Peres LM, Kommers TC, Cruz IM, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Da Silva Júnior WA, Bortolini MC. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *American Journal of Human Biology*. 2005;17(4):496-506.
15. Dagnelie PC, Schurman AG, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA. Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. *British Journal of Urology International*. 2004;93:1139-1150.
16. Amling CL. Relationship between obesity and prostate cancer. *Current Opinion in Urology*. 2005;15:167-171.
17. Platz EA, Giovannucci E. The epidemiology of sex steroid hormones and their signaling and metabolic pathways in the etiology of prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2004;92:237-253.

18. Schatzl G, Madersbacher S, Haitel A, Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Gassner C, Ochsner M, Marberger M. Associations of serum testosterone with microvessel density, androgen receptor density and androgen receptor gene polymorphism in prostate cancer. *The Journal of Urology*. 2003;169:1312-1315.

19. Nelson KA, Witte JS. Androgen receptor CAG repeats and prostate cancer. *American Journal of Epidemiology*. 2002;155:883-890.

20. Coughlin SS, Hall HL. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Annals of Epidemiology*. 2002;12:182-196.

21. Ribeiro ML, Santos A, Carvalho-Salles AB, Hackel C. Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002;35:205-213.

22. Latil A, Lidereau R. Genetic aspects of prostate cancer. *Virchow Archives*. 1998;432:389-406.

23. Koivisto PA, Hyytinen ER, Matikainen M, Tammela TLJ, Ikonen T, Schleutker J. Germline mutation analysis of the androgen receptor gene in finnish patients with prostate cancer. *The Journal of Urology*. 2004;171:431-433.

24. Rökman A, Ikonen T, Mononen N, Autio V, Matikainen MP, Koivisto PA, Tammela TLJ, Kallioniemi OP, Schleutker J. ELAC2/HPC2 involvement in hereditary and sporadic prostate cancer. *Cancer Research*. 2001;61:6038-6041.

25. Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, Stager SL, Christensen E, Marks AF, Cunningham JM, Peterson BJ, Jacobsen SJ, Cerhan JR et al. Role of HPC2/ELAC2 in hereditary prostate cancer. *Cancer Research*. 2001;61:6494-6499.

26. Suarez BK, Gerhard DS, Lin J, Haberer B, Nguyen L, Kesterson NK, Catalona WJ. Polymorphisms in the prostate cancer susceptibility gene HPC2/ELAC2 in multiplex families and healthy controls. *Cancer Research*. 2001;61:4982-4984.

27. Xu J, Zheng SL, Carpten JD, Nupponen NN, Robbins CM, Mestre J, Moses TY, Faith DA, Kelly BD, Isaacs SD. Evaluation of linkage and association of HPC2/ELAC2 in patients with familial or sporadic prostate cancer. *American Journal of Human Genetics*. 2001;68:901-911.
28. Ferro P, Catalano MG, Dell'Eva R, Fortunati N, Pfeffer U. The androgen receptor CAG repeat: a modifier of carcinogenesis? *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;193:109-120.
29. Mononen N, Ikonen T, Autio V, Rökman A, Matikainen MP, Tammela TLJ, Kallioniemi OP, Koivisto PA, Schleutker J. Androgen receptor CAG polymorphism and prostate cancer risk. *Human Genetics*. 2002;111:166-171.
30. Choong CS, Wilson EM. Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: a molecular basis for disease. *Journal of Molecular Endocrinology*. 1998;21:235-257.
31. Tsujimoto Y, Takakuwa T, Takayama H, Nishimura K, Okuyama A, Aozasa K, Nomomura N. *In Situ* Shortening of CAG repeat length within the androgen receptor gene in prostatic cancer and its possible precursors. *The Prostate*. 2004;58:283-290.
32. Császár A, Ábel T. Receptor polymorphisms and diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2001;414:9-22.
33. Kimball JW. Polymorphisms. Kimball's Biology Pages, 2004. Acesso no endereço eletrônico <http://home.comcast.net/~john.kimball1/BiologyPages/> em outubro de 2005.
34. Buchanan G, Yang M, Cheong A, Harris JM, Irvine RA, Lambert PF, Moore NL, Raynor M, Neufing PJ, Coetzee GA, Tilley WD. Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Human Molecular Genetics*. 2004;13:1677-1692.

35. Hsing AW, Chen C, Chokkalingam AP, Gao YT, Dightman DA, Nguyen HT, Deng J, Cheng J, Sesterhenn IA, Mostofi FK et al. Polymorphic markers in the SRD5A2 gene and prostate cancer risk: A population based case-control study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2001;10:1077-1082.
36. Haiman CA, Stampffer MJ, Giovannucci E, Ma J, Decalo NE, Kantoff PW, Hunter DJ. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2001;10:743-748.
37. Feldman D. Androgen and vitamin D receptor gene polymorphisms: The long and short of prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89:109-111.
38. Linja MJ, Visakorpi T. Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2004;92:255-264.
39. Kantoff P, Giovannucci E, Brown M. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and its relationship to prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1378:C1-C5.
40. Mahtre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, Pinsky L. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature Genetics*. 1993;5(2):184-188.
41. Giovannucci E, Platz EA, Stampfer MJ, Chan A, Krithivas K, Kawachi I, Willett WC, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and benign prostatic hiperplasia. *Urology*. 1999;53(1):121-125.
42. Mifsud A, Choon AT, Fang D, Yong EL. Prostate-specific antigen, testosterone, sex-hormone binding globulin and androgen receptor CAG repeat

polymorphisms in subfertile and normal men. *Molecular Human Reproduction*. 2001;7:1007-1013.

43. Sartor O, Zheng Q, Eastham JÁ. Androgen receptor gene CAG repeat length varies in a race-specific fashion in men without prostate cancer. *Urology*. 1999;53(2):378-380.

44. Giovanucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94:3320-3323.

45. Hardy DO, Scher HI, Bogenreider T, Sabbatini P, Zhang ZF, Nanus DM, Catterall JF. Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: Correlation with age of onset. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996;81:4400-4405.

46. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, Coetzee GA. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphism in vitamin D receptor and androgen receptor. *Journal of National Cancer Institute*. 1997;89(2):166-170.

47. Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, Sesterhenn IA, Mostofi KF, Benichou J, Chang C. Polymorphic CAG e GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: A population-based case-control study in China. *Cancer Research*. 2000;60:5111-5116.

48. Li C, Gronberg H, Matsuyama H, Weber G, Nordenskjold M, Naito K, Bergh A, Bergerheim U, Damber JE, Larsson C, Ekman P. Difference between Swedish and Japanese men in the association between AR CAG repeats and prostate cancer suggesting a susceptibility-modifying locus overlapping the androgen receptor gene. *International Journal of Molecular Medicine*. 2003;11:529-533.

49. Balic I, Graham ST, Troyer DA, Higgins BA, Pollock BH, Johnson-Pais TL, Thompson IM, Leach RJ. Androgen receptor length polymorphism associated with prostate cancer risk in hispanic men. *The Journal of Urology*. 2002;168:2245-2248.

50. Mishra DK, Thangaraj K, Mandhani A, Kumar A, Mittal RD. Is reduced CAG repeat length in androgen receptor gene associated with risk of prostate cancer in Indian Population? *Clinical Genetics*. 2005;68:55-60.

51. Correa-Cerro L, Wöhr G, Haussler J, Berthon P, Drelon E, Mangin P, Fournier P, Cussenot O, Kraus P, Just W et al. (CAG)_nCAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with prostate cancer in a French-German Population. *European Journal of Human Genetics*. 1999;7(3):357-362.

52. Bratt O, Borg A, Kristoffersson U, Lundgren R, Zhang QX, Olsson H. CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *British Journal of Cancer*. 1999;81(4):672-676.

53. Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM et al. Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. *Human Genetics*. 2002;110:122-129.

54. Santos ML, Sarkis AS, Nishimoto IN, Nagai MA. Androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer from a Brazilian population. *Cancer Detection and Prevention*. 2003;27:321-326.

55. Freedman ML, Pearce CL, Penney KL, Hirschhorn JN, Kolonel LN, Henderson BE, Altshuler D. Systematic evaluation of genetic variation at the androgen receptor locus and risk of prostate cancer in a multiethnic cohort study. *American Journal of Human Genetics*. 2005;76:82-90.

56. Platz EA, Leitzmann MF, Rifai N, Kantoff PW, Chen YC, Stampfer MJ, Willet WC, Giovannucci E. Sex Steroid hormones and the androgen receptor gene CAG repeat and subsequent risk of prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2005;14(5):1262-1269.

57. Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA, Ostrander EA. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Research*. 1997;57(6):1194-1198.

58. Platz EA, Giovannucci E, Dahl DM, Krithivas K, Hennekens CH, Brown M, Stampfer MJ, Kantoff PW. The androgen receptor gene GGN microsatellite and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1998;7:379-384.

59. Miller EA, Stanford JL, Hsu L, Noonan E, Ostrander EA. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene in high risk sibships. *Prostate*. 2001;48(3):200-205.

60. Xue W, Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA, Ingles AS. Susceptibility to prostate cancer: Interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci. *Cancer Research*. 2000;60:839-841.

61. Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Zidek T, Madersbacher S, Schatzl G, Marberger M, Vutuc C, Micksche M. Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*;23:1647-1651.

62. Binnie MC, Alexander FE, Heald C, Habib FK. Polymorphic forms of prostate specific antigen and their interaction with androgen receptor trinucleotide repeats in prostate cancer. *Prostate*. 2005; 63(4):309-315.

63. Forrest MS, Edwards SM, Houlston R, Kote-Jarai Z, Key T, Allen N, Knowles MA, Turner F, Arden-Jones A, Murkin A et al. Association between

hormonal genetic polymorphisms and early-onset prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2005;8:95-102.

64. Chen C, Lambarzi N, Weiss NS, Etzioni R, Dightman DA, Barnett M, Di Tommaso D, Goodman G. Androgen receptor polymorphism and the incidence of prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2002;11:1033-1040.

65. Mir K, Edwards PJ, Paterson M, Hehir M, Underwood MA, Bartlett JMS. The CAG trinucleotide repeat length in the androgen receptor does not predict the early onset of prostate cancer. *British Journal International*. 2002;90:573-578.

66. Visvanathan K, Helzlsouer KJ, Boorman DW, Strickland PT, Hoffman SC, Comstock GW, O'Brien TG, Guo Y. Association among an ornithine decarboxylase polymorphism, androgen receptor gene (CAG) repeat length and prostate cancer risk. *The Journal of Urology*. 2004;171:652-655.

ANEXOS

Anexo 1
Ficha Casos

Nome	
Idade	
Prontuário	
Raça	
Natural.	
Procedenc.	
CaPdata	
CapIdade	
CaPPSA	
Gleason	
Estadiamento	
Tratamento	
Hx Familiar	
Comorbidades	
Testtotal	
Testlivre	
Colesterol	
Triglicerídeos	
HDL	
Peso	
Altura	
Cintura	
Quadril	
Observações	

Anexo 2
Ficha Controles

Nome	
Idade	
Prontuário	
Raça	
Natural.	
Procedenc.	
PSA	
Toque	
Hx Familiar	
Comorbidades	
Testtotal	
Testlivre	
Colesterol	
Triglicerídeos	
HDL	
Peso	
Altura	
Cintura	
Quadril	
Observações	

Anexo 3

Termo de Consentimento Informado

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver câncer na próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr. tem/teve câncer de próstata, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue – na ocasião de sua entrada no estudo. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata, que podem estar associados ao desenvolvimento de câncer de próstata e à forma com que ele se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver câncer de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

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

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

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são o Dr. Brasil Silva Neto, a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável:

Nome

Assinatura

Anexo 4**Termo de Consentimento Informado - Controles**

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver câncer na próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Para sabermos quais polimorfismos estão associados a esta doença, precisamos conhecer sua frequência em pessoas saudáveis para podermos comparar com os pacientes. Através das perguntas que lhe fizemos, do exame de PSA e de toque retal, consideramos que você tem baixa probabilidade de ter câncer na próstata, podendo fazer parte do estudo para a comparação. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em genes responsáveis pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata, que podem estar associados ao desenvolvimento do câncer e à forma como ele se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver câncer na próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o Sr.

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

Eu, _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são o Dr. Brasil Silva Neto, a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável:

Nome

Assinatura

ARTIGO

Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene and prostate cancer risk : Analysis from a Brazilian population

BRASIL SILVA NETO¹, VANDERLEI BIOLCHI², CLEBER BRENNER¹, KARLO D. BIOLO¹, ILMA S.B. da SILVA², WALTER J. KOFF¹

Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Abstract

Purpose: Variations in transcriptional activity of the androgen receptor (AR) is related to polymorphic CAG repeats in exon 1 of the AR gene. Shorter CAG repeats have been associated with increased prostate cancer risk. We investigated the association of CAG repeat length and the risk of prostate cancer in a case-control study from a Brazilian population.

Patients and Methods: To test for an association between CAG repeat length and prostate cancer risk, we evaluated 50 prostate cancer patients and 77 healthy controls. DNA was extracted from peripheral leucocytes and the AR gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). PCR product was analysed with ABI 3100 Avant sequencer and Genemapper software. Student t test, qui-square test and logistic regression was used to analyse the data. For variables without normal distribution, it was used the Wilcoxon-Mann-Whitney *U* test.

Results: CAG mean length was 21.58 ± 3.32 in cases and 22.19 ± 3.09 in control group ($p=0.28$). Patients with 19 repeats or less did not have an increased risk of prostate cancer when compared with patients with longer CAG repeat length. There was also no significant association between CAG repeat length and clinical, laboratorial and pathological variables.

Conclusion: These results suggest that there is no correlation between CAG repeat length and prostate cancer risk in this population. The mean CAG repeat length was similar to previous studies involving Brazilian subjects.

Key words: Prostate cancer, CAG polymorphism, androgen receptor

Introduction

Prostate cancer is the most common cancer in men in the United States and Europe.¹ The risk of prostate cancer is 1 in 6 and the risk of death due to prostate cancer is 1 in 30.² In 2005, it is estimated 232.000 new cases being diagnosed and 30.000 deaths due to this disease.³ In Brazil, mortality rate has risen from 3.73/100.000 men in 1979 to 8.93/100.000 men in 1999. The estimated incidence for prostate cancer is 43.000 new cases in 2005, with predominance in southern regions.^{4,5} Age, ethnicity, diet, family history and androgens have been recognized as contributors to the risk of prostate cancer.

Men with a first-degree relative with prostate cancer have a two-fold increased risk of developing prostate cancer. Having two or more first-degree relatives elevates the risk up to 11-fold.⁶ Several candidate genes were identified in loci from different chromosomes, namely HPC1/RNASEL, PCAP, CAPB, HPCX, HPC20 and HPC2/ELAC2⁷. Although these genes have a high penetrance and concordance between affected families, only 5 to 10% percent of prostate cancer cases may arise from major susceptibility genes. Genetic polymorphism that may be associated with prostate cancer risk are much more common in the population than are high-penetrance cancer susceptibility genes.⁸

Testosterone is converted into dihydrotestosterone (DHT) by the action of 5 α -reductase enzyme. DHT binds to the androgen receptor and forms a complex that regulates growth and differentiation of the prostatic cell. Also, stimulates the transcription of androgen-responsive genes.⁹ Thus, genetic polymorphisms involving the androgen metabolism can influence the risk of developing prostate cancer.

The androgen receptor gene is located in chromosome Xq 11-12 and contains 8 exons. Exons 2 and 3 encode for the DNA binding domain. Exons 4 to 8 encode the C-terminal hormone binding domain. Exon 1 encode the amino-terminal domain which is responsible for the transcriptional activity.¹⁰

Polymorphic variants in the exon 1 alter the AR transcriptional activity, modifying the androgen regulation in prostate. In this region, there is highly variable polymorphic CAG repeat, which encodes a polyglutamine chain.¹¹ In vitro and

experimental studies showed that longer CAG repeats decrease transactivation activity and androgen binding affinity in the AR. On the other hand, shorter CAG repeats turns prostate cells more sensitive to the androgen action, which in turn can increase the risk of prostate cancer.^{12,13} The mean CAG repeat length varies among different ethnic groups. African-Americans have shorter CAG than Caucasian population, while Asiatics tend to have longer repeats. This distribution reflects the incidence of prostate cancer worldwide.¹⁴

Studies examining CAG repeat length in the AR gene have yielded conflicting results. Giovanucci et al., in a nested case-control, found that caucasian men with less than 18 CAG repeats had a higher risk of prostate cancer (RR= 1.5, 95% CI 0.92-2.49 $p=0.04$) than men with more than 26 repeats. The association was also observed in patients with high grade and advanced tumors.¹⁵ Another study found a higher prostate cancer risk in patients with less than 20 CAG repeat length.¹⁶ Others authors studying CAG polymorphism could not confirm this association.^{17,18} Santos et al., find no significant correlation between cases and controls in Brazilian population. However, it was a significant association with early age of onset (< 55 years old) and CAG repeat length (<21 repeats).¹⁹

The aim of this study was to investigate the correlation between the androgen receptor polymorphism CAG repeat length and prostate cancer risk from a southern brazilian population. We also assessed the relationships between CAG length and clinical, laboratorial and pathologic variables.

Patients and Methods

Study population

This case-control study was prospectively conducted at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul from September 2004 to May 2005. Protocols and informed consent were reviewed and approved by the local and national ethics committee. All subjects provided informed consent. Prostate cancer patients were selected from the registries of the Urology Department of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Inclusion criteria were age 45-80 years old, no current hormone therapy and no concomitant neoplasia. Factors such as age of diagnosis, race (physician observed), tumor stage and grade, serum total PSA at diagnosis, family history

were recorded. Blood was collected for the polymorphisms analysis and for serum total testosterone and lipidic profile (total cholesterol, HDL and tryglicerides). Controls were selected from a prostate cancer prevention program organized in 2004 and from patients from the Urology ambulatory of our hospital. Criteria inclusion were age 45 –80 years old, PSA value less than 2.0 ng/ml, normal digital rectal examination and no other concomitant neoplasia.

Genotyping

Genomic DNA for patients and controls was extracted from peripheral blood leukocytes. After erythrocyte lysis, leukocytes lysis were done using 2ml of specific solution (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0), 36 µl 10% SDS and 30 µL de proteinase K (10 mg/mL) and incubated at 37°C for 18 hours. Dna was extracted and precipitated with 70% ethanol and re-suspended with specific buffer TE 10:0,1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

PCR was carried out in a final volume of 50 µl. One µl of the genomic DNA was denatured at 96°C for 2 min in the presence of 20 mM Tris-HCl pH 8.4 plus 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂. After this hot start, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase was added together with the same Tris-HCl buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.4 µM sense and antisense primers and 0.2 mM dNTP mix.

The primers used for amplification were 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' labeled with FAM fluorescent dye and the antisense primer 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3'. Amplifications were performed using an automated thermocycler (MJ Research, Waltham, MA, USA) applying the following conditions: hot start, 2 min at 96 °C; three cycles of 40 sec at 94 °C, 30 sec at 67 °C and 20 sec at 72 °C; three cycles with the same physical conditions except for the annealing temperature, which was 64 °C; three cycles with annealing temperature of 61 °C; three cycles with annealing temperature of 59 °C; and 25 cycles with annealing temperature of 55 °C. The quality of the PCR products was assessed using 1.5% agarose gel electrophoresis. Each PCR product was diluted in water (10X) for analysis, and 2 µl were mixed with deionized formamide and a fluorescent molecular weight marker [GeneMapper 500HD (ROX) Size Standard, Applied Biosystems, Foster City, CA]. After denaturation for 1 min at 95 °C, each sample was analyzed by capillary electrophoresis on an ABI 3100-Avant automated

sequencer, and the PCR products were analyzed with the GeneMapper software (Applied Biosystems, Foster City, CA). The number of CAG repeats was calculated from the size of the PCR products, in relation to a series of standards obtained by direct sequencing of PCR products.

Statistical analysis

Analysis of data was performed using the computer software SPSS for windows (version 12.0). Associations between CAG and continuous variables were performed by student t test and for categorical variables by qui-square test, with significance of 95%. For variables without normal distribution, it was used the Wilcoxon-Mann-Whitney *U* test. Logistic regression was done to control, if necessary, for possible confounders, with significance of 95%.

Results

Genomic DNA from 50 prostate cancer patients and 77 healthy men controls were examined to determine the number of CAG repeats. Principal characteristics of the study population are given in Table I. Cases and controls significantly differed with respect to age and PSA ($p=0.02$ and $p< 0.001$, respectively). The mean age was 63.84 ± 6.3 for cases and 60.95 ± 7.39 for controls. There was a predominance of whites (75% cases and 80% controls) without difference between cases and controls. Serum total testosterone level was significantly lower in prostate cancer patients. There was no difference in serum total cholesterol, HDL and tryglicerides between groups.

The CAG repeat length distribution of cases and controls is shown in Figure 1. The number of repeats ranged from 14 to 30 in cases with mean \pm standard deviation (SD)= 21.58 ± 3.32 and for controls from 16 to 31 with mean \pm SD= 22.19 ± 3.09 .

The CAG repeat length was divided in tertiles (≤ 19 , 20-23, ≥ 24), as showed in Table II. We found no evidence for an association between CAG repeat length and prostate cancer.

Patients were divided in subgroups for comparision between clinical variables and CAG repeat length. There was no difference for CAG repeats and ethnicity. Patients younger than 55 years old had a mean CAG number = 19.57 and controls = 21.91. This difference did not have statistically significance ($p=0.08$). There was

no correlation for tumor grade (Gleason score 6 or ≥ 7) or stage (localized or extraprostatic tumor) and CAG repeat length. Logistic regression was used to clarify differences found in serum testosterone. When analysed with other variables, the correlation between lower levels of serum testosterone in prostate cancer patients kept its significance.

Discussion

In the present article, we studied a southern Brazilian male population. We identified no difference between CAG repeat length and prostate cancer risk.. Also, we found no association when comparing CAG repeat length with clinical and pathologic variables.

The association between androgen receptor gene polymorphism CAG and prostate cancer is still controversial. It is hypotesized that shorter CAG repeats are linked with higher prostate cancer risk. Several authors studied this matter. Our results are in concordance with some of them, which find no correlation between the CAG polymorphism and prostate neoplasia. Bratt et al found no association between patients and controls in a Sweden population.¹⁸ Similar results were obtained by Correa-Cerro et al. in a French-German population.¹⁷ Santos ML et al., in the first study with a Brazilian population find no correlation of the CAG polymorphism and prostate cancer.¹⁹ The mean CAG repeats was 21.8 for cases and 22.1 for controls, which was very similar to our study population. Recently, Freedman et al. analysed 2036 patients and 2160 controls from the Multiethnic Cohort Study(California and Hawaii). Patients were divided among ethnic groups (Caucasians, African-americans, Hispanics and Japaneses). There were no correlation betwen CAG and prostate cancer risk when analysing patients and controls for ethnic subgroups or without the stratification.²⁰

On the other hand, some authors found positive association for this question. In a meta-analysis, Zeegers et al included 19 case-controls studies, with 4274 cases and 5275 controls. Shorter CAG repeat length had a positive association with prostate cancer (RC 1.19; 95%CI 1.07-1.31).²¹ However, the absolute difference was less than one repeat. Authors questioned if this minimal difference could be strong enough to cause biologic impact. Still, there is not a reasonable explanation for those conflicting results. Sample sizes, laboratorial techniques, patients

characteristics were similar in positive and negative association studies. It has been proposed that the role of the polymorphism on the prostatic carcinogenesis may need the addition of other genetic or environmental factors to exert an increase in cancer risk.⁸

It has been suggested that variations in CAG repeat length is different among ethnic groups, which could explain the large racial difference in prostate cancer risk.. African-americans have a mean CAG repeat length shorter than caucasians. Asians have the lowest prostate cancer incidence and the highest mean CAG repeat length. We found no difference between whites and blacks (physician observed). Brazilian population has an extremely high index of heterogeneity in its genetic constitution. Phenotypic characteristics can not predict with confidence genomic ancestry in our country. This heterogeneity can explain similarities between race groups in our study.^{22,23}

Shorter CAG repeats length was related to an early onset of prostate cancer. In the same study mentioned above evaluating Brazilian patients, there was a significant correlation with early age of onset (<55 years old) and shorter CAG repeats in prostate cancer patients (mean 19.6 ± 2.7 , $p=0.034$).¹⁹ Chen et al. did not find differences when comparing the number of CAG repeats and age of cancer diagnosis in three groups (<60, 60 – 69, ≥ 70 years old).²⁴ Forrest et al. evaluated only British patients who had their prostate cancer diagnosed before 55 years old. Surprisingly, patients with less than 22 CAG repeats had a 32 % risk reduction for prostate cancer.²⁵ We found an important difference in the mean number of CAG repeats in patients with age of diagnosis under 55 years old (19.54 repeats) when compared with older age patients (21.91 repeats). However, this difference was not significant ($p=0,08$).

Our analysis did not show any relationship between the CAG repeat length and tumor stage or grade, which is in concordance with the results from Mir et al., who found no association between CAG polymorphism and patients with tumors T1 to T4 and Gleason score 2-4, 5-7 and 8-10.²⁶

Nutritional factors has been implicated with prostate cancer risk. Selenium, lycopene, phytoestrogens and, possibly vitamin E, are protective factors. Diets with high calcium and fatty acids intake are associated with higher prostate cancer risk.²⁷ Visvanathan et al. analysed body mass index (BMI) and compared with CAG repeats, finding no differences between cases and controls.²⁸ Stanford et al.

concluded that there was an increased risk in patients with BMI lower than 24.²⁹ Zitzmann et al., studied in male caucasians the relationship between HDL serum levels and CAG repeat length. Their results showed a correlation between lower CAG repeats and lower levels of HDL cholesterol.³⁰ Conversely, our data showed no correlation between serum lipid levels and the number of CAG repeats.

Androgens have a vital importance in prostate development and function. Which factor mostly influences prostatic cell proliferation is still unknown. It is not possible to determine if serum or intracellular levels of androgens are predictors of the development of prostatic carcinogenesis.³¹ Our results in serum testosterone mean levels can't be explained by the differences in age and PSA levels between cases and controls, but other studies addressing specifically this question must be done.

Concluding, the present study analysed a population from a high prostate cancer incidence region in Brazil. It seems that androgen receptor gene polymorphism CAG is not associated as a risk factor in the development of prostate cancer. Other variables such as age of onset, tumor grade or stage are not correlated with CAG repeat length. The mean CAG repeats were similar to another brazilian population analysis. Studies with other androgen receptor polymorphisms, environmental factors and their interactions with CAG polymorphism could better explain the role, if there is any, of the CAG polymorphism in prostate cancer risk.

Table I. Main Characteristics of the study population (n=127)

	Cases (n=50)	Controls (n=77)	p
Age (years)	63,84±6,3	60,95±7,39	0,02
Race (white)	36 (75%)	60 (80%)	NS
Testosterone (ng/dl)	3,84±1,43	4,70±1,35	0,001
PSA (ng/ml)*	8,88±5,3	0,8±0,35	<0,001
Total cholesterol (mg/dl)	198,45±43,1	192,66±33,13	NS
HDL (mg/dl)	46,2±14,1	45,3±10	NS
Tryglicerides (mg/dl)*	162±137	166±148	NS
Family History	15 (30%)	11 (15,3%)	0,051

Values are expressed as mean ± standard deviation. NS, not significant

*Variables without normal distribution

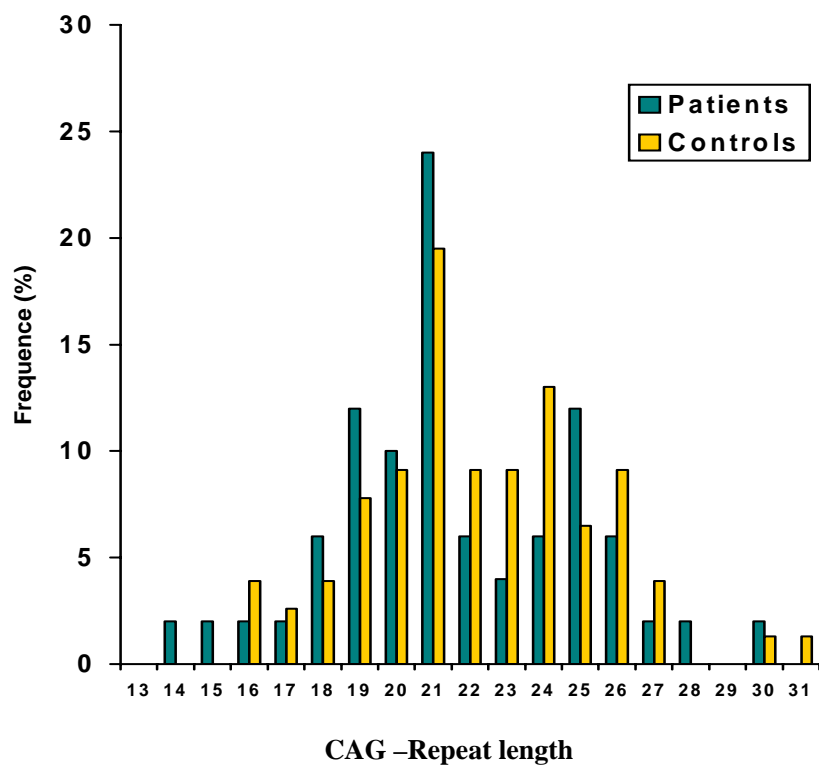


Figure 1 – Frequency distribution of CAG repeat length in prostate cancer patients and controls.

Table 2. Distribution of the number of CAG repeats in tertiles

CAG repeats	n	Cases	Controls	p*
≤ 19	26	13 (26%)	13 (17%)	NS
20-23	58	22 (44%)	36 (47%)	NS
≥ 24	43	15 (30%)	28 (36%)	NS

Values expressed in numbers (percentage). NS, Not significant

* *p* value for comparison of cases and controls distribution among tertiles, obtained by qui-square test, 3x2.

References

1. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*. 2003;361:859-864.
2. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *New England Journal of Medicine*. 2003;349:366-381.
3. What are the key statistics about prostate cancer? American Cancer Society. Reference Information. <http://www.cancer.org>. Revised in 25/05/2005.
4. Câncer de próstata: consenso. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde, Brasil. 2002
5. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Ministério da Saúde, Brasil. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2005. <http://www.inca.gov.br>.
6. Carter HB, Partin AW. Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Walsh: *Campbell's Urology*, 8th edition: WB Saunders; 2002. p. 3055-3064
7. Balic I, Graham ST, Troyer DA, Higgins BA, Pollock BH, Johnson-Pais TL, Thompson IM, Leach RJ. Androgen receptor length polymorphism associated with prostate cancer risk in hispanic men. *The Journal of Urology*. 2002;168:2245-2248.
8. Coughlin SS, Hall HL. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Annals of Epidemiology*. 2002;12:182-196.
9. Nelson KA, Witte JS. Androgen receptor CAG repeats and prostate cancer. *American Journal of Epidemiology*. 2002;155:883-890.
10. Linja MJ, Visakorpi T. Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2004;92:255-264.
11. Tsujimoto Y, Takakuwa T, Takayama H, Nishimura K, Okuyama A, Aozasa K, Nomomura N. *In Situ* Shortening of CAG repeat length within the androgen receptor gene in prostatic cancer and its possible precursors. *The Prostate*. 2004;58:283-290.
12. Kantoff P, Giovannucci E, Brown M. The androgen receptor CAG repeat polymorphism and its relationship to prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998;1378:C1-C5.
13. Mahtre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, Pinsky L. Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature Genetics*. 1993;5(2):184-188.

14. Sartor O, Zheng Q, Eastham JÁ. Androgen receptor gene CAG repeat length varies in a race-specific fashion in men without prostate cancer. *Urology*. 1999;53(2):378-380.
15. Giovanucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94:3320-3323.
16. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, Coetzee GA. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphism in vitamin D receptor and androgen receptor. *Journal of National Cancer Institute*. 1997;89(2):166-170.
17. Correa-Cerro L, Wohr G, Haussler J, Berthon P, Drelon E, Mangin P, Fournier P, Cussenot O, Kraus P, Just W et al. (CAG)_nCAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with prostate cancer in a French-German Population. *European Journal of Human Genetics*. 1999;7(3):357-362.
18. Bratt O, Borg A, Kristoffersson U, Lundgren R, Zhang QX, Olsson H. CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *British Journal of Cancer*. 1999;81(4):672-676.
19. Santos ML, Sarkis AS, Nishimoto IN, Nagai MA. Androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer from a Brazilian population. *Cancer Detection and Prevention*. 2003;27:321-326.
20. Freedman ML, Pearce CL, Penney KL, Hirschhorn JN, Kolonel LN, Henderson BE, Altshuler D. Systematic evaluation of genetic variation at the androgen receptor locus and risk of prostate cancer in a multiethnic cohort study. *American Journal of Human Genetics*. 2005;76:82-90.
21. Zeegers MP, Kiemeny LALM, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG e GGN repeat length polimorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2004;13(11):1765-1771.
22. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(1):177-182.

23. Marrero AR, Leite FPN, Carvalho BA, Peres LM, Kommers TC, Cruz IM, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Da Silva Júnior WA, Bortolini MC. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *American Journal of Human Biology*. 2005;17(4):496-506.
24. Chen C, Lambarzi N, Weiss NS, Etzioni R, Dightman DA, Barnett M, Di Tommaso D, Goodman G. Androgen receptor polymorphism and the incidence of prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2002;11:1033-1040.
25. Forrest MS, Edwards SM, Houlston R, Kote-Jarai Z, Key T, Allen N, Knowles MA, Turner F, Ardern-Jones A, Murkin A et al. Association between hormonal genetic polymorphisms and early-onset prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2005;8:95-102.
26. Mir K, Edwards PJ, Paterson M, Hehir M, Underwood MA, Bartlett JMS. The CAG trinucleotide repeat length in the androgen receptor does not predict the early onset of prostate cancer. *British Journal International*. 2002;90:573-578.
27. Dagnelie PC, Schurman AG, Goldbohm RA, Van Den Brandt PA. Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. *British Journal of Urology International*. 2004;93:1139-1150.
28. Visvanathan K, Helzlsouer KJ, Boorman DW, Strickland PT, Hoffman SC, Comstock GW, O'Brien TG, Guo Y. Association among an ornithine decarboxylase polymorphism, androgen receptor gene (CAG) repeat length and prostate cancer risk. *The Journal of Urology*. 2004;171:652-655.
29. Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA, Ostrander EA. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Research*. 1997;57(6):1194-1198.
30. Zitzmann M, Brune M, Kormann B, Gromoll J, von Eckardstein S, von Eckardstein A., Nieschlag E. The CAG repeat polymorphism in the AR gene affects high density lipoprotein cholesterol and arterial vasoreactivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(10):4867-4873.
31. Platz EA, Leitzmann MF, Rifai N, Kantoff PW, Chen YC, Stampfer MJ, Willet WC, Giovannucci E. Sex Steroid hormones and the androgen receptor gene CAG repeat and subsequent risk of prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2005;14(5):1262-1269.

