

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ESTERÓIDE 5 α -REDUTASE
TIPO 2 EM BIÓPSIAS DE PRÓSTATA**

Autor: Osmar Luiz Magalhães De Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Walter José Koff

Co-orientadora: Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE

2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ESTERÓIDE 5 α -REDUTASE
TIPO 2 EM BIÓPSIAS DE PRÓSTATA**

Autor: Osmar Luiz Magalhães De Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Walter José Koff

Co-orientadora: Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade

**Tese Apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Medicina: Ciências
Médicas, como requisito para obtenção
do título de Doutor em Medicina:
Ciências Médicas.**

PORTO ALEGRE

2005

Ao meu filho Sérgio.

AGRADECIMENTOS

Dr. Walter José Koff, orientador deste trabalho, chefe do Serviço de Urologia do HCPA, reconhecido por sua elevada formação cultural, pela eficiente orientação, pela amizade e pelo incentivo dedicado ao meu aperfeiçoamento.

Dra. Vera Maria Treis Trindade, co-orientadora deste trabalho, por aceitar este desafio, pela competência na viabilização e execução do desenvolvimento científico deste trabalho.

Dra. Francine Muraro, bolsista deste projeto de pesquisa, cujo auxílio foi fundamental e inestimável em todas as etapas deste trabalho.

Dr. Emanuel Burk Santos, pela colaboração na coleta das biópsias e revisão dos prontuários.

Dra. Karin Marise Jaeger Anzolch, pela sua competência profissional, minha constante admiração e agradecimento.

Às Colegas Dra. Tanara Caroline Hennemann e Dra. Luciene Pinheiro Vianna, pela colaboração no laboratório de pesquisa.

Sra. Norma Silva, secretária do Serviço de Urologia, por sua atenção e competência.

Aos Professores, Médicos-contratados, Residentes e acadêmicos do Serviço de Urologia do HCPA, pela forma como fui adotado.

Aos colegas e professores do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pela colaboração na execução deste trabalho.

Aos colegas do Serviço de Medicina Nuclear, pelo estímulo, e em especial ao Dr. Bernardo Leão Spiro, grande incentivador.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Lista de Abreviaturas..... | 08 |
| Lista de Figuras..... | 09 |
| Lista de Tabelas..... | 11 |
| 1. Introdução..... | 12 |
| 2. Revisão Bibliográfica..... | 15 |
| 2.1. Próstata..... | 15 |
| 2.1.1. Anatomia e funções..... | 15 |
| 2.1.2. Câncer de Próstata (CaP) | 16 |
| 2.1.3. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) | 20 |
| 2.2. Enzima Esteróide 5 α -redutase..... | 23 |
| 2.2.1. Participação no Metabolismo de Andrógenos..... | 23 |
| 2.2.2. Mecanismo de Ação Enzimática..... | 25 |
| 2.2.3. Isoformas da enzima 5 α -redutase..... | 25 |
| 2.2.4. Deficiência da enzima 5 α -redutase..... | 29 |
| 2.2.5. Inibidores da enzima 5 α -redutase..... | 33 |
| 2.2.5.1. Classificação dos inibidores da enzima 5 α -redutase..... | 34 |
| 2.2.5.2. Finasterida..... | 35 |
| 2.2.5.3. Dutasterida..... | 39 |
| 2.3. Detecção de CaP..... | 40 |
| 3. Objetivos..... | 42 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 42 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 42 |
| 4. Referências..... | 43 |
| 5. Artigo em lingua Inglesa..... | 53 |
| Abstract..... | 54 |

| | |
|--|----|
| Introduction..... | 53 |
| Materials and Methods..... | 56 |
| Results..... | 59 |
| Discussion..... | 61 |
| Conclusion..... | 61 |
| References..... | 64 |
| 6. Artigo em língua portuguesa – | 75 |
| Resumo..... | 76 |
| Introdução..... | 77 |
| Materiais e Métodos..... | 78 |
| Resultados..... | 82 |
| Discussão..... | 84 |
| Conclusão | 84 |
| Referências..... | 88 |
| 7. Anexos..... | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| AR | receptor androgênico |
| CaP | Câncer de Próstata |
| 5 α -R | Esteróide 5 alfa-redutase |
| 5 α -R 1 | Esteróide 5 alfa-redutase tipo 1 |
| 5 α -R 2 | Esteróide 5 alfa-redutase tipo 2 |
| DHT | Diidrotestosterona |
| EUA | Estados Unidos da América |
| GnRH: | Hormônio de Liberação de Gonadotrofina |
| HPB | Hiperplasia prostática benigna |
| IPSS | International Prostatic Score Symptoms |
| STUI | Sintomas do trato inferior |
| LUTS | Low Urinary tract symptoms |
| TRUS | Transretal Ultra-sonografia |
| RTU-P | Ressecção Transuretral Prostática |
| PLESS | Proscar Long Term Efficacy and Safety Study |
| PIN | Neoplasia Intraepitelial Prostática |
| K_m | Constante de Michaelis-Menten |
| T | Testosterona |
| PCPT | Prostate Cancer Prevention Trial |
| PSA | Antígeno Prostático Específico |
| 3 α -diol | 5 α -androstane 3 α -17 β -diol |
| 3 β -diol | 5 α -androstane 3 β -17 β -diol |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato |
| NADP+ | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Oxidada |
| RNA _m | RNA mensageiro |
| SRD5A1 | Gene que codifica a proteína 5 α R1 |
| SRD5A2 | Gene que codifica a proteína 5 α R2 |

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota metabólica da Testosterona

Figura 2. Mecanismo de redução da Testosterona

Figura 3. Atividade da 5 α -redutase em diferentes pHs

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, para o ano de 2005, o número de casos novos estimados para o câncer de próstata (CaP) é de 46.330. Estes valores correspondem a uma incidência estimada de 51 casos novos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CaP é o mais freqüente em todas as regiões, com uma incidência estimada de 69/100.000 na região sul, 63/100.000 na região sudeste, 46/100.000 na região centro-oeste, 34/100.00 na região nordeste, e 20/100.000 na região norte. Entretanto, na cidade de Porto Alegre, a taxa bruta de incidência de casos novos de CaP é de 107,28 homens para cada 100.000 habitantes, superando os índices de câncer da pele não melanoma (1).

Na próstata, a conversão da testosterona (T) em diidrotestosterona (DHT) pela enzima esteróide 5 α -redutase (5 α -R) é necessário para o seu crescimento, manutenção e função, e está intimamente relacionado com o início e manutenção da hiperplasia prostática benigna (HPB), e do câncer de próstata (CaP). No entanto, o papel das duas 5 α -R isoenzimas tipo 1 (5 α -R1) e a tipo 2 (5 α -R2) na evolução e progressão da HPB e do CaP ainda é pouco conhecido(2).

O câncer de próstata é um tumor hormônio sensível que em situações de funcionamento normal ou patológico da célula prostática é governado principalmente por andrógenos. Uma estimulação androgênica prolongada tem sido observada como uma das causas do CaP. Por estas razões, o uso de inibidores da 5 α -R tem sido propostos como uma forma de prevenir a formação do CaP (3).

A hipótese de que a inibição da 5 α -R pode diminuir ou suprimir a ocorrência de CaP tem sido estudado por diversos autores (2,4), usando compostos tais como, episterida (5), turosteride (6), e PNU 157706 (7) os quais produzem uma redução no

crescimento do CaP em ratos. No entanto, o mais extensivo estudo até agora com inibidores da 5 α -R é a finasterida (4).

Thompson e colaboradores (2003), apresentaram dados do estudo "*Prostate Cancer Prevention Trial*" (PCPT) em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado em que foi estudado a finasterida (5mg/dia) na quimioprevenção do CaP, em 18.882 homens com idade superior a 55 anos, com exame digital retal normal e níveis de PSA inferiores a 3,0 ng/ml. 9.060 homens permaneceram até o final do estudo, sendo 4.368 pacientes no grupo finasterida e 4.692 pacientes no grupo placebo. 18,4% dos homens que foram tratados com a droga e que tinham dados para a análise final desenvolveram CaP, contra 24% dos pacientes que receberam placebo. Contudo, o grupo tratado com finasterida apresentou maior incidência de efeitos colaterais sexuais e os tumores desenvolvidos foram muito mais fulminantes (Escala de Gleason 7, 8, 9 e 10), do que aqueles registrados para o grupo placebo, que apresentou como efeitos adversos mais comuns os sintomas no trato urinário. Em 2004, os mesmos autores, em artigo derivado do PCPT, demonstraram que nos homens que receberam placebo, e que cujo PSA em sete anos de seguimento nunca foi maior que 4,0 ng/ml, e cujo exame digital retal nunca foi suspeito de CaP, a prevalência de CaP foi de surpreendentes 15,2%, sendo que 14,9% apresentavam escore de Gleason maior ou igual a 7. Esta conclusão só foi possível, porque todos os participantes do PCPT assinaram um termo de consentimento em que estava previsto uma biópsia no final do estudo (após 7 anos de seguimento) independente dos níveis de PSA ou do exame digital retal. Naqueles cujo PSA era de até 0,5 ng/ml a prevalência de CaP foi de 6,6%, nos com PSA entre 0,6 e 2,0 ng/ml foi de 10,1%, nos com PSA entre 2,1 e 3,0 ng/ml foi de 17% e nos com PSA entre 3,1 e 4,0 ng/ml foi de 26,9% (8,9).

Em doses clínicas, finasterida é um inibidor seletivo da 5 α -R2 proporcionando uma diminuição de 70% na concentração plasmática de DHT, e entre 68 a 86% na supressão intra-prostática de DHT (10, 11). A concentração residual de DHT, é

provavelmente devido a ação da 5α -R1, e pode ser suficiente para o crescimento das células do CaP. Algumas populações destas células podem ter uma maior sensibilidade para baixas concentrações de androgênios, ou para a amplificação de AR (12). Desta forma, pode ser importante atingir a 5α -R1 assim como a 5α -R2, em futuros ensaios de prevenção química (4). Resultados obtidos com o uso de inibidores das isoenzimas 5α -R1 e 5α -R2, demonstram estar envolvidos nas patologias da próstata. Entretanto o papel de cada uma destas isoenzimas no CaP ainda não é bem compreendido (13).

A próstata é um órgão histologicamente não homogêneo, e pode ser classificado em diferentes zonas (14), a zona periférica (ZP) é considerada como sendo o local de origem do câncer, a zona central (ZC) e a zona de transição (ZT) que é o local inicial do crescimento hiperplástico do HPB (15, 16).

Para que se possa entender o relativo envolvimento da 5α -R2 no desenvolvimento e progressão do CaP, a utilização de outros marcadores tumorais no controle precoce desta patologia e a utilização de fármacos bem como outras associações medicamentosas, diversos trabalhos deverão ser desenvolvidos nesta área (17).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRÓSTATA

2.1.1. Anatomia e funções

A próstata é uma glândula exócrina derivada de ácinos glandulares cuja origem embrionária deriva do segmento uretral do seio urogenital, cuja função é facilitar a fertilização por neutralizar o pH do sêmen e por participar na liquefação seminal. É na próstata que desembocam os ductos ejaculadores, sendo que, do volume de um ejaculado, cerca de 20% do líquido seminal é proveniente da próstata e 70% proveniente das vesículas seminais. A próstata é um órgão pélvico e extraperitônio e está coberta pela fâscia endopélvica e pela fâscia de Denonvillier. Na parte anterior, há gordura pré-vesical e há, também, o plexo da veia dorsal do pênis, posteriormente à próstata e a fâscia de Denonvillier está o reto (21). A irrigação arterial é realizada por ramos das vesicais inferiores e retais médias. McNeal, em 1968, dividiu a próstata em zonas: periférica (70% da glândula), de transição (2%), central (20%), e fibromuscular anterior (8 a 30%). Histologicamente, a próstata tem uma parte epitelial constituída por ácinos secretores, uma parte muscular lisa que comprime os ácinos, e um estroma conjuntivo que sustenta a glândula (22, 23).

A próstata é sede de várias patologias, entre elas destacam-se os processos inflamatórios, infecciosos ou não, denominados de prostatites, o aumento benigno da zona de transição da glândula, chamado de hiperplasia benigna da próstata (HPB) e o câncer de próstata (CaP) (24).

Sabe-se que a próstata tem seu crescimento mediado por andrógenos. Os principais andrógenos com ação prostática são a Testosterona (T) e a diidrotestosterona (DHT). Vários mecanismos regulatórios interferem na produção de

tais hormônios afetando indiretamente o funcionamento da glândula. O hormônio de liberação de gonadotrofina (GnRH) é um peptídeo secretado por neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos núcleos arqueados do hipotálamo. Este hormônio é liberado para dentro do sistema vascular porta hipofisiário e então é transportado para a glândula hipófise anterior onde estimula a liberação de duas gonadotrofinas: Hormônio luteinizante (LH) - o estímulo primário para a secreção de T pelos testículos e o hormônio folículo estimulante (FSH) que estimula, sobretudo, a espermatogênese (22).

2.1.2. Câncer de Próstata (CaP)

É a neoplasia mais comum em homens americanos, e a segunda causa de morte por câncer nos Estados Unidos da América (EUA). A prevalência aumenta com a idade, assim como o pico de incidência. Aos 50 anos de idade a chance de um homem ter CaP clinicamente oculto é de 40% (por achado de necropsias), mas de 9,5% para tumores clinicamente presentes (sintomas e sinais). A incidência do CaP tem aumentado nos últimos anos. Desde 1990 essa patologia ultrapassou os casos de câncer de pulmão e de cólon. Atualmente de terceira passou a ser a primeira em frequência em homens. Em torno de 40% dos tumores malignos que atingem homens são CaP (1). Segundo a American Cancer Society 19,8% dos homens que no momento têm mais de 50 anos desenvolverão CaP ao longo da vida. A incidência do CaP varia geograficamente, sendo menos comum no oriente (China, Índia e Japão), e mais comum em países escandinavos (Suécia, Noruega e Finlândia) e no Canadá. Acredita-se que o tumor de próstata ocorra em quase 100% dos homens com mais de 100 anos de idade. Entretanto, em grande parte desses indivíduos o tumor será indolente. A incidência do CaP apresentou um aumento expressivo no final dos anos 80 e início dos anos 90, especialmente nos Estados Unidos (25). Tal observação

reflete, em parte, ao progressivo envelhecimento da população mundial, já que $\frac{3}{4}$ dos casos de CaP ocorrem com mais de 65 anos, e também devido ao uso crescente da dosagem do antígeno específico prostático (PSA) desde o final da década de 80 (26).

Nos Estados Unidos da América, estima-se em 232.090 o número de novos casos de CaP no ano de 2005, o que torna a neoplasia maligna mais comum em homens, excluindo-se câncer de pele não-melanoma. O número estimado de mortes por CaP em 2005 é de 30.350 casos, o que identifica como a segunda causa de morte por câncer em homens. O CaP é responsável por 33% dos casos de câncer em homens e sua incidência continua a aumentar, apesar de crescer a uma taxa mais lenta que em anos anteriores. A chance de um homem desenvolver CaP durante sua vida é de 1 em 6 (17,81%). Com base em casos detectados entre 1995 e 2000, cerca de 90% dos CaP são diagnosticados em estágios locais ou regionais, e somente 10% com lesões à distância (28).

No mundo, o número de casos novos diagnosticados de câncer de próstata é de aproximadamente 543 mil casos por ano (o que representa 15,3% de todos os casos incidentes de câncer em países desenvolvidos e 4,3% dos casos em países em desenvolvimento). O câncer de próstata é o mais prevalente em homens, com uma estimativa de 1,5 milhão com diagnóstico nos últimos cinco anos. Mais do que qualquer outro tipo de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. O aumento acentuado nas taxas de incidência tem sido influenciado pelo diagnóstico de casos latentes em indivíduos assintomáticos. As taxas aumentaram especialmente em regiões onde o rastreamento através do PSA sérico é comum. A mortalidade por câncer de próstata é relativamente baixa, o que reflete, em parte, seu bom prognóstico. Nos países desenvolvidos a sobrevida média estimada em cinco anos é de 64% (variando entre 79 e 22%); enquanto que, para os países em desenvolvimento a sobrevida média é de 41% (entre 39 e 43%). A média mundial estimada é de 58%. Alguns estudos sugerem que dieta rica em gorduras e carne vermelha aumentaria o

risco de desenvolver o câncer de próstata, enquanto a ingestão de frutas e vegetais e exercício físico regular ofereceriam alguma proteção (1, 27).

Devido ao grande número de campanhas preventivas em que se utiliza o PSA para a detecção desta neoplasia, inicialmente houve um aumento dos casos nos EUA, porém hoje o número de novos casos diagnosticados tem declinado, provavelmente em virtude do esgotamento do reservatório (demanda reprimida de casos). Apesar da elevada prevalência e da elevada incidência da doença, o número de óbitos continua menor que os de neoplasia de pulmão e os de neoplasia de cólon. O caráter muitas vezes indolente do CaP justifica este fato. A virulência do tumor prostático é muito variável, indo de indolente a muito agressivo. De um modo geral, prevalecem os tumores indolentes. O tempo de duplicação do CaP, em geral, é um dos mais lentos dentre os tumores sólidos que acometem seres humanos. Devido a esse amplo espectro de gravidade, são utilizados vários parâmetros para avaliar o prognóstico de cada caso, bem como a importância relativa da neoplasia em relação à vida do indivíduo. Alguns desses fatores prognósticos são o estágio inicial, o grau de indiferenciação celular, conteúdo de DNA, volume tumoral total, e o PSA (28). Estágios iniciais baixos (como o T1a - menos de 5% de acometimento em próstata operada por via transuretral ou transabdominal para tratamento de HBP), baixo grau (tumores bem diferenciados), diplóides, de baixo volume total, e com PSA sérico baixo, geralmente têm prognóstico melhor. Devido à variabilidade biológica, quando se considera o potencial de agressividade do CaP (virulência variável), podemos dizer, genericamente, que há dois grupos de pacientes pouco influenciados por qualquer modalidade de tratamento que seja adotada. Estes grupos estão localizados em dois extremos: de um lado, o de muito baixo potencial biológico, ou seja, aqueles em que o tratamento não alterará a expectativa nem a qualidade de vida, e na outra ponta o de alta agressividade, isto é, aquele formado por pacientes que responderão mal, independentemente, do tratamento empregado. Contudo, entre esses dois extremos há um grande grupo intermediário que sofre capital influência a terapêutica, alterando

o desfecho esperado pela história natural da doença sem tratamento. Todavia, hoje em função da melhora da propedêutica, fundamentalmente, obtida graças a dosagem do PSA e também a biópsia transretal guiada por ultra-sonografia (TRUS), tem-se diagnosticado mais precocemente a doença, num momento em que a terapêutica possibilita maiores chances de cura. O diagnóstico precoce de neoplasias com considerável potencial biológico é o que está alterando a história natural do CaP (28). Fatores de risco tem sido apontado para o desenvolvimento desta patologia, sendo a prevenção primária e o controle desses fatores que poderão alterar as chances do indivíduo apresentar tal patologia não obstante o principal fator permaneça imutável: a idade. Outros fatores são a história familiar em parentes de primeiro grau e o aumento da ingestão de gorduras (21, 22).

A quantidade do PSA sérico aumenta quando a permeabilidade do tecido prostático está alterada, por um processo inflamatório infeccioso, neoplásico ou inespecífico. O PSA tem seus valores alterados em indivíduos portadores de HPB, sobretudo naqueles com glândulas muito volumosas em função da doença. No entanto, o aumento ocorrido nas prostatites e nas neoplasias é muito maior do que na HPB, tornando-se um importante instrumento na detecção, rastreamento, acompanhamento e seguimento pós-operatório de pacientes com CaP (28,29).

A maioria dos CaP são hormônio dependentes, sendo que a resposta do CaP metastático à ablação hormonal ocorre em cerca de 75% dos casos. A T é o principal andrógeno envolvido na formação da DHT, através da enzima esteróide 5 α -redutase. A DHT liga-se então a receptores citoplasmáticos e entra no núcleo da célula, onde comanda a transcrição do DNA em mRNA que será traduzido no citoplasma em proteínas com efeito biológico. O bloqueio da DHT, seja pelo bloqueio da T ou pela neutralização da conversão pela inibição da enzima esteróide 5 α -redutase, diminui a atividade da célula prostática normal ou neoplásica (30).

2.1.3. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A HPB é uma doença de grande prevalência em homens com mais de 50 anos. Em estudos de necropsias verificou-se uma prevalência de 50% de casos dessa doença em homens na sexta década de vida. À medida que a idade aumenta há também uma maior incidência desta patologia, HPB (31). A HPB é uma doença em que ocorre uma proliferação do tecido da zona de transição, provocando muitas vezes uma síndrome clínica chamada de Sintomas do Trato Urinário Inferior (STUI) ou LUTS (Lower Urinary Tract Symptoms) causada pela obstrução infravesical provocada pelo aumento do tecido prostático periuretral correspondente à zona de transição. Sabe-se atualmente que a HPB tem seu desenvolvimento mediado por fatores endócrinos e parácrinos (32). Os dois principais fatores envolvidos na gênese da HPB são a idade (envelhecimento) e os andrógenos, sobretudo a DHT. Acredita-se que fatores parácrinos e autócrinos envolvendo as células do estroma e do epitélio prostático estejam envolvidos neste processo, bem como uma progressiva falha no processo de apoptose celular. Há um aumento na proliferação (hiperplasia), e não um crescimento celular propriamente dito (hipertrofia), tanto no componente estromal (muscular liso e conjuntivo) quanto no epitelial na zona de transição. A contração do músculo liso prostático (do estroma e do colo vesical) é estimulada pela ação simpática mediada pela noradrenalina, que atua em alfa-receptores, sobretudo nos alfa-1. Por isso o bloqueio alfa-adrenérgico alivia a obstrução provocada pela a HPB sem, contudo, que haja diminuição do volume glandular (18, 19, 33, 34). Já inibidores da enzima 5 α -redutase tipo 2 (finasterida) mostraram em estudos como o PLESS (Proscar Long Term Efficacy and Saffety Study) uma diminuição dos sintomas às custas de uma redução no volume prostático provocada pela diminuição da DHT (31).

Vários estudos a cerca da história natural da HPB têm sido conduzidos (31,32). Estima-se um crescimento anual médio de quatro gramas de tecido prostático em indivíduos com HPB. Ademais, as manifestações dessa doença são oscilantes, ou

seja, com períodos de agravamento intercalados de recrudescimento. Os desfechos principais seriam a melhora espontânea, a progressão dos sintomas de esvaziamento (obstrutivos) e de armazenamento (irritativos), a retenção urinária aguda, a insuficiência renal, a litogênese vesical e a necessidade de cirurgia. Destaca-se o fato de que o volume da próstata não se relacionar diretamente com a intensidade dos sintomas, havendo próstatas pequenas (+/- 20g) provocando mais sintomas do que próstatas até mesmo muito grandes (> 50g). No primeiro caso, predominaria o componente “funcional” mediado por receptores adrenérgicos alfa-1, no segundo, o componente “anatômico” determinado pelo aumento volumétrico da glândula. Isso explica melhor o funcionamento da finasterida em próstatas grandes quando comparadas com as pequenas (35). A avaliação clínica desta síndrome é realizada através dos escores de sintomas obtidos através do questionário auto-aplicável denominado IPSS (International Prostatic Score Symptoms), do toque digital retal, do exame qualitativo de urina, da urocultura, da determinação sérica do PSA, da avaliação da função renal pela dosagem da creatinina sérica, da avaliação de resíduo pós-miccional pela ultra-sonografia abdominal, e dos estudos de fluxo (urofluxometria e/ou estudos de pressão-fluxo). Em casos de suspeita de outras causas de STUI que não a HPB ainda podem ser realizados a uretrocistografia retrógrada e miccional, a uretrocistoscopia, a cistometria, a ultra-sonografia transretal com biópsia de próstata, entre outros exames orientados pelas suspeitas clínicas (36).

O tratamento da HPB varia desde a observação até a prostatectomia a céu aberto (transvesical ou retropúbica). Não obstante, entre esses extremos há tratamentos progressivamente mais invasivos, entre eles o uso de fitoterápicos, inibidores da 5α -redutase, alfa-bloqueadores, termoterapia, stents uretrais, prostatectomia, ressecção transuretral da próstata (RTU-P). Atualmente, o padrão ouro é a RTU-P, embora a prostatectomia promova, em geral, maior alívio dos sintomas quando comparada com a RTU-P. Cada vez mais a HPB tem se tornado uma doença de tratamento clínico farmacológico graças ao advento e ao

desenvolvimento de drogas comprovadamente eficazes e seguras conforme mostram vários estudos clínicos de fase III desenhados para avaliar alfa-bloqueadores e inibidores da 5 α -redutase (18, 33, 34, 36).

Estudos em que foi usado a finasterida mostraram de 70 a 80% de diminuição na concentração da DHT sérica e intraprostática. Além disso, houve uma diminuição de 15 a 25% no volume prostático, sobretudo na zona periuretral. Quanto maior o volume basal da próstata, maior é a melhora do fluxo e do escore de sintomas prostáticos. Parâmetros relacionados à qualidade de vida também melhoram com o uso desta medicação. Quando comparada com alfa-bloqueadores (terazosina e doxazosina), a finasterida consegue alterar a história natural da HPB, ou seja, a droga promove diminuição da chance do paciente ter retenção urinária aguda (RUA), assim como redução na chance do paciente ter de se submeter a procedimentos cirúrgicos para tratamento da HPB. Nem todos pacientes respondem ao tratamento com finasterida, sobretudo aqueles com próstatas pequenas, mas naqueles que respondem a melhora sintomática tende a ser igual a obtida com a utilização de alfa-bloqueadores (37).

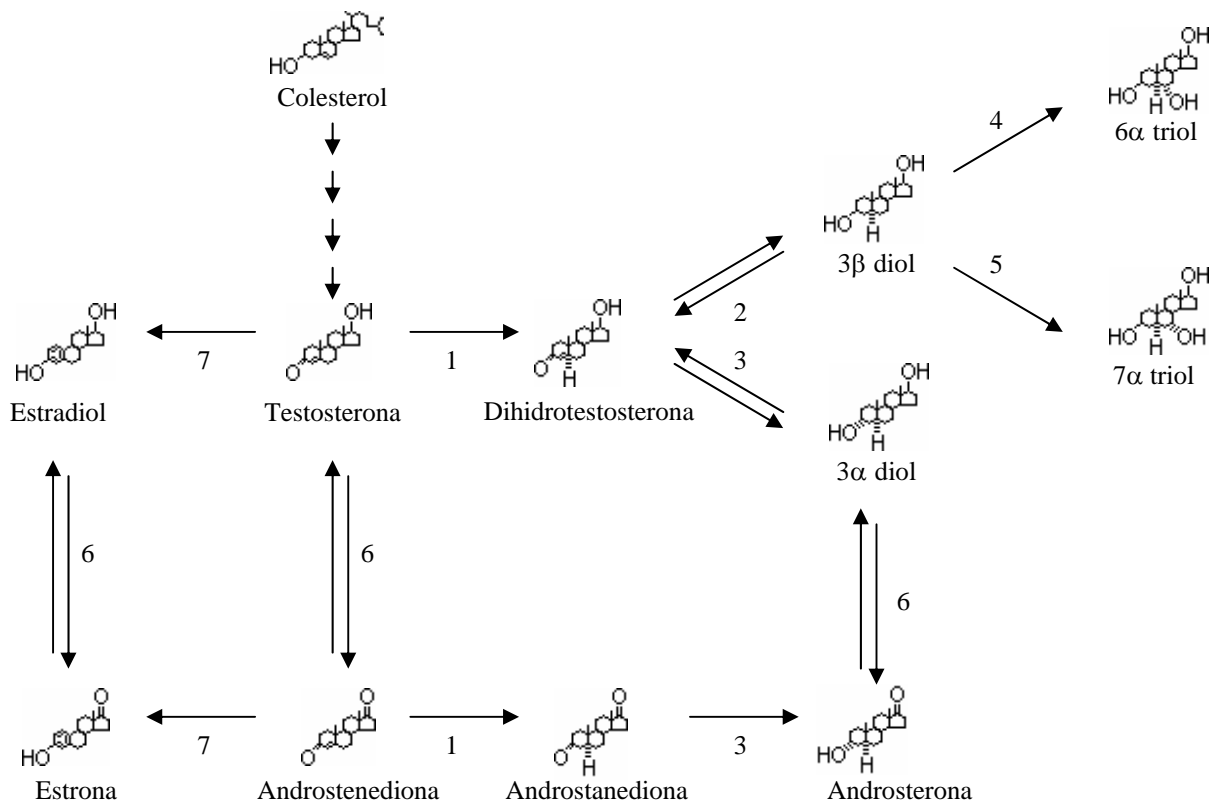
2.2. ENZIMA ESTERÓIDE 5 α -REDUTASE

2.2.1. Participação no metabolismo de andrógenos

O mecanismo de ação dos hormônios esteróides inicia quando estes migram da corrente sanguínea para a célula através da membrana celular através de um mecanismo de difusão. Uma vez dentro da célula, os esteróides formam complexos através de ligações com proteínas, chamadas de receptores, que são específicas deste tecido (38). Receptores esteróides foram descobertos em 1968 mudando a concepção do mecanismo de ação dos hormônios esteróides nos dias de hoje (17,42). Mais tarde Metcalf (39) demonstrou que a ligação hormônio-receptor, desencadeia uma cascata de eventos que permitem a expressão de genes específicos. Dentro da célula, os hormônios esteróides sofrem modificações em sua estrutura, produzindo moléculas metabolicamente ativas, capazes de desenvolver uma cascata de reações.(38). Estas mudanças moleculares são devidas à presença de enzimas específicas em cada tecido. Na próstata, por exemplo, estes esteróides têm importante papel na virilização masculina, na diferenciação e função sexual, anabolismo e comportamento (41). A glândula prostática depende fundamentalmente de tais hormônios para seu desenvolvimento, maturação e funcionamento. Contudo, a T não é o andrógeno primário responsável por esses eventos, e sim, um metabólito mais potente resultante da reação catalisada pela 5 α -redutase, a DHT (40). DHT e T podem ser oxidadas pela 17 β -hidroxidesidrogenase para 5 α -androstano-3,17-diona (androstanedione) e Δ 4-androstene-3,17-diona (androstenediona), respectivamente. A DHT pode ser ainda metabolizada a 5 α -androstano 3 β , 17 β -diol (3 β -diol) pela reação reversível, NADPH dependente, catalisada pela enzima 3 β -hidroxiesteróide-

dehidrogenase e 5α -androstano- $3\alpha,17\beta$ -diol (3α -diol) pela reação reversível, NADPH dependente, catalisado pela enzima 3α -hidroxidoesteróide-dehidrogenase. O 3β -diol, por sua vez, é metabolizado a 6α -triol, pela ação irreversível da enzima 6α -hidroxilase, ou a 7α -triol pela reação irreversível da enzima 7α -hidroxilase. A administração de 3α -diol induz um forte efeito androgênico pela rápida conversão em DHT, ao passo que a administração de 3β -diol não apresenta efeito androgênico significativo, posto que é convertido de forma rápida em metabólitos inativos o 6α -triol e 7α -triol. Os trióis são metabólitos finais da T na célula prostática. A T pode também ser convertida a androstenediona, através da reação reversível catalisada pela enzima 17β -hidroxioesteróide-dehidrogenase (17β HSD). A androstenediona pode então ser convertida pela enzima 5α -R à androstandiona em uma reação irreversível. Essas reações ocorrem porque a 5α -redução dos substratos esteróides tornam seus grupamentos 3-oxo mais susceptíveis à redução. Modificações posteriores reduzem a afinidade do esteróide às proteínas ligantes, tornando-o mais hidrofílico, o que facilita sua excreção. Por essas razões, levantou-se a hipótese de que a 5α -R participaria do catabolismo de substratos esteróides, porém, pesquisas realizadas em 1960 mostraram que esta redução é irreversível, indicando que a reação catalisada pela 5α -R é uma etapa regulatória do metabolismo de esteróides (43).

Além dos andrógenos, a enzima 5α -R atua em todos os outros hormônios esteróides com grupamento cetona em C_3 e dupla ligação entre C_4 e C_5 em suas estruturas, incluindo glicocorticóides, progestágenos e mineralocorticóides (41).



- 1- 5 α - redutase
- 2- 3 β -hidroxidesidrogenase
- 3- 3 α -hidroxidesidrogenase
- 4- 6 α -hidroxilase
- 5- 7 α -hidroxilase
- 6- 17 β -hidroxidesidrogenase
- 7- aromatase

Figura 1. Rota Metabólica da Testosterona.

Adaptado de Bjelfman et al, 1997.

2.2.2. Mecanismo de ação enzimática

O mecanismo de ação é compatível com a região conhecida e estereoquimicamente envolvida na reação de redução com a doação direta do hidrogênio do NADPH à posição 5 da T, assim dando a principal formação ao enolato C-3, C-4. O enolato, presumivelmente, irá se estabilizar com um resíduo eletrofílico (E^+) no sítio ativo. Este processo pode ser visto, alternativamente, como uma ativação da enona por (E^+) levando a uma possível formação de espécies positivamente polarizadas que aceitam um hidrogênio do NADPH ao C-5. A enzima através de um tautomerismo libera o produto DHT com a posterior liberação do $NADP^+$ (38).

Portanto a reação tem um mecanismo de bissubstrato ordenado, no qual o NADPH é o primeiro substrato a ligar e o $NADP^+$ é o último produto a deixar a enzima (41).

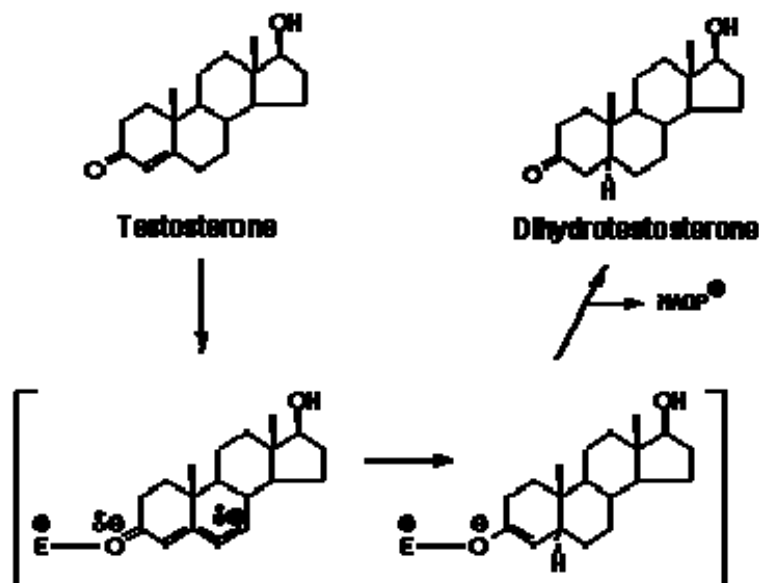


Figura 2. Mecanismo de redução de Testosterona

Adaptado de Titus MA, et al. 2005.

2.2.3. Isoformas da enzima 5 α -redutase

Duas isoformas da 5 α -redutase foram identificadas em humanos, ratos, camundongos e macacos, e são conhecidas como tipo 1 (5 α -R1) e tipo 2 (5 α -R2) baseado na ordem cronológica em que foram descobertas (22). Embora ambas isoenzimas catalisem a mesma reação, elas compartilham um limitado grau de homologia na seqüência peptídica e cada uma possui distintas propriedades bioquímicas (41). Elas são proteínas compostas por 254-260 aminoácidos com peso molecular estimado em 28-29 kDa. Possuem cerca de 40% de aminoácidos hidrofóbicos distribuídos através da molécula, sugerindo que as mesmas encontram-se profundamente embebidas na bicamada lipídica (38, 43).

A média das seqüências idênticas entre as isoenzimas de uma determinada espécie é de aproximadamente 46%, enquanto que este parâmetro entre as mesmas isozimas de espécies diferentes é de 60% para a 5 α -R1 e 77% para a 5 α -R2 (41).

A 5 α -R1 tem amplo pH ótimo que se estende até a faixa alcalina (pH 6-8,5), enquanto que a 5 α -R2 tem um pH ótimo restrito ácido (pH 5) (Figura 3). A base bioquímica do pH ótimo ácido para a 5 α -R2 não é completamente entendida. Este pH poderia refletir uma localização da proteína em um compartimento subcelular ácido como o endossoma ou lisossoma. Contudo, a atividade desta isozima, quando transfectada em células CHO (Chinese Hamster Ovary), não foi afetada por compostos que neutralizam o pH de compartimentos subcelulares ácidos. Além disso, estudos imunocitoquímicos mostraram que ambas isoenzimas 5 α -R1 e 5 α -R2 estão presentes no retículo endoplasmático das células CHO, um compartimento com pH neutro. Outras pesquisas com estas células sugerem que a 5 α -R2 tem pH ótimo neutro no estado nativo. Porém, com a lise física da membrana plasmática, a isoenzima passa a apresentar atividade somente em pH 5. A mudança no pH

requerido pode refletir uma alteração conformacional da isoenzima, já que o pH ótimo de uma enzima é, usualmente, consequência do estado iônico dos aminoácidos carregados no sítio ativo (43).

O valor do K_m aparente da 5α -R1 para a T como substrato, em lisados de células ou em células CHO intactas, encontra-se na faixa de 1-5 μ M. Em pH 5, o K_m aparente para a T da 5α -R2 varia de 0,1-1 μ M. Para ambas isoenzimas, o K_m aparente para o cofator NADPH varia de 3-10 μ M. Reforçando a idéia de que a 5α -R2 atua em pH neutro dentro da célula, há o valor de K_m em pH 7 para esta isoenzima, que se encontra na faixa de 4-50 nM em células lisadas, permeabilizadas ou intactas (44). Esses dados enfatizam a maior afinidade para substratos esteróides e a maior eficiência da 5α -R2 no referido pH (43). Os valores de K_m para as isoenzimas da próstata humana, em relação ao substrato T, têm grande variabilidade, de acordo com diferentes autores e com a fração subcelular que origina a 5α -R.

As diferentes respostas obtidas dos inibidores para as duas 5α -R isoenzimas, sugerem que diferentes seqüências estão localizadas nos diferentes sítios de ligação (44).

A localização tecidual da 5α -R1 e da 5α -R2 ainda é uma questão muito discutida (44). No início da década de 1990, quando duas isoenzimas foram identificadas, supunha-se que a próstata apresentava somente a 5α -R2, enquanto a 5α -R1 era encontrada somente no fígado e na pele. Através de técnicas cada vez mais sensíveis empregadas para detectar as proteínas ou seus respectivos mRNA, concedendo uma individualização para cada isoenzima com seu respectivo tecido alvo e com relativos diferentes índices de distribuição em cada órgão. A 5α -R2 é encontrada principalmente na próstata, pele genital, no cabelo, nas glândulas sebáceas, no fígado e no cérebro (44).

A localização subcelular da 5α -R pode variar, dependendo da fonte enzimática. Estudos de imunohistoquímica mostraram uma apresentação perinuclear para a

isoenzima tipo 2 humana, na próstata. Entretanto, nas células hepáticas 5α -R1 e 5α -R2, foram detectadas em uma distribuição reticular. As diferentes localizações podem refletir uma diferença na proliferação do retículo endoplasmático, já que esta organela é derivada da extensão da superfície da membrana nuclear. Alternativamente, a diferença pode ter um suporte regulatório, já que as células da próstata são andrógeno dependentes, enquanto que as células do fígado não. A localização perinuclear da enzima pode facilitar a subsequente junção do produto com o receptor nuclear androgênico (43).

A 5α -R1 é amplamente distribuída, mas é encontrada em maior concentração na pele e no fígado. Já a 5α -R2, apesar de ser encontrada também no fígado e no couro cabeludo, apresenta uma distribuição primária nas estruturas masculinas como a vesícula seminal, epidídimo e próstata (42, 45). Nas duas últimas estruturas citadas, a distribuição espacial das isoenzimas difere de outros acessórios sexuais masculinos. As células epiteliais do epidídimo expressam a 5α -R1, enquanto que o estroma expressa a 5α -R2. Estudos de hibridização *in situ* e imunohistoquímicos revelaram que a 5α -R2 é expressa nas células estromais e no epitélio basal da próstata, significando que a DHT passa através da membrana plasmática para as células epiteliais apicais (42). Porém, há uma série de opiniões divergentes em relação à existência de uma ou das duas isoenzimas na próstata humana. Enquanto alguns autores afirmam que há apenas a presença da 5α -R2 (42,43), outros se esforçam em provar que ambas isoenzimas atuam em tal órgão, através da comparação dos diferentes valores de K_m aparente da 5α -R do estroma e do epitélio para a T (47). Além disso, alguns estudos mostraram que não há expressão da 5α -R1 humana na próstata, enquanto que o mRNA tem sido identificado em ambas as células do estroma e do epitélio prostático (48).

Os genes que codificam as isoformas da 5α -R humana são SRD5A1 e SRD5A2 para 5α -R1 e 5α -R2, respectivamente. Eles possuem estruturas similares,

com 5 exons separados por 4 introns. As posições dos introns são essencialmente idênticas entre os dois genes. O gene responsável pela 5α -R1 está localizado no cromossomo 5, enquanto que o gene que codifica a 5α -R2 se encontra no cromossomo 2. Múltiplos polimorfismos foram identificados em ambos os genes, mas suas conseqüências fisiológicas não são conhecidas. Em humanos, ambas isoformas são constitutivamente expressas no fígado, sem uma diferença significativa entre os sexos. Na pele, a expressão da 5α -R1 segue um padrão durante o desenvolvimento: o nível da isoenzima diminui a níveis não detectáveis até 2 a 3 anos de idade, mas reaparece na puberdade e se mantém posteriormente. Diferentemente, a 5α -R2 é expressa (transientemente), somente durante o período pré-natal. Nos tecidos dependentes de andrógenos, a expressão da 5α -R2 é (constitutiva) (41).

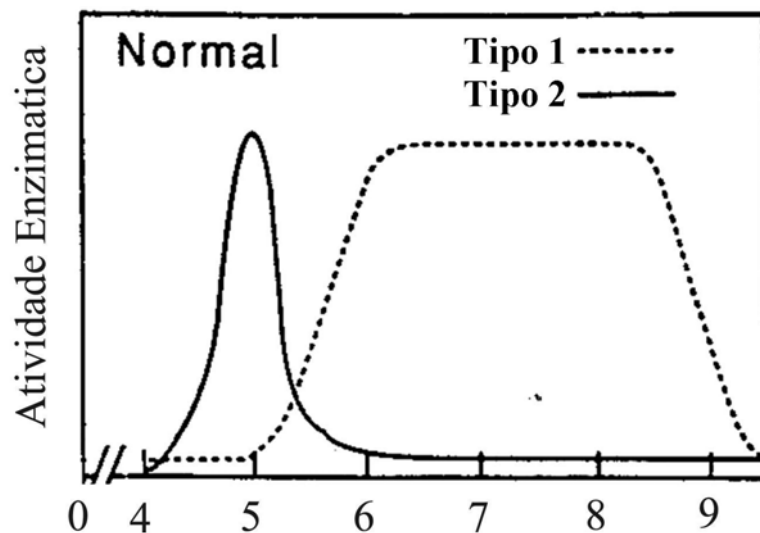


Figura 3. Atividade da 5α -redutase em diferentes pHs (adaptada de Russel e Wilson, 1994).

2.2.4. Deficiência da enzima 5 α -redutase

Dois genes codificam a enzima 5 α -R, sendo um par para cada isoenzima. Embora estes genes estejam localizados em cromossomas diferentes, apresentam uma grande semelhança. Estes genes estão presentes em todas as espécies examinadas até o momento. Os introns e exons se assemelham em muito (41, 49). Ambos genes para a 5 α -R apresentam cinco exons e quatro introns, e a posição dos introns é idêntica para os dois, sugerindo que os genes devem proceder de uma duplicação original única. O gene que codifica a 5 α -R1 ocupa um cromossomo diferente do que codifica a 5 α -R2, e são denominados de SRD5A1 e SRD5A2, respectivamente. O SRD5A1 está localizado na parte distal do braço curto do cromossomo 5 (banda p15), ao passo que o SRD5A2 está localizado na banda p23 do cromossomo 2 (41, 43, 50, 51).

Existem três estágios temporais no desenvolvimento do fenótipo masculino: o primeiro começa com a formação do sexo cromossômico (genótipo 46,XY) que inicia com a fecundação. A segunda etapa é determinada pela presença do cromossomo Y através do gene SRY (43). Então se define o sexo gonadal, pois o gene SRY do cromossomo Y determina a diferenciação testicular da gônada primordial indiferenciada. Uma vez que a gônada fetal passa a ser o testículo, esse, por sua vez, passa a produzir T, iniciando o terceiro estágio do desenvolvimento fenotípico masculino. A T age sobre o AR, e essa interação T-AR desencadeia a formação de estruturas genitais masculinas internas, tais como os epidídimos, as vesículas seminais, e os ductos deferentes. No trato urogenital embrionário a T é convertida em DHT pela 5 α -R, que se liga ao mesmo AR da T, mas com afinidade muito superior. A interação DHT-AR finalmente induz a diferenciação da genitália externa (pênis e escroto) e ao desenvolvimento da próstata. Essa glândula começa a ser formada na

10ª semana de gestação sob influência da DHT sobre o segmento uretral do seio urogenital. Isso então completa os estágios de desenvolvimento ontogenético (intra-uterino). Nota-se que o processo que leva a formação dos genitais externos masculinos bem como a formação da próstata não tem interferência nos passos que o antecedem no desenvolvimento sexual. Por isso, caso haja alterações no gene SRD5A2 e, por conseguinte, na codificação da 5α -R2, e com isso a conseqüente diminuição da DHT, produzindo alterações importantes no desenvolvimento genital externo e da próstata sem, contudo, haver alterações importantes no desenvolvimento dos genitais internos (testículos, epidídimos, vesículas seminais, e ductos deferentes). O aumento da atividade da 5α -R1 na pele e durante a puberdade e, também, a presença contínua desta enzima no fígado parecem explicar porque a maior parte dos indivíduos acometidos pela deficiência da 5α -R2 acabam virilizando e extensão variável na puberdade (52).

Mutações no gene SRD5A2, que originam 5α -R2 defeituosas e conseqüentemente afetam a produção de DHT, originam raras doenças na diferenciação sexual masculina (41). Estudos em indivíduos da República Dominicana, em 1960, que possuíam determinada mutação em tal gene, revelaram que a atenuada atividade enzimática foi manifestada com uma genitália externa ambígua no nascimento, mas com ampla diferenciação testicular e um sistema interno masculino normal (41). Em homens com essa doença genética, na puberdade, ocorre a produção de T pelas células de Leyding, o crescimento do pênis, a ampliação das cordas vocais, obtenção da libido e o desenvolvimento da estatura masculina. No entanto, suas próstatas permanecem rudimentares e eles não desenvolvem calvície ou acne. Essas características fenotípicas distinguem os efeitos da T daqueles da DHT e indicam o papel da 5α -R2 na embriogênese e no crescimento da próstata (41).

A maioria dos indivíduos afetada pela doença viriliza em várias extensões da puberdade. Desde que o fígado e a pele constituem uma ampla proporção da massa

corpórea (~25%) e desde que esses dois órgãos expressem uma quantidade substancial da 5α -R1, parece razoável concluir que a virilização observada é devida à síntese de DHT pela isoenzima 1. Se essa hipótese for verdadeira, ela reforça a idéia de que a DHT pode atuar como um verdadeiro hormônio circulante, tão bem quanto um mediador autócrino ou parácrino da ação androgênica (43). Também é válido observar que a mera presença da próstata nesses indivíduos suporta a noção que outros fatores de crescimento estão envolvidos na organogênese (42). Por outro lado, em indivíduos que possuem mutações que eliminam a atividade de receptores androgênicos, ocorre a síntese de T e de DHT, mas não há desenvolvimento de estruturas reprodutivas masculinas externas ou internas (43).

Em resumo, as características endócrinas da deficiência da 5α -R2 são as seguintes:

- a) níveis masculinos normais a altos de T plasmática e baixos níveis de DHT;
- b) aumento na relação entre os níveis de T e DHT em adultos e após estímulo com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) em crianças;
- c) elevada relação entre 5β e 5α metabólitos urinários derivados de andrógenos;
- d) reduzida conversão de T para DHT;
- e) aumento na relação entre os níveis de 5β e 5α metabólitos urinários derivados de esteróides com 21 carbonos;
- f) marcada elevação entre níveis de T e DHT, após a administração de T;
- g) níveis de LH plasmático normais ou fracamente aumentados, sugerindo que a DHT desenvolve um papel mínimo na regulação de gonadotrofinas (45).

Na maioria dos homens portadores de mutação, a doença ocorre de forma autossômica recessiva. Contudo, o estudo de alguns indivíduos afetados mostrou apenas mutações simples. Esses achados levantam a interessante possibilidade de que certas mutações podem ser dominantes. Há também uma explicação alternativa,

de que uma segunda mutação está numa região do gene ainda não estudada. Vinte e nove diferentes mutações no gene tipo 2 já foram identificadas, e vinte e duas delas afetam a velocidade máxima da enzima. Dentre elas, há um grupo que diminui severamente a atividade enzimática, mas tal atividade ainda é mensurável. Essas mutações podem ainda ser subdivididas em duas classes: aquelas que afetam a habilidade da enzima em ligar o substrato T e aquelas que diminuem a afinidade pelo cofator NADPH. As mutações que aumentam o K_m aparente para a T situam-se nas duas extremidades da 5α -R2, enquanto que aquelas que afetam a junção com o NADPH localizam-se através de toda a metade da carboxila terminal da proteína (43). Na verdade, as localizações sugerem um arranjo não simétrico dos aminoácidos que caracterizam os dois domínios funcionais da enzima. Além disso, as mutações alteram a junção com substrato ou cofator, mas não ambos, sugerindo também que os aminoácidos determinantes desses domínios podem ser distintos (43).

Outras patologias estão associadas à disfunção da atividade da 5α -R, devido à grande influência de hormônios masculinos, dentre os quais a DHT é o mais ativo agonista dos receptores e sua atuação conjunta com outros androgênios suporta o crescimento da glândula prostática (19).

Bjelfman et al (1997) encontraram uma diferença significativa nos níveis de mRNA específico para a 5α -R2 em tecidos com HPB e CaP. Como esperado, foram encontrados valores maiores na expressão do mRNA na HPB do que no CaP. Esses resultados concordaram com estudos anteriores que sugeriram que a maior atividade da 5α -R na próstata hiperplásica era devida a um aumento na quantidade desta enzima (54). No entanto, maiores investigações são necessárias para elucidar a relação entre os níveis da expressão da 5α -R2, da proteína e da atividade específica da enzima nos diferentes tipos de tecidos prostáticos (53).

2.2.5. Inibidores da enzima 5 α -redutase

Animais castrados não desenvolvem HPB nem CaP, e ainda sofrem marcada redução no tamanho e peso da próstata. Esse fato está associado ao fenômeno de apoptose das células epiteliais, e pode ser revertido com a administração de T. A observação de que a falta de estímulo hormonal impede o crescimento prostático provocou o desenvolvimento de drogas capazes de afetar o metabolismo androgênico (49). Enquanto, no útero, a DHT é claramente necessária para o desenvolvimento normal da genitália masculina, na idade adulta, ela não parece desempenhar um importante papel fisiológico, mas está envolvida no desenvolvimento de várias doenças dependentes de andrógenos. Por esta razão, ocorreu o desenvolvimento de inibidores da 5 α -R, para o tratamento de desordens desencadeadas pelo produto da reação catalisada por esta enzima, como por exemplo, o crescimento da próstata que culmina com o aparecimento de HPB (54). Em homens com deficiência na 5 α -R, há menor incidência de calvície e de acne, sugerindo que os inibidores podem também ser usados no tratamento dessas patologias. Finalmente, o hirsutismo é mediado pela DHT, assim como estágios precoces do CaP são andrógenos dependentes em alguns homens (43).

2.2.5.1. Classificação dos inibidores da enzima 5 α -redutase

Um certo número de esteróides compete com a T pela 5 α -R. Alguns substratos endógenos, como a progesterona, inibem a redução da T in vitro, mas são metabolizados muito rapidamente e, portanto não conseguem ser inibidores efetivos in vivo. A estrutura requerida para um inibidor sintético da 5 α -R inclui uma configuração estável no anel A da molécula esteroidal, mimetizando o estado de transição na conversão da T à DHT. Isso permite que o inibidor se ligue com firmeza ao sítio ativo da enzima (54).

Várias classes de inibidores não-esteróides foram descritas. Entre elas incluem-se a dos derivados do ácido benzilfenóxibutanóico, como o composto ONO3805, que tem capacidade para inibir a 5 α -R humana. Uma segunda classe, a das benzoquinolinonas que tem como representante a substância tricíclica LY191704, com a presença de anel um heterocíclico contendo nitrogênio e um grupamento 3-oxo, semelhante aos 4-azaesteróides (42).

Contudo, a maioria das classes de inibidores da 5 α -R são moléculas derivadas de esteróides. Alguns derivados de 6-azaesteróides são potentes inibidores de ambas as formas da 5 α -R, como o GI157669X, que possui um anel B heterocíclico. Estes são os únicos compostos com dupla ligação entre C₄ e C₅ e, portanto, são os que melhor mimetizam o substrato natural da 5 α -R. O composto SKF105657 é um representante de uma classe adicional de inibidores, que possui modificações na posição 3 do anel A. Essas alterações mimetizam a junção da enzima com enolato gerando um mecanismo de inibição diferente. Os representantes dos 4-azaesteróides mais estudados são os compostos 4-MA e o finasterida. O composto 4-MA é um potente inibidor da 5 α -redutase na próstata de ratos. Possui muito fraca afinidade para o receptor androgênico, o que diminui os efeitos anti-androgênicos como a impotência

ou a ginecomastia. Contudo, estudos subseqüentes, mostraram que o 4-MA também inibe a 3β -hidroxiesteróide-desidrogenase, outra enzima do metabolismo esteroidal, causando hepatotoxicidade (43).

2.4.5.2. Finasterida

Finasterida difere do 4-MA pela presença da dupla ligação no anel A, a falta da 4-metil substituição e a presença do grupo t-butilamida na posição 17 (43). Estudos de inibidores usando tecido prostático humano como fonte de 5α -R levaram à descoberta de finasterida ou N-(1,1-dimetiletil)-3-oxo-4aza-5- α androst-1-ene-17 β carboxamida, o primeiro inibidor altamente específico, potente, oralmente ativo, desenvolvido para uso clínico sem atividade no receptor androgênico. O fármaco não apresentou atividades intrínsecas androgênicas, estrogênicas, progestagênicas ou outras propriedades esteroidais e não afetou as ações fisiológicas da T. Estudos mais recentes mostraram que finasterida é um potente inibidor da 5α -R 2, com pequena atividade contra a 5α -R1, a isoenzima primária da pele (54).

As distintas estruturas químicas dos inibidores da 5α -R sugerem diferentes mecanismos de inibição. A maioria dos 4-azaesteróides corresponde a inibidores competitivos em relação ao substrato, enquanto que alguns compostos esteróides e não esteróides exibem cinética não competitiva ou incompetitiva na presença de substrato ou cofator. Esse último mecanismo de inibição é comum entre esteróides com modificações que deixam o anel A negativamente carregado (43).

Finasterida é bem absorvido por via oral, possui meia vida de cerca de 7 horas e é excretado através da urina e das fezes (32). Em homens, uma dose única de 0,5 mg do medicamento pode diminuir os níveis de DHT no soro em 65% por um período

de 5 a 7 dias. Essa eficácia foi inicialmente atribuída ao baixo K_i nanomolar para a 5α -R2, um mecanismo de inibição competitivo com o substrato, e a seletividade do inibidor. Estudos subseqüentes mostraram que finasterida é de fato um inativador tempo-dependente da 5α -R2. Finasterida possui uma lenta e constante taxa de dissociação ($t_{1/2} > 30$ dias), levando a uma inibição irreversível (35).

A inibição tempo-dependente da 5α -R por finasterida significa que os valores de IC_{50} ou K_i determinados em ensaios a curto prazo são uma sub-estimativa grosseira da verdadeira constante de inibição. Ensaios nos quais baixas concentrações de finasterida são usadas juntamente com incubações por extensos períodos de tempo revelaram um K_i aparente para a 5α -R1 humana de 1 nmolar sobre baixos picomolar para a 5α -R2. Não está claro se a inativação da enzima é o resultado de uma ligação covalente da droga ou se a junção causa uma mudança conformacional irreversível na proteína. Contudo, a presença da ligação dupla entre C_1 e C_2 em 4-azaesteróides é crucial para a inativação tempo-dependente da enzima (43).

A redução dos níveis de DHT no soro não ocorre devido a atividade da 5α -R1 no fígado, que não é significativamente afetado por finasterida. Em associação com a marcada redução de DHT, um pequeno aumento (aproximadamente 15%) na concentração de T sérica é observada, os níveis de estradiol, em reação catalisado pela enzima aromatase, aumentam similarmente e são correlacionados com esse pequeno aumento na concentração de T, já que esta é o substrato primário para formação de estradiol no homem. Apesar das mudanças significativas nos níveis séricos de DHT, os níveis de LH e FSH aumentam fracamente (aproximadamente 10%), mas permanecem dentro dos limites normais com o tratamento, e a resposta dos dois últimos hormônios ao GnRH não é alterada. Esses achados indicam que finasterida não afeta a regulação do eixo hipotálamo-hipófise-testículo. A administração crônica não tem efeito nos níveis circulantes de cortisol, prolactina,

hormônio estimulante da tireóide ou tiroxina, também não houve efeitos no perfil de lipídios ou de tolerância a glicose (54).

Em pacientes com HPB tratados com finasterida (1-100 mg/dia) por 7 a 10 dias prévios à prostatectomia, o tecido prostático removido na cirurgia continha aproximadamente 80% menos DHT e 10 vezes mais T, quando comparados grupos tratado e placebo. Finasterida reduz o tamanho da próstata pela supressão dos níveis intra-prostáticos de DHT, reduzindo o efeito estimulatório da DHT na função epitelial celular e diminuindo o efeito protetor da mesma contra a apoptose, resultando numa progressiva diminuição na função e no tamanho da célula epitelial e aumentando a taxa de morte das células do epitélio. A maior redução no volume da próstata produzida por finasterida ocorre na região periuretral da glândula (54).

Em um estudo para verificar a eficácia e a segurança de finasterida, homens com HPB que receberam o medicamento (5mg/dia), tiveram 19% de diminuição no volume da próstata, comparado com 3% de diminuição no grupo placebo. Os usuários de finasterida também apresentaram melhora no fluxo urinário e redução dos riscos de desenvolvimento de retenção urinária, quando comparados aos placebos. A frequência dos efeitos adversos foi marcadamente similar nos dois grupos, exceto para uma alta incidência de diminuição da libido, impotência e redução do volume de ejaculação no grupo tratado com a droga. A incidência desses efeitos diminuiu com o tempo, e em muitos casos, os efeitos adversos sexuais foram resolvidos enquanto os pacientes ainda recebiam finasterida (54).

Finasterida (1mg/dia) pode diminuir a perda de cabelos induzida por andrógenos, por vários mecanismos. Por reversão do encurtamento da fase anágena (fase de crescimento capilar), provocado pela DHT, essa fase se restabelece em níveis normais, resultando no crescimento do cabelo. Essa normalização da duração da fase anágena também diminui o turnover desta fase para a telógena (fase de queda do cabelo), reduzindo a taxa de perda do cabelo. Com tratamento contínuo, ocorre a supressão dos níveis de DHT, revertendo a miniaturização do cabelo provocada por tal

hormônio (54). Em um estudo clínico feito em homens calvos que receberam finasterida (1mg/dia), durante 2 anos, houve resposta à droga em 50% dos pacientes tratados. Após o primeiro ano, a média de crescimento foi de 50% e aumentou para 60%, após o final do segundo ano. Os efeitos colaterais do grupo que recebeu finasterida não foram diferentes daqueles do grupo controle (48).

Vários inibidores seletivos para a 5α -R1 foram desenvolvidos. Estudos com MK-386, um inibidor seletivo para esta isoenzima oralmente ativo, demonstraram menor supressão da DHT sérica quando comparado com finasterida (22% versus 66%). Como a 5α -R1 é predominante nas glândulas sebáceas, ocorre maior supressão da DHT neste local (49%) quando comparado com um inibidor da 5α -R2 (15%). Essa significativa diminuição sugere o envolvimento da 5α -R1 em condições onde ocorre excessivas secreções de sebo, como a acne. Mas não há dados publicados envolvendo esse tipo de inibidor em pacientes com acne (54).

Em mulheres, a DHT está relacionada ao hirsutismo, que é caracterizado por um crescimento de pêlos em excesso, cuja distribuição padrão é semelhante a dos homens. Em estudos que avaliaram os efeitos de finasterida em mulheres com esse mal, houve uma melhora que foi comparada aos efeitos produzidos por anti-estrogênicos, agentes estrogênicos e estradiol. A maioria dos estudos, não registrou efeitos adversos com o tratamento com finasterida (54). Contudo, cabe ser enfatizado que durante o tratamento de mulheres hirsutas férteis com inibidores da 5α -R2, deve haver o uso de contracepção, já que é esperado que estas drogas causem ambigüidade da genitália externa masculina de fetos, no primeiro trimestre de gestação (48).

O uso crônico de finasterida foi testado em um estudo feito pelo National Cancer Institute dos EUA, onde um total de 18 882 homens com idade superior a 55 anos, com toque digital retal normal e níveis de PSA normais, foram tratados com finasterida (5mg/dia) ou placebo, em 7 anos de seguimento. O percentual de 18,4% dos

homens que foram tratados com a droga e que tinham dados para a análise final desenvolveram CaP, contra 24,4% dos pacientes que receberam placebo. Contudo, o grupo tratado com finasterida apresentou maior incidência de efeitos colaterais sexuais e os tumores desenvolvidos foram muito mais agressivos (Escala de Gleason-7,8,9,10), do que aqueles registrados para o grupo placebo, que teve como efeitos adversos mais comuns sintomas no trato urinário (8). A avaliação do risco-benefício deste estudo deve ser levada em consideração, quando for levantada a hipótese de tratamento preventivo contra o CaP. A incidência desta doença diminuiu pouco com o uso de finasterida em relação ao placebo, mas os efeitos secundários resultantes são bem mais relevantes e afetam de maneira acentuada não só a saúde física, como também pode levar a sérias conseqüências psicológicas ao usuário.

2.2.5.3. Dutasterida

O primeiro inibidor de ambas isoformas da 5α -redutase, conhecido como dutasterida, é uma alternativa terapêutica, para homens que sofrem de LUTS devido a HPB, ou que tenham próstatas aumentadas (maior do que 30mL). Esse azaesteróide é capaz de reduzir a DHT sérica em mais de 90% (55).

A incidência de efeitos colaterais com dutasterida foi principalmente relacionada aos eventos adversos sexuais como impotência, diminuição da libido, distúrbios na ejaculação e ginecomastia, quando comparado ao grupo placebo, em 24 meses de estudo. Esses efeitos foram transientes e similares aos desencadeados por finasterida, demonstrando que a redução pronunciada de DHT não leva a um aumento na severidade de efeitos adversos (55).

2.3. Detecção de CaP

Como na maioria dos casos, a HPB e o CaP são assintomáticos, é recomendável a realização de exames periódicos (anuais após os 50 anos) para a detecção destas enfermidades em estágios nos quais elas sejam passíveis de cura. Essas avaliações incluem o exame de toque digital retal, as dosagens sanguíneas do PSA e, quando necessário, o estudo de ultra-som transretal (24).

O toque digital da próstata é feito através do ânus e permite a avaliação das dimensões da glândula, bem como da sua consistência. É uma maneira simples de definir se há crescimento benigno ou indícios de câncer. Cabe ressaltar que o preconceito cultural é o motivo pelo qual a maioria dos homens resiste a esse tipo de exame, mas todos os que já se submeteram ao toque, aceitam repeti-lo sem restrições (24).

O PSA é uma proteína produzida exclusivamente pela próstata, que se eleva de maneira significativa nos casos de CaP, HPB ou infecção da glândula. Cada grama de tecido canceroso produz 3 ng de PSA e cada grama de tecido com HPB produz 0,3 ng. Por isso, elevações no PSA não indicam necessariamente a presença de HPB ou de CaP. A maioria dos homens saudáveis apresenta valores de PSA sanguíneos inferiores a 4 ng/ml e sempre se considerou que nesta faixa, os riscos de câncer são reduzidos. Contudo, pesquisas recentes demonstraram que alguns homens com PSA entre 2,5 e 4 ng/ml já apresentam CaP, o que coloca em dúvida a confiabilidade do método (24).

Tanto o toque digital retal como o PSA devem ser realizados conjuntamente, uma vez que o primeiro isolado falha em 30 a 40% dos casos de câncer, enquanto que o segundo falha em 20% (24).

O exame de ultra-som, freqüentemente solicitado para pacientes com crescimento benigno da próstata, quando realizado por via abdominal, investiga a

integridade do aparelho urinário, principalmente dos rins, da bexiga e no máximo, avalia as dimensões da próstata. Mesmo assim, o cálculo do volume da glândula tem certa imprecisão, já que tende a superestimar o tamanho da próstata, produzindo erros de até 80% para mais ou de até 30% para menos. Nos casos de câncer, o exame de ultra-som é feito através do ânus, e permite visualizar as áreas hipoeóicas dentro da próstata, típicas das lesões cancerosas. Porém, esse exame falha em 30 a 50% dos pacientes, deixando de evidenciar tumores que estão presentes ou revelando áreas hipoeóicas não malignas. Por isso, o ultra-som é utilizado principalmente para orientar a realização de biópsias da próstata (24).

Para pacientes com alterações no toque digital retal, níveis do PSA elevados ou anormalidades no ultrassom transretal, é aconselhável a realização de biópsia. Tal procedimento é realizado com o apoio do ultra-som transretal e permite verificar a existência de câncer local e também sobre a gravidade da doença. Geralmente, são removidos de 6 a 18 fragmentos da próstata com a ajuda de uma agulha fina. Se a glândula estiver muito volumosa e o nódulo canceroso muito pequeno, a biópsia pode falhar, deixando de mostrar um câncer que está presente na próstata. Esse fenômeno é observado em cerca de 20% dos pacientes submetidos à biópsia da próstata (56).

Assim sendo, estabelecemos como prioridade o desenvolvimento de uma metodologia onde pudéssemos monitorar a atividade da 5 α -R2 em amostras muito pequenas de tecido prostático (18-20). Para isso solicitamos, através de um "Termo de Consentimento Informado" (anexo 2), aos pacientes do Serviço de Urologia do HCPA que foram encaminhados para o exame de biópsia por terem apresentado durante o exame clínico alterações nos níveis séricos de PSA ou no exame de toque digital retal, a permissão para a coleta de mais um fragmento de cada lado da próstata. Determinados a atividade da 5 α -R2 em cada fragmento e, posteriormente, comparamos a mesma com os resultados da análise histopatológica (padrão ouro) dos doze fragmentos e com os níveis de PSA destes indivíduos. Realizamos esta análise

entre pacientes que revelaram alguma patologia na próstata e os que apresentaram resultados negativos para CaP.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a dosagem da atividade da enzima esteróide 5 α -redutase tipo 2 como possível marcador tumoral de próstata.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a possibilidade de adaptar a técnica descrita por Furuta et al. em tecidos com restrita quantidade de proteínas.
- Avaliar a atividade da enzima esteróide 5 α -redutase tipo 2 em biópsias de pacientes atendidos no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- Avaliar a relação entre a atividade da enzima e o antígeno-específico-prostático.

4. REFERÊNCIAS

1. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Disponível em <http://inca.gov.br/> [acesso em novembro de 2005].
2. Thomas LN, Douglas RC, Vessey JP, Gupta R, Fontaine D, Norman RW, Thompson IM, Troyer DA, Rittmaster RS, Lazier CB. 5 α -reductase type 1 immunostaining is enhanced in some prostate cancers compared with benign prostatic hyperplasia epithelium. *The Journal of Urology*. 2003;170:2019-2025.
3. McConnel JD, Roehrborn CG, Bautista OM, Andriole GLJr, Dixon CM, Kusek JW, Lepor H, McVary KT, Nyberg LMJr, Clarke HS, Crawford ED, Diokno A, Foley JP, Foster HE, Jacobs SC, Kaplan SA, Kreder KJ, Lieber MM, Lucia MS, Miller GJ, Menon M, Milam DF, Ramsdell JW, Schenkman NS, Slawin KM, Smith JA. The long-term effect of Doxazosin, Finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. *The New England Journal of Medicine*. 2003;349(25):2387-2398
4. Thomas LN, Lazier CB, Gupta R, Norman RW, Troyer DA, O'Brien SP, Rittmaster RS. Differential alterations in 5 α -reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. *The prostate*. 2005;63:231-239.
5. Lamb JC, Levy MA, Johnson RK, Isaacs JT. Response of rat and human prostatic cancers to the novel 5 alpha-reductase inhibitor, SK&F 105657. *Prostate* 1992;21(1):15-34.

6. Zaccheo T, Giuditi D, di Salle E. Effect of early treatment of prostate cancer with the 5 alpha-reductase inhibitor turosteride in Dunning R3327 prostatic carcinoma in rats. *Prostate*. 1998;35(4):237-242.
7. Zaccheo T, Giudici D, Panzeri A, di Salle E. Combined treatment of Dunning R3327 rat prostatic tumor with the 5 alpha-reductase inhibitor PNU 157706 and the antiandrogen bicalutamide. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000;45(1):31-37.
8. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Scott Lucia M, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes D, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman C. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2003;349(3):215-224.
9. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman C. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level 4.0 ng per milliliter. *The New England Journal of Medicine*. 2004;350(22):2239-2246.
10. Span PN, Vollmer MC, Smals AG, Sweep FG, Schalken JA, Feneley MR, Kirby RS. Selectivity of finasteride as an in vivo inhibitor of 5 alpha-reductase isozyme enzymatic activity in the human prostate. *J Urol*. 1999;161(1):332-337.
11. McConnell JD, Wilson JD, George FW, Geller J, Pappas F, Stoner E. Finasteride, an inhibitor of 5 alpha-reductase, suppresses prostatic dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74(3):505-508.

12. Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Steiner H, Hobisch A, Androgen receptors in prostate cancer. *J Urol.* 2003;170(4 Pt 1):1363-1369.
13. Occhiato E, Guarna A, Danza G, Serio M. Selective non-steroidal inhibitors of 5 α -reductase type 1. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2004;88:1-16.
14. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* 1988;12:619-633.
15. Söderström TG, Bjelfman C, Brekkan E, Ask B, Egevad L, Norlén BJ, Rane A. Messenger ribonucleic acid levels of steroid 5 α -reductase 2 in human prostate predict the enzyme activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2001;86(2):855-858.
16. Iehlé C, Radvanyi F, Medina SGD, Ouafik L, Gérard H, Chopin D, Raynaud JP, Martin PM. Differences in steroid 5 α -reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1999; 68:189-195.
17. Titus MA, Gregory CW, Ford III OH, Schell MJ, Maygarden SJ, Mohler JL. Steroid 5 α -reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(12):4365-4371.
18. Furuta S, Fukuda Y, Sugimoto T, Miyahara H, Kamada E, Sano H, Fukuda Y, Takei M, Kurimoto T. Pharmacodynamic analysis of steroid 5 α -reductase

inhibitory actions of Z-350 in rat prostate. *European Journal of Pharmacology* 2001; 426:105-111.

19. Hirosumi J, Nakayama O, Fagan T, Sawada K, Chida N, Inami M, Takahashi S, Kojo H, Notsu Y, Okuhara M. FK143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 α -reductase: (1) In vitro effects on human and animal prostatic enzymes. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1995; 4:357-363.
20. Pratis K, O'Donnell L, Ooi GT, McLachlan RI, Robertson DM. Enzyme assay for 5 α -reductase type 2 activity in the presence of 5 α -reductase type 1 activity in rat testis. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* 2000; 75:75-82.
21. Presti JC, Neoplasms of prostate gland. In: Tanagho EM, McAninch JW, editor. *Smith's General Urology*. 15ed: Lange Medical Books; 2000. p.399-421.
22. Partin AW, Rodrigues R. The molecular biology, endocrinology and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's Urology*. 8 ed: WB Saunders Company; 2002. Sec.6, Chap.37.
23. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. *Cancer Statistics, 2005*. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10-30.
24. Srourgi, M. *Próstata: isso é com você*. São Paulo: Publifolha, 2003.p18-55.
25. WHO (World Health Organization) and IARD (International Association for Research on Câncer). *GLOBOCAN 2002*. Disponível em <http://www.dep.iarc.fr/> [acesso em novembro de 2005].

26. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int.* 2002;90(2):174-84.
27. Hoffman RM, Stone SN, Espey D, Potosky AL. Differences between men with screening-detected versus clinically diagnosed prostate cancer in the USA. *Cancer.* 2005;5(1):27-32.
28. Reiter RE, de Kernion JB. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's Urology.* 8ed:WB Saunders Company; 2002. p.Sec.10,Chap.85.
29. Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery – what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999;162(2):293-306.
30. Lazier CB, Thomas LN, Douglas RC, Vessey JP, Rittmaster RS. Dutasteride, the dual 5 α -reductase inhibitor, inhibits androgen action and promotes cell death in the LNCaP prostate cancer cell line. *The Prostate.* 2004;58:130-144.
31. Andriole G, Bruchofsky N, Chung LWK, Matsumoto AM, Rittmaster R, Roehrborn C, Russel D, Tindall D. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5 α -reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology.* 2004;172:1399-1403.
32. Kaplan SA. 5 α -Reductase Inhibitors: what role should they play? *Urology.* 2001; 58(6A):65-70.

33. Bonkhoff H, Stein U, Aumüller G, Remberger K. Differential expression of 5 α -reductase isoenzymes in the human prostate and prostatic carcinomas. *The Prostate* 1996; 29:261-267.
34. Chen Z, Chen H, Stamey T. Prostate specific antigen in benign prostatic hyperplasia: purification and characterization. *The Journal of Urology*. 1997; 157:2166-2170.
35. McConnell JD, Stoner E. 5 α -Reductase Inhibitors. *Advances In Protein Chemistry*.2001; 56:143-180.
36. Weisser H, Ziemssen T, Krieg M. In vitro modulation of steroid 5 α -reductase activity by phospholipases in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia. *Steroids*. 2001; 66:521-528.
37. Gormley GL, Stoner E, Bruskewitz RC, Imperato-McGinley J, Walsh PC, McConnell JD, Andriole GL, Geller J, Bracken BR, Tenover JS, Vaughan ED, Pappas F, Taylor A, Binkowitz B, Ng J. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology*. 2002; 167:1102-1107.
38. Bratoeff E, Cabeza M, Ramirez E, Heuze Y, Flores E. Recent advances in the chemistry and pharmacological activity of new steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors. *Current Medical Chemistry*. 2005;12:927-943.
40. Metcalf BW, Levy MA, Holt D, *Trends Pharm Science*. 1989;10:491-499.

41. Jin Y, Penning M. Steroid 5 α -reductases and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001; 15(1):79-94.
42. Steers W. 5 α -Reductase Activity In The Prostate. *Urology*. 2001; 58(6A):17-24.
43. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 1994; 63:25-61.
44. Occhiato E, Guarna A, Danza G, Serio M. Selective non-steroidal inhibitors of 5 α -reductase type 1. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2004;88:1-16.
45. Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Endocrine Reviews*. 1983;14(5):577-593.
46. Cascieri MA, Cheung AH, Reynolds GF, Rasmuson GH> Species differences in prostatic steroid 5 α -reductases of rat, dog, and human. *Endocrinology*. 1985; 117(2): 571-579.
47. Liang T, Cascieri MA, Cheung AH, Reynolds GF, Rasmuson GH> Species differences in prostatic steroid 5 α -reductases of rat, dog, and human. *Endocrinology*. 1985; 117(2): 571-579.
48. Cilotti A, Danza G, Serio M. Clinical application of 5 α -reductase inhibitors. *J. Endocrinol. Invest*. 2001; 24:199-203.

49. Wilson JD. The role of 5 α -reduction in steroid hormone physiology. *Reprod. Fertil. Dev.* 2001;13:673-678.
50. Novelli G, Margiotti K, Sangiulo F, Reichardt JKV. Pharmacogenetics of human androgens and prostatic diseases. 2001; 2(1):65-72.
51. Steers W. 5 α -Reductase Activity In The Prostate. *Urology.* 2001; 58(6A):17-24.
52. Costa EMF, Arnhold IJP, Inacio M, Mendonça BB. Normal bone density in male pseudohermaphroditism due to 5 α -reductase 2 deficiency. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo.* 2001; 56(5):139-142.
53. Bjelfman C, Söderström TG, Brekkan E, Norlén BJ, Egevad L, Unge T, Andersson S, Rane A. Differential gene expression of steroid 5 α -reductase 2 in core needle biopsies from malignant and benign prostatic tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1997;82(7):2210-2214.
54. McConnell JD, Stoner E. 5 α -Reductase Inhibitors. *Advances In Protein Chemistry.* 2001; 56:143-180.
55. Roehrborn CG, Boyle P, Nickel JC, Hoefner K, Andriole G. Efficacy and safety of a dual inhibitor of 5-alpha-reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 2002;60:434-441.
56. Fuganti PE, Tobias-Machado M, Pinto MA, Simardi LH, Wroclawski ER. Twelve core prostate biopsy versus six systematic sextant biopsies. *Brazilian Journal of Urology.* 2002;28:207-213.

5. ARTIGO EM LINGUA INGLESA

Steroid 5- α reductase type 2 activity in biopsies from malignant and normal prostatic tissues

Osmar Luiz Magalhães Oliveira ^{a,b,*}, Francine Muraro ^c, Emanuel Burck Santos ^a,
Daniel Freitas Gomes Soares^a, Vera Maria Treis Trindade ^c, Walter José Koff ^{a,b}

^a Urology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350,
Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil

^b Program of Postgraduation in Medicine: Medical Sciences. Federal University of Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Department of Biochemistry, ICBS, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto
Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Osmar Luiz Magalhães Oliveira

Urology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, 8^o andar

90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel: +55-51-21018331

Fax: +55-51-21018001

E-mail: ooliveira@hcpa.ufrgs.br

Clinical Chemica Acta No: CCA-D-05-00520

ABSTRACT

Background: The conversion of testosterone (T) to the more potent metabolite dihydrotestosterone (DHT) by prostate-specific steroid 5 α -reductase isoenzymes is a key mechanism in the action of androgens in the prostate and is important in the promotion and progression of prostate diseases. In this study we described an adaptation of a sensitive method for evaluation of the 5 α -reductase type 2 (5 α -R2) activity using a small quantity of protein.

Methods: We used 29 human prostate transrectal ultrasound-guided core biopsies obtained from patients (median age 70, range 55-86 yr) undergoing this procedure for diagnostic purposes. Testosterone 4-¹⁴C and NADPH were incubated with biopsy homogenate. Reaction products were extracted, separated by thin layer chromatography and revealed by autoradiography. Areas correspondent to T and DHT were scraped into vials and their radioactivity determined.

Results: The assay was validated in terms of linearity with protein concentration and incubation time. The 5 α -R2 activity expressed as NL (natural logarithm) showed a significant difference between normal and neoplastic prostate tissue, which was independent from the PSA levels.

Conclusions: Determination of 5 α -R2 activity, using the conditions reported herein, could be utilized as a molecular parameter of prostate neoplastic processes.

Key words: steroid 5 α -reductase, biopsies, prostate cancer, PSA

1. Introduction

The NADPH-dependent steroid 5 α -reductase (EC 1.33.99.5) is an enzyme that catalyzes the irreversible stereospecific reduction of C¹⁹ 3-keto- Δ^{4-5} steroid to 5 α -reduced metabolites. Two different 5 α -reductase isoenzymes have been characterized in humans, monkeys, rats, and mice: steroid 5 α -reductase isoenzymes 1 (5 α -R1) and (5 α -R2) [1]. In humans they are composed of 260 and 256 amino acids, respectively, with 47% sequence identity and distinct biochemical properties [2], for example, 5 α -R1 has a broad basic pH optimum and low affinity for T, while 5 α -R2 has an acidic pH optimum and high affinity for T [3]. The apparent dissociation constant for NADPH cofactor is similar for both enzymes. DHT is necessary for normal growth and function [4], development of benign prostatic hyperplasia (BPH) [5] and probably also for initiation and maintenance of prostate cancer (PCa) [6].

The prostate is not a histologically homogeneous organ but is partitioned into three different zones [7]. The peripheral zone is considered to be the site of origin of cancers, whereas the transitional zone is the primary site of hyperplastic growth in BPH. The 5 α -R2 isoenzyme is preferentially expressed in the stroma of the prostate [8] and predominant in normal prostate tissue [9]. Interindividual differences in prostatic 5 α -R2 expression and activity may be a determinant of the risk of developing and eventually dying from clinical prostate cancer. Data on serum levels of DHT metabolites support the hypothesis that variation in 5 α -R2 activity may, in part, explain the differences in the incidence of prostate cancer within the population [10]. Although the role of 5 α -R in the evolution and progression of PCa is the subject of much interest, the distribution and expression of the two isoenzymes during the development and progression of PCa has yet to be elucidated [9]. Assessment of 5 α -R2 mRNA expression in core needle biopsies of the prostate [11] may prove useful in the evaluation of the impact of different endocrine intervention therapies on prostate 5 α -R2 expression. It is essential to clarify the relative changes that occur in 5 α -R2 activity during the growth of PCa, in order to improve the development of prevention and

treatment options. The possibility of using 5 α -R2 activity or mRNA expression as a prognostic marker in prostate cancer also needs further evaluation.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

The patients were prospectively recruited during the period from January 2003 to April 2005, at the outpatient clinic of the Urological Service of Porto Alegre Clinical Hospital (HCPA) from among those that were referred for biopsy because they presented altered PSA level values (>4.0) during the clinical evaluation or, as a result of the digital rectal examination. Those that agreed to participate in the study were given an informed consent term, approved by the Post-Graduate and Research Group Ethics Committee, number 473-02 of HCPA. The biopsies were performed using an 18G needle and guided with the aid of ultrasound imaging. Six (6) samples were obtained from regions of the right peripheral zone and 6 from the left peripheral zone for histopathological examination and [17], from those who agreed to participate, a further two fragments were removed, one each from the left and right sides of the prostate gland (biopsy weight 2-4 mg). Immediately following collection, the material was placed in Eppendorf tubes, submerged in nitrogen and stored in a freezer until use. Of a total of 38 patients, median age 70, range 55-86 yr, two did not agree to participate in this protocol. We excluded prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) (n=4) and prostatitis (n=3) from the statistical analysis. Of the 58 included biopsies: 22 were considered to be non-cancer and 7 showed cancer on the left side and 21 were considered to be non-cancer and 8 showed cancer on the right side.

2.2. Tissue preparation

Each biopsy was homogenized with Polytron homogenizer PT 1200 CL in 2.0 mL of ice-cold solution containing 0.25 M sucrose and 1.0 mM dithiothreitol adapted from Furuta et al., 2001. This homogenate was used as an enzyme source. Validation tests in terms of linearity with protein quantities and incubation were performed using homogenates of biopsy pools [12,13].

2.3. Steroid 5- α reductase 2 activity

The assay of steroid 5- α reductase 2 activity was performed in a final volume of 500 μ l containing 50-100 mM Tris-citrate buffer (pH 5.0), 0.5 mM NADPH (Sigma), 1.4 μ M testosterone 4- 14 C (2.1 GBq /mmol, Amersham Biosciences) [14]. The reaction was started by addition of the enzyme source (the protein quantity was defined in Figure 2). The reaction mixture was incubated in a shaking water bath, at 37°C, for 60 min. Incubation in 0°C was used as control. The assay was stopped by the addition of 2 ml of ice-cold ethyl acetate to reaction and control tubes, and the mixtures were shaken for 5 min and then centrifuged (1,000 x g, 5 min). The organic phases were separated and evaporated under nitrogen stream till dry, and the residues were dissolved in 40 μ l ethyl acetate and applied on thin layer chromatography plates (Kieselgel 60 F254, Merck). The chromatographic tank was saturated for 24 h with the eluting solvent system (ethyl acetate: benzene - 67% : 33%). Chromatographs were developed for 20 min, and the plates were air dried. Non-radioactive 5 α -dihydrotestosterone standard was visualized under ultraviolet light (254 nm). Radioactive spots were detected by autoradiography (KODAK MIN-R 2000 film for 72 h, revealed by KODAK X-OMAT 3000 RA processor), and areas associated with testosterone and its metabolite, 5 α -dihydrotestosterone were scraped into vials with scintillation liquid (4g/l POP; 50 mg/l POPOP; toluene). The radioactivity was counted with a scintillation counter Wallac 1409 – Liquid Scintillation Counter. The 5 α -R2 activity was expressed as picomoles of dihydrotestosterone formed by 1 mg of protein during 1 minute (pmol DHT/mg protein/min) [12,13,15].

2.4. Protein determination

Protein quantities were determined by the method of Lowry (1951) using bovine serum albumin as the standard [16].

2.5. Prostate Specific Prostate Assay

Blood samples were obtained by venepuncture before any manipulation of the prostate and the serum was stored for no longer than 1 week at -20°C , before assay. Total PSA concentration was determined by a quimioluminescent method using a Immulite 2000 (Anexo 3).

2.5. Statistical analysis

Data were reported as mean \pm standard deviation. The Student t test for independent samples was used for comparisons between the two groups. Means were also compared by a multiple linear regression model. All data were log transformed prior to analysis. Statistical analysis was carried out using SPSS version 12, with significance level set at $p<0.05$.

3. Results

3.1. Conditions for 5 α -R2 activity evaluation

Initially, due to the limited amount of protein from each fragment, the protein quantity linearity and incubation validation tests were carried out using biopsy pool homogenates, which were analyzed by means of an autoradiography of the thin layer chromatography of radioactive lipid extracts from the enzymatic system (Fig 1). There is a noticeable linear increase in 5 α -R2 product formation with the increase in the protein quantity. With time, the formation of DHT also presented a linear increase (Fig 3). Figure 4 shows the importance of the use of NADPH cofactor in obtaining the reaction.

3.2 Comparison between 5 α -R2 activity from human prostate biopsies of normal and neoplastic tissues

TRUS-guided prostatic biopsies were analyzed for 5 α -R2 activity (as described in Materials and Methods). The biopsies were divided into two groups for comparison of 5 α -R2 activity levels (cancer and non-cancer) depending on the histopathological evaluation of each sample analyzed. There were 58 biopsies, 7 cancerous biopsies and 22 non-cancerous biopsies from histopathological analysis on left side, and 8 cancerous biopsies and 21 non-cancerous biopsies (Table 1). In addition there were 4 biopsies showing PIN and 3 biopsies showing prostatitis. Significant differences in 5 α -R2 activity levels between the cancerous and non-cancerous groups were observed, as seen in table 1 Figure 5. In the 7 biopsies from left side group judged to be cancer, the median 5 α -R2 activity levels were 1.79 ± 1.15 (LN pmol DHT/mg.protein/min) compared with 0.64 ± 1.17 (LN pmol DHT/mg.protein/min) in the 22 biopsies showing no cancer ($P=0.032$). In the 8 biopsies from right side group judged to be cancer, the median 5 α -R2 activity levels were 1.62 ± 1.13 (LN pmol DHT/mg.protein/min) compared with 0.79 ± 1.14 (LN pmol DHT/mg.protein/min) in the 21 showing no cancer ($P=0.061$).

In addition, it was noted that the relation of cancer and 5 α -R2 activity was independent of serum PSA levels in the left side biopsies ($P=0.016$), and in the right side biopsies PSA levels ($P=0.028$) (Table 1).

4. Discussion

Prostate cancer represents an ideal candidate for chemoprevention because of its high incidence and long latency to clinically significant disease [18]. The precancerous lesion PIN may also be a suitable target for ablation in chemoprevention strategies [19]. While androgen ablation therapy is known to be effective in the reduction of PIN and treatment of PCa [20], there are significant side effects, including impotence, fatigue, decrease in bone and muscle mass, gynecomastia, and hot flashes [21]. Nakamura et al., suggest that androgen-producing enzymes are co-expressed in human prostate cancer, and involved in the local production of DHT [22]. The role of DHT in the initiation and maintenance of the abnormal growth of prostate epithelium and the central role of 5 α -R enzymes provide a strong biological rationale for the examination of a dual 5 α -R inhibitor [23]. It has been reported that 5 α -R2 was expressed in prostate cancer, and was very important in the process of in situ production of DHT [24]. In addition, it has been hypothesized that 5 α -R2 may play a role in the pathogenesis and/or development of prostate cancer [24].

Nakamura et al. demonstrated that 5 α -R1 was frequently expressed in human prostate cancer, and a significant positive correlation between 5 α -R1 and 5 α -R2 immunoreactivity. It has been suggested that individuals with high levels of 5 α -R have an increased risk of developing prostate cancer [22]. Furthermore, previous reports have demonstrated that 5 α -R1 mRNA and activity were much greater in prostate cancer than in HPB [25]. The inhibition of 5 α -R, which may be considered as androgen attenuation therapy, has minimal side effects [26]. Dutasteride treatment, which inhibits both 5 α -R1 and 5 α -R2, has recently been reported to result in almost complete suppression of intraprostatic DHT, and increased regression of prostate cancer [27]. The most extensively studied 5 α -R inhibitor is finasteride. Presti et al. reported that finasteride treatment in patients diagnosed with metastatic prostate cancer resulted in only minor effects on this cancer, and decreased serum PSA levels by only 7% in men with advanced adenocarcinoma of the prostate [29]. In humans, finasteride was

ineffective in chemoprevention of PCa in high-risk men diagnosed with PIN [30]. However, the PCPT trial, showed that finasteride treatment caused a 25% reduction in the rate of PCa detection over 7 years, providing evidence that 5 α -R2 may be involved in the initiation and/or maintenance of prostatic carcinoma [26]. Individual 5 α -R1 and 5 α -R2 activities have been shown in specimens of benign hyperplasia [31], prostate cancer [32] and recurrent prostate cancer [33]. Results from these studies suggest that 5 α -R1, as well as 5 α -R2, are associated with the growth of prostate cancer.

In this paper we assessed 5 α -R2 activity in small tissue samples. This biochemical parameter has been validated in relation to the histopathology of the prostate. The present methodology is based on 5 α -R2 activity in small core biopsies of 2.0-4.0 mg each compared to 50mg of tissue suggested by Bjelfman et al.[1]. These results confirm the similarity to other studies on human 5 α -reductase enzymes [1,32]. The determination of 5 α -R activity using 100 μ g (or less) of prostate protein is a rare opportunity to study the development of PCa and HPB. Besides 5 α -R2 mRNA determination by RT-PCR, the assessment of 5 α -R2 activity in core needle prostate biopsies may be useful in evaluating the impact on prostate 5 α -R2 of different endocrine intervention therapies, as well as, other therapies used for treatment of prostate cancer. It is essential to clarify the relative changes that occur in 5 α -R2 activity during the growth of PCa, in order to improve the development of prevention and treatment options.

In conclusion, we reported a technical adaptation for the measurement of 5 α -R2 activity which can be of use as a diagnostic and/or prognostic marker in prostate pathologies.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of FIFE and Fundação Médica do Rio Grande do Sul.

References

- [1] Bjelfman C, Söderström TG, Brekkan E, Norlén BJ, Egevad L, Unge T, Andersson S, Rane A. Differential gene expression of steroid 5 α -reductase 2 in core needle biopsies from malignant and benign prostatic tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997;82(7):2210-14.
- [2] Titus MA, Gregory CW, Ford III OH, Schell MJ, Maygarden SJ, Mohler JL. Steroid 5 α -reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(12):4365-71.
- [3] Hiipakka RA, Zhang HZ, Dai W, Dai Qing, Liao S. Structure-activity relationships for inhibitions of human 5 α -reductases by polyphenols. *Biochem Pharmacol* 2002;63(6):1165-76.
- [4] Imperato-McGinley J, Gautier T, Zirinsky K, Hom T, Palomo O, Stein E, Vaughan ED, Markisz JA, Ramires de Arellano E, Kazam E, Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metabol* 1992;75(4):1022-26.
- [5] Isaacs JT, Brendler CB, Walsh PC. Changes in the metabolism of dihydrotestosterone in the hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56(1):139-46.
- [6] Petrow V. The dihydrotestosterone (DHT) hypothesis of prostate cancer and its therapeutic implications. *Prostate* 1986;9(4):343-61.
- [7] McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* 1988;12:619-33.

- [8] Söderström TG, Bjelfman C, Brekkan E, Ask B, Egevad L, Norlén BJ, Rane A. Messenger ribonucleic acid levels of steroid 5 α -reductase 2 in human prostate predict the enzyme activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001;86(2):855-58.
- [9] Thomas LN, Lazier CB, Gupta R, Norman RW, Troyer DA, O'Brien SP, Rittmaster RS. Differential alterations in 5 α -reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. *The prostate* 2005;63:231-39.
- [10] Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, et al. 5 α -reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 1992;339:887-89.
- [11] Bjelfman C, Söderström TG, Brekkan E, Norlén BJ, Egevad L, Unge T, Andersson S, Rane A. Differential gene expression of steroid 5 α -reductase 2 in core needle biopsies from malignant and benign prostatic tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997;82(7):2210-14.
- [12] Furuta S, Fukuda Y, Sugimoto T, Miyahara H, Kamada E, Sano H, Fukuda Y, Takei M, Kurimoto T. Pharmacodynamic analysis of steroid 5 α -reductase inhibitory actions of Z-350 in rat prostate. *European Journal of Pharmacology* 2001; 426:105-11.
- [13] Hirosumi J, Nakayama O, Fagan T, Sawada K, Chida N, Inami M, Takahashi S, Kojo H, Notsu Y, Okuhara M. FK143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid

- 5 α -reductase: (1) *In vitro* effects on human and animal prostatic enzymes. J. Steroid Biochem Molec Biol 1995; 4:357-63.
- [14] Normington K, Russell DW. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 α -reductase isozymes. The Journal of Biological Chemistry 1992;27(25):19548-54.
- [15] Pratis K, O'Donnell L, Ooi GT, McLachlan RI, Robertson DM. Enzyme assay for 5 α -reductase type 2 activity in the presence of 5 α -reductase type 1 activity in rat testis. Steroid Biochemistry & Molecular Biology 2000; 75:75-82.
- [16] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randell RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.
- [17] Fuganti PE, Tobias-Machado M, Pinto MA, Simardi LH, Wroclawski ER. Twelve core prostate biopsy versus six systematic sextant biopsies. Brazilian Journal of Urology 2002;28:207-13.
- [18] Kelloff GJ, Lieberman R, Steele VE, Boone CW, Lubet RA, Kopelovich L, Malone WA, Crowell JA, Higley HR, Sigman CC. Agents, biomarkers, and cohorts for chemopreventive agent development in prostate cancer. Urology 2001;57(4 Suppl 1):46-51.
- [19] Bostwick DG, Burke HB, Wheeler TM, Chung LW, Bookstein R, Pretlow TG, Nagle RB, Montironi R, Lieber MM, Veltri RW. The most promising surrogate endpoint biomarkers for screening candidate chemopreventive compounds for prostatic adenocarcinoma in short-term phase II clinical trials. J Cell Biochem Suppl 1994;19:283-9.

- [20] Civantos F, Soloway MS, Pinto JE. Histopathological effects of androgen deprivation in prostatic cancer. *Semin Urol Oncol* 1996;14(2 Suppl 2):22-31.
- [21] Hellerstedt BA, Pienta KJ. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. *Cancer J Clin* 2002;52(3):154-79.
- [22] Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto K, Mikami Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y, Sasano H. In situ androgen producing enzymes in human prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2005;12:101-7.
- [23] Andriole G, Bostwick D, Brawley O, Gomella L, Marberger M, Tindall D, Breed S, Somerville M, Rittmaster R. Chemoprevention of prostate cancer in men at high risk: rationale and design of the reduction by dutasteride of prostate cancer events (reduce) trial. *The Journal of Urology* 2004;172:1314-17.
- [24] Torres JM, Ruiz E, Ortega E. Development of a quantitative RT-PCR method to study 5 alpha-reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status. *Prostate* 2003;56:74-79.
- [25] Iehlé C, Radvanyi F, Medina SGD, Ouafik L, Gérard H, Chopin D, Raynaud JP, Martin PM. Differences in steroid 5 α -reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1999; 68:189-95.
- [26] Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Scott Lucia M, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes D, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A,

Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman C. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003;349(3):215-24.

- [27] Andriole GL, Humphrey P, Ray P, Gleave ME, Trachtenberg J, Thomas LN, Lazier CB, Rittmaster RS. Effect of the dual 5 alpha-reductase inhibitor dutasteride on markers of tumor regression in prostate cancer. *Journal of Urology* 2004;172:915-19.
- [28] Presti JC, Fair WR, Andriole G, Sogani PC, Seidmon EJ, Ferguson D, Ng J, Gormley GJ. Multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled study to investigate the effect of finasteride (MK-906) on stage D prostate cancer. *Journal of Urology* 1992;148:1201-04.
- [29] Brufsky A, Fontaine-Rothe P, Berlane K, Rieker P, Jiroutek M, Kaplan I, Kaufman D, Kantoff P. Finasteride and flutamide as potency-sparing androgen-ablative therapy for advanced adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 1997;49:913-20.
- [30] Cote RJ, Skinner EC, Salem CE, Mertes SJ, Stanczyk FZ, Henderson BE, Pike MC, Ross RK. The effect of finasteride on the prostate gland in men with elevated serum prostate-specific antigen levels. *Br J Cancer* 1998;78(3):413-18.
- [31] Shirakawa T, Okada H, Acharya B, et al. Messenger RNA levels and enzyme activities of 5 alpha-reductase types 1 and 2 in human benign prostatic hyperplasia (BPH) tissue. *Prostate* 2004;58:33-40

- [32] Söderström TG, Bjelfman C, Brekke E, Ask B, Egevad L, Norlén BJ, Rane A. Messenger ribonucleic acid levels of steroid 5 α -reductase 2 in human prostate predict the enzyme activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001;86(2):855-58.
- [33] Titus MA, Gregory CW, Ford III OH, Schell MJ, Maygarden SJ, Mohler JL. Steroid 5 α -reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11(12):4365-71.

Figure legends

Figure 1. Autoradiography of the thin layer chromatography analysis of radioactive lipid extracts from enzymatic system of 5α -R2. Three different quantities of biopsy protein (50, 100 and 200 μ g) were incubated for different lengths of times (0, 30, 60, 120 minutes). * Control reaction incubated without NADPH.

Figure 2. Effect of different protein quantities obtained from prostatic biopsy homogenate on dihydrotestosterone (DHT) formation, at pH 5, during incubation for 60 minutes.

Figure 3. Effect of length of incubation time on dihydrotestosterone (DHT) formation, at pH 5, using 100 μ g protein from prostatic biopsy homogenate.

Figure 4. Importance of NADPH in dihydrotestosterone (DHT) formation. The reaction was performed at pH 5, using 100 μ g protein from prostatic biopsy homogenate for 60 minutes.

Figure 5. Dot plots showing 5α -reductase-2 levels comparing normal and neoplastic tissues (PCa) obtained from prostatic biopsies (logs pmol DHT/mg.protein/min).

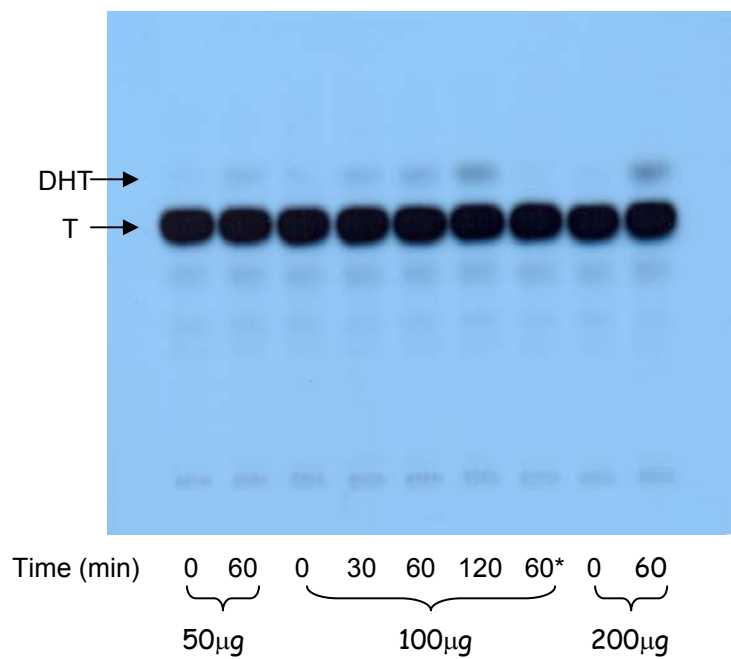


Figure 1. Autoradiography of the thin layer chromatography analysis of radioactive lipid extracts from enzymatic system of 5α -R2. Three different quantities of biopsy protein (50, 100 and 200 g) were incubated for different lengths of times (0, 30, 60, 120 minutes). * Control reaction incubated without NADPH.

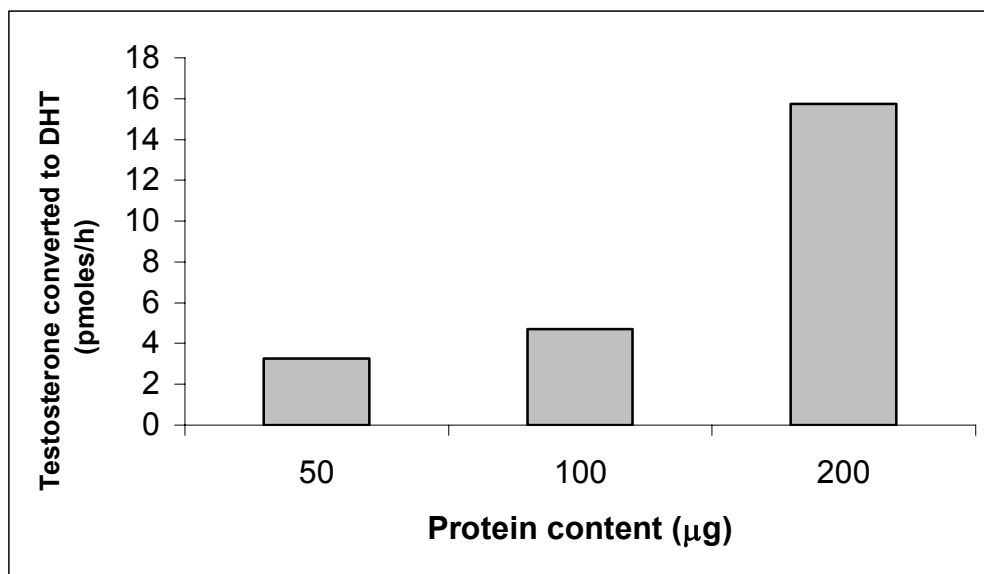


Figure 2. Effect of different protein quantities obtained from prostatic biopsy homogenate on dihydrotestosterone (DHT) formation, at pH 5, during incubation for 60 minutes.

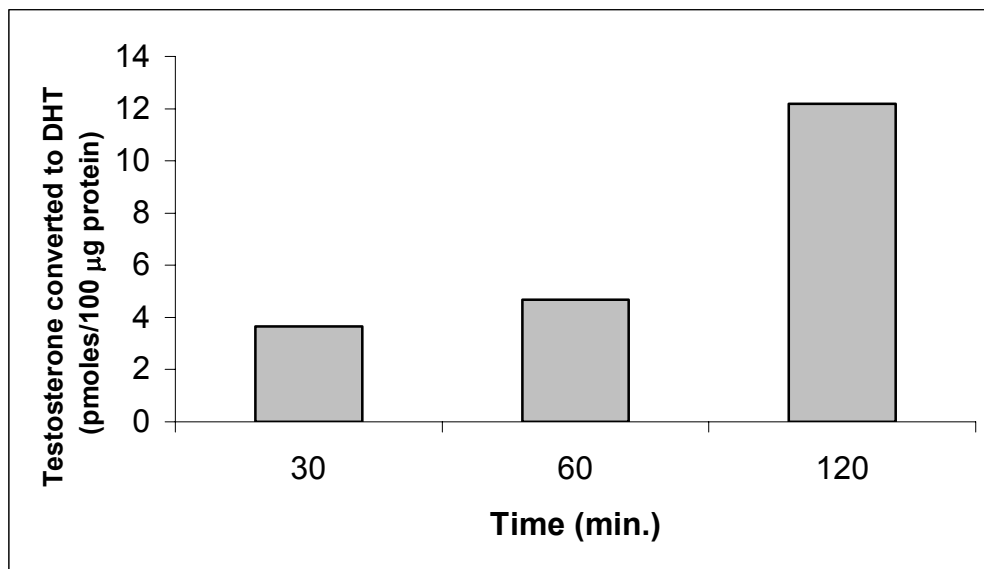


Figure 3. Effect of length of incubation time on dihydrotestosterone (DHT) formation, at pH 5, using 100 µg protein from prostatic biopsy homogenate.

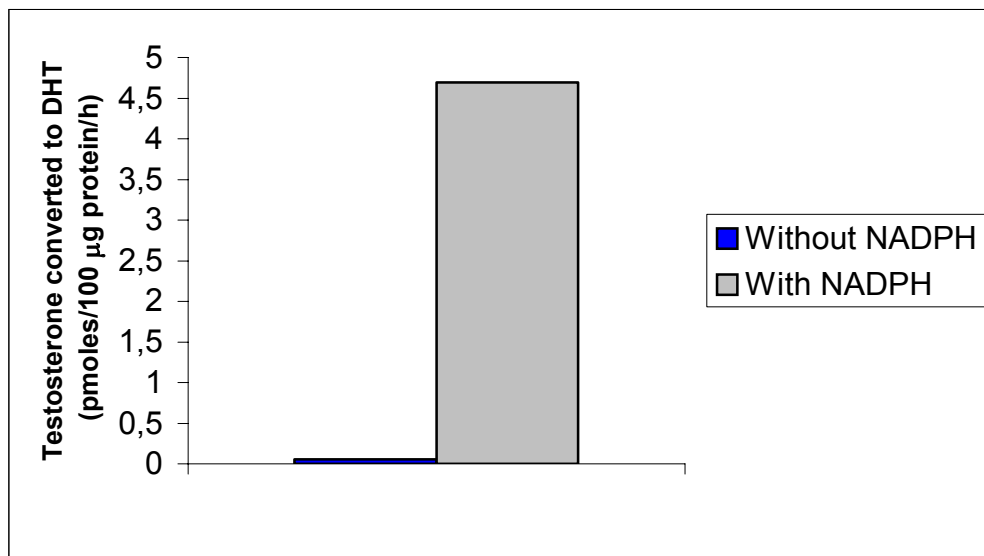


Figure 4. Importance of NADPH in dihydrotestosterone (DHT) formation. The reaction was performed at pH 5, using 100 µg protein from prostatic biopsy homogenate for 60 minutes.

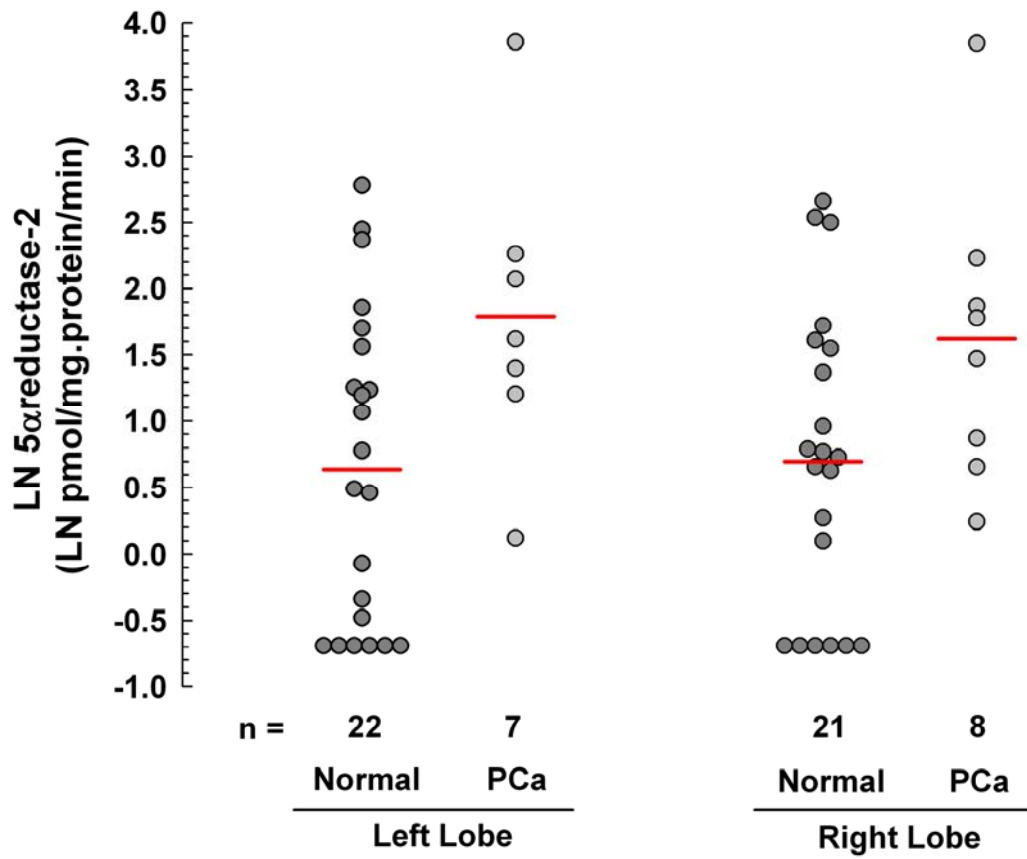


Figure 5. Dot plots showing 5 α -reductase-2 levels comparing normal and neoplastic tissues (PCa) obtained from prostatic biopsies (logs pmol DHT/mg.protein/min)

Table 1. Comparison of 5 α -reductase-2 levels between normal and neoplastic tissues obtained from prostatic biopsies (logs pmol DHT/mg.protein/min)

| Lobe | Normal | PCa | P | P* |
|-------|-----------------|-----------------|-------|-------|
| | n=22 | n=7 | | |
| Left | 0,64 \pm 1,17 | 1,79 \pm 1,15 | 0,032 | 0,016 |
| | n=21 | n=8 | | |
| Right | 0,79 \pm 1,14 | 1,62 \pm 1,13 | 0,061 | 0,028 |

Data are presented as mean \pm SD. *After adjustment for prostatic specific antigen in multiple linear regression

6. ARTIGO EM LINGUA PORTUGUESA

Atividade da esteróide 5- α redutase tipo 2 em biópsias de tecidos prostáticos normais e neoplásicos

Osmar Luiz Magalhães Oliveira ^{a,b,*}, Francine Muraro ^c, Emanuel Burck Santos ^a, Daniel Freitas Gomes Soares^a, Vera Maria Treis Trindade ^c, Walter José Koff ^{a,b}

^a Serviço de Urologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^c Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Autor Correspondente: Osmar Luiz Magalhães Oliveira

Serviço de Urologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350, 8º andar

90035-003 Porto Alegre, RS, Brasil

Tel: +55-51-21018286

Fax: +55-51-21018001

E-mail: ooliveira@hcpa.ufrgs.br

RESUMO

Introdução: A conversão de testosterona (T) ao metabólito mais potente diidrotestosterona (DHT) pela isoenzima esteróide prostática-específica 5 α -redutase, é uma reação chave na ação de andrógenos na próstata e é importante na promoção e progressão de doenças da próstata. Nesse estudo, foi descrita uma adaptação de um método sensível para avaliação da atividade da 5 α -redutase tipo 2 (5 α -R2), usando uma pequena quantidade de proteína.

Métodos: Foram utilizadas 29 amostras de biópsias prostáticas, guiadas por ultrassom transretal (media idade:70, variação 55-86 anos), as quais, foram submetidas a esse procedimento com propósito de diagnóstico. [4-¹⁴C] testosterona e NADPH foram incubados com homogeneizado de biópsias. Os produtos da reação foram extraídos, separados por cromatografia em camada delgada e revelados por autorradiografia. As áreas correspondentes à T e a DHT foram raspadas, colocadas em frascos e suas radioatividades foram determinadas.

Resultados: O ensaio foi validado em termos de linearidade, com concentração de proteínas e tempo de incubação. A atividade da 5 α -R2 expressa como LN (logaritmo natural) mostrou diferença significativa entre tecidos normais e neoplásico e foi independente dos níveis de PSA.

Conclusões: A determinação da atividade da 5 α -R2, usando as condições acima citadas, pode ser utilizada como um parâmetro molecular de processos neoplásicos prostáticos.

Palavras chave: esteróide 5 α -redutase, biópsia, câncer de próstata, PSA

1. Introdução

A esteróide 5 α -redutase (EC 1.33.99.5) NADPH-dependente é uma enzima que catalisa a redução estéreo-específica irreversível da C¹⁹ 3-ceto- Δ^{4-5} esteróide a metabólitos 5 α -reduzidos. Duas diferentes isoenzimas da 5 α -redutase foram caracterizadas em humanos, macacos, ratos e camundongos: isoenzima esteróide 5 α -redutase tipo 1 (5 α -R1) e esteróide 5 α -redutase tipo 2 (5 α -R2) [1]. Em humanos, são compostas de 260 e 256 aminoácidos, respectivamente, com 47% das seqüências idênticas e propriedades bioquímicas distintas [2], por exemplo, a 5 α -R1 tem um amplo pH ótimo básico e baixa afinidade pela testosterona, enquanto que a 5 α -R2 tem um pH ótimo restrito ácido e alta afinidade pela T [3]. A constante de dissociação aparente para o cofator NADPH é similar para ambas isoenzimas. A DHT é necessária para o crescimento normal e funcionamento da próstata [4] desenvolvimento de hiperlasia prostática benigna (HPB) e, provavelmente, para iniciação e manutenção do câncer de próstata (CaP) [6].

A próstata não é um órgão homogêneo histologicamente, mas é dividido em três diferentes zonas [7]. A zona periférica é considerada como o sítio de origem do câncer, enquanto que a zona de transição é o sítio primário do crescimento hiperplásico na HPB. A 5 α -R2 é, preferencialmente, expressa no estroma da próstata [8] e predomina no tecido prostático normal [9]. Diferenças interindividuais na expressão prostática e na atividade da 5 α -R2 podem ser um risco determinante de desenvolvimento clínico de CaP e, eventualmente de morte. Dados dos níveis séricos dos metabólitos da DHT suportam a hipótese de que a variação na atividade da 5 α -R2 pode explicar,

em parte, diferenças na incidência de CaP na população [10]. Embora o papel da 5 α -R na evolução e progressão do CaP seja objeto de muito interesse, a distribuição e a expressão das duas isoenzimas durante o desenvolvimento e progressão do CaP ainda precisam ser elucidadas [9]. A determinação da expressão do RNAm da 5 α -R2 em biopsias obtidas de próstata [11] pode tornar usual a avaliação do impacto da expressão da 5 α -R2 na próstata em diferentes terapias de intervenção endócrina. É essencial esclarecer a relativa mudança que ocorre na atividade da 5 α -R2 durante o desenvolvimento do CaP, com o objetivo de melhorar as formas de prevenção e as opções de tratamento. A possibilidade de utilizar a atividade da 5 α -R2, ou a expressão do RNAm como marcador prognóstico no CaP, também necessita de mais avaliações.

2. Materiais e Métodos

2.1. Pacientes

Os pacientes foram recrutados prospectivamente no período de janeiro de 2003 a abril de 2005, no ambulatório do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que durante a avaliação clínica apresentaram um valor alterado nos níveis de PSA ($>4,0$) ou no exame do toque digital retal e foram encaminhados para o exame de biópsias. Aos que aceitaram participar deste trabalho, era fornecido um termo de consentimento informado, aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do HCPA número 473-02. As biópsias foram dirigidas por ultra-sonografia com agulha 18G, onde foram coletadas 6 amostras das regiões da zona periférica direita e 6 amostras das regiões da zona periférica esquerda da próstata para o exame histopatológico [17], e aos que aceitaram participar autorizando a coleta de mais dois fragmentos era então retirado um do lado direito e outro do lado esquerdo da próstata, cada biópsia apresentou em média 2-4 mg. Imediatamente após a coleta, o material foi acondicionado em tubos Eppendorff, mergulhado em nitrogênio e armazenado em freezer a -80°C até o momento do uso. Um total of 38 pacientes, media de idade 70, extensão 58-86 anos, dois pacientes não aceitaram participar deste protocolo. Neoplasia prostática intraepitelial (PIN) (n=4) e prostatite (n=3) foram excluídas da análise estatística. No total foram utilizadas 58 biópsias: 22 consideradas normais (não havia a presença de câncer) e 7 mostrando câncer no lado esquerdo e 21 consideradas normais e 8 mostrando câncer, no lado direito.

2.2. Preparação dos tecidos

Cada biópsia foi homogeneizada com homogeneizador Polytron PT 1200 CL, em 2.0 mL de solução gelada contendo 0.25 M de sacarose e 1.0 mM de ditionitrotol (adaptado de Furuta et al., 2001). Esse homogeneizado foi utilizado como fonte enzimática. Testes de validação em termos de linearidade com quantidades de proteínas e incubação foram realizados usando homogeneizados de *pools* de biópsias [12, 13].

2.3. Atividade da esteróide 5- α redutase 2

O ensaio da atividade da esteróide 5- α redutase 2 foi realizado em um volume final de 500 μ l, contendo 50-100 mM de tampão Tris-citrato (pH 5.0), 0,5 mM de NADPH (Sigma), 1,4 μ M de [4-¹⁴C] testosterone (2.1 GBq /mmol, Amersham Biosciences) [14]. A reação foi iniciada com a adição da fonte enzimática (a quantidade de proteína está definida na Figura 2). A mistura de reação foi incubada em banho-maria com agitação, a 37°C, por 60 min. Incubação a 0°C foi usada como controle. A reação foi finalizada com a adição de 2 ml de acetato de etila gelado, tanto nos tubos de reação, como também, nos tubos controles. A mistura resultante foi agitada por 5 min e então centrifugada (1,000 x g, 5 min). A fase orgânica foi separada e evaporada sob atmosfera de nitrogênio, e os resíduos foram dissolvidos em 40 μ l de acetato de etila e aplicados em placas de cromatografia em camada delgada (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck). A cuba de cromatografia era saturada por 24 h usando o solvente de eluição (acetato de etila : benzeno - 67% : 33%). As cromatografias eram desenvolvidas em 20 min, e as placas eram secas a temperatura

ambiente. O padrão da 5α -diidrotestosterona não radioativo foi visualizado sob luz ultravioleta (254 nm). As bandas radioativas eram detectadas por autorradiografia (Filme KODAK MIN-R 2000 por 72 h, revelado pelo processador KODAK X-OMAT 3000 RA), e as áreas associadas com a testosterona e seu metabólito, 5α -diidrotestosterona eram raspadas, e colocadas em frascos contendo líquido de cintilação (4g/l POP; 50 mg/l POPOP; tolueno). A radioatividade foi determinada com o contador de cintilação Wallac 1409 – Liquid Scintillation Counter. A atividade da 5α -R2 foi expressa como picomoles de diidrotestosterona formada por 1 mg de proteína durante 1 minuto (pmol DHT/mg protein/min) [12,13,15].

2.4. Determinação de Proteínas

Proteínas eram quantificadas pelo método de Lowry (1951) usando albumina bovina como padrão [16].

2.5. Determinação do Antígeno Específico Prostático

As amostras de sangue eram obtidas por venopunção, antes de qualquer manipulação na próstata e o soro era armazenado por no máximo 1 semana à -20°C antes do ensaio. A concentração do PSA total sérico era determinado usando o método de quimioluminescência em equipamento Immulite 2000® (Anexo 3).

2.6. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média±desvio padrão. O teste t de Student para amostras independentes foi usado para comparação entre dois grupos. Médias também foram comparadas através do modelo múltiplo de regressão linear. Todos os resultados foram transformados em logaritmos antes da análise. Análise estatística foi realizada usando SPSS versão 12, com um nível de significância $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Condições para avaliação da 5 α -R2

Inicialmente, os testes de validação em termos de concentração de proteínas e tempo de incubação foram realizados usando homogeneizados de pool de biópsias, devido à restrita quantidade de proteína de cada fragmento. Obteve-se a autorradiografia da cromatografia em camada delgada dos extratos lipídicos radioativos dos sistemas enzimáticos (Fig. 1). Pode-se notar que há um aumento linear na formação do produto da 5 α -R2 com o aumento na quantidade de proteínas (Fig. 2). A formação de DHT também apresentou um aumento linear com o passar do tempo (Fig. 3). A figura 4 mostra a importância do uso do cofator NADPH para a realização da reação.

3.2. Comparação entre a atividade da 5 α -R2 em biópsias de próstata humana normais e neoplásicas

A atividade da 5 α -R2 foi analisada em biópsias de próstata guiadas por ultrassom transretal (conforme descrito em Material e Métodos). As biópsias eram divididas em dois grupos para comparação dos níveis de atividade da 5 α -R2 (câncer e não-cancer) dependendo da avaliação histopatológica de cada amostra analisada. Havia 58 biópsias, 7 biópsias com câncer e 22 biópsias não-câncer das análises histopatológicas no lado esquerdo, e 8 biópsias com câncer e 21 biópsias não-câncer, no lado direito (Tabela 1). Além disso havia 4 biópsias apresentando PIN e 3 biópsias apresentando prostatite. Diferenças significativas nos níveis de atividade da 5 α -R2 entre câncer e não-câncer

foram observadas conforme a Tabela 1 Figura 5. Nas 7 biópsias do lado esquerdo com câncer, a média da atividade para a 5 α -R2 foi $1,79 \pm 1,15$ (LN pmol DHT/mg.proteína/min) comparado com $0,64 \pm 1,17$ (LN pmol DHT/mg.proteína/min) em 22 biópsias apresentando não-câncer ($P=0,032$). Nas 8 biópsias do grupo do lado direito classificado como câncer, a média da atividade da 5 α -R2 era $1,62 \pm 1,13$ (LN pmol DHT/mg.proteína/min) comparando com $0,79 \pm 1,14$ (LN pmol DHT/mg.proteína/min) em 21 apresentando não-câncer ($P=0,061$).

Além disso, observamos que tanto nas biópsias do lado esquerdo da próstata ($P=0,016$), assim como nas biópsias do lado direito ($P=0,028$), a relação entre câncer e atividade da enzima 5 α -R2 é independente dos níveis de PSA sérico.(Tabela 1).

4. Discussão

O câncer de próstata representa um candidato ideal para a quimioprevenção devido a sua alta incidência, e por ser uma doença com um período latente clinicamente significativo [18]. A lesão pré-câncer (PIN) pode ser um alvo conveniente para ablação em estratégias de quimioprevenção [19]. Enquanto a terapia de ablação androgênica é conhecida como efetiva na redução do PIN e tratamento do CaP [20], existem significativos efeitos colaterais, incluindo impotência, fadiga, diminuição da massa óssea e muscular, ginecomastia, e fogachos [21]. Nakamura et al. sugerem que enzimas produtoras de androgênios, são co-expressas no câncer de próstata humano, e estão envolvidas no local de produção de DHT [22]. O papel da DHT na iniciação e manutenção do crescimento anormal do epitélio prostático e o papel central da enzima 5α -R promove forte raciocínio para uma análise de um inibidor 5α -R duplo [23]. Tem sido descrito que 5α -R2 é expressa no CaP, e é muito importante no processo *in situ* da produção de DHT [24]. Além disso, supõe-se que a 5α -R2 exerce um papel na patogênese e/ou desenvolvimento do CaP [24].

Nakamura et al. demonstraram que 5α -R1 está freqüentemente expressa no CaP humano e uma correlação significativamente positiva entre imunorreatividade da 5α -R1 e 5α -R2. Tem sido sugerido que indivíduos com maiores níveis de 5α -R, possuem um risco aumentado de desenvolver CaP [22]. Além disso, descrições prévias tem demonstrado que RNAm 5α -R1 e atividade era muito maior no CaP do que no HPB [25]. A inibição da 5α -R, que pode ser considerada como terapia de atenuação androgênica, possui efeitos colaterais mínimos [26]. Dutasterida, que inibe ambas 5α -R1 e 5α -2, tem sido

descrito recentemente para o tratamento que resulta em completa supressão intraprostática de DHT, e aumenta a regressão do CaP [27]. O mais extensivo estudo de inibidor de 5α -R é finasterida. Presti et al. relataram que o tratamento com finasterida, em pacientes diagnosticados com câncer de próstata metastático resultou em apenas mínimos efeitos neste câncer, e diminuiu os níveis de PSA em apenas 7% dos homens com avançado adenocarcinoma de próstata [29]. Em humanos, finasterida é inefetivo na quimio-prevenção do CaP em homens de alto risco dignosticado com PIN [30]. De qualquer modo, o PCPT, mostrou que o tratamento com finasterida, produz 25% de redução nos índices de CaP detectado até 7 anos, evidenciando que a 5α -R2 pode estar envolvida no início e/ou manutenção do CaP [26]. Atividades individuais de 5α -R1 e 5α -R2 tem sido mostradas em espécies de HPB [31], CaP [32], e câncer de próstata recorrente [33]. Resultados destes estudos sugerem que 5α -R1, assim como a 5α -R2, estão associados com o crescimento do CaP [33].

Neste artigo, nós testamos a atividade da 5α -R2 em pequenas amostras de tecidos. Estes parâmetros bioquímicos foram validados em relação a histopatologia da próstata. A presente metodologia é baseada na atividade da 5α -R2 em pequenas amostras de biópsias de 2,0-4,0 mg cada, comparados ao 50 mg de tecidos sugeridos por Bjelfman et al. [1]. Estes resultados confirmam a similaridade com outros estudos em enzimas 5α -R em humanos [1,32]. A determinação da atividade da enzima 5α -R usando 100 μ g (ou menos) de proteína prostática é uma rara oportunidade para estudar o desenvolvimento do CaP e da HPB.

Além da determinação do 5α -R2 RNAm por RT-PCR, o ensaio da atividade da 5α -R2 em biópsias de próstata podem ser usadas para a

avaliação do impacto em diferentes terapias de intervenção endócrina, assim como, outras terapias usadas para o tratamento do CaP. É essencial esclarecer as relativas alterações na atividade da 5α -R2 durante o crescimento do CaP, de forma a melhorar o desenvolvimento e opções de tratamento.

Em conclusão, nós relatamos uma adaptação técnica para a medida da atividade da 5α -R2 que pode ser usada para diagnóstico e/ou marcador prognóstico em patologias da próstata.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da FIPE e Fundação Médica do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS

1. Bjelfman C, Söderström TG, Brekkan E, Norlén BJ, Egevad L, Unge T, Andersson S, Rane A. Differential gene expression of steroid 5 α -reductase 2 in core needle biopsies from malignant and benign prostatic tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;82(7):2210-2214.
2. Titus MA, Gregory CW, Ford III OH, Schell MJ, Maygarden SJ, Mohler JL. Steroid 5 α -reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(12):4365-4371.
3. Hiipakka RA, Zhang HZ, Dai W, Dai Qing, Liao S. Structure-activity relationships for inhibitions of human 5 α -reductases by polyphenols. 2002;63:1165-1176.
4. Imperato-McGinley J, Gautier T, Zirinsky K, Hom T, Palomo O, Stein E, Vaughan ED, Markisz JA, Ramires de Arellano E, Kazam E, Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metabol* 1992;75(4):1022-1026.
5. Isaacs JT, Brendler CB, Walsh PC. Changes in the metabolism of dihydrotestosterone in the hyperplastic human prostate. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56(1):139-146.

6. Petrow V. The dihydrotestosterone (DHT) hypothesis of prostate cancer and its therapeutic implications. *Prostate* 1986;9(4):343-361.
7. McNeal JE. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* 1988;12:619- 633.
8. Söderström TG, Bjelfman C, Brekkan E, Ask B, Egevad L, Norlén BJ, Rane A. Messenger ribonucleic acid levels of steroid 5 α -reductase 2 in human prostate predict the enzyme activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2001;86(2):855-858.
9. Thomas LN, Lazier CB, Gupta R, Norman RW, Troyer DA, O'Brien SP, Rittmaster RS. Differential alterations in 5 α -reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. *The prostate.* 2005;63:231-239.
10. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, et al. 5 α -reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet.* 1992;339:887-889.
11. Bjelfman C, Söderström TG, Brekkan E, Norlén BJ, Egevad L, Unge T, Andersson S, Rane A. Differential gene expression of steroid 5 α -reductase 2 in core needle biopsies from malignant and benign prostatic tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1997;82(7):2210-2214.

12. Furuta S, Fukuda Y, Sugimoto T, Miyahara H, Kamada E, Sano H, Fukuda Y, Takei M, Kurimoto T. Pharmacodynamic analysis of steroid 5 α -reductase inhibitory actions of Z-350 in rat prostate. *European Journal of Pharmacology* 2001; 426:105-111.
13. Hirosumi J, Nakayama O, Fagan T, Sawada K, Chida N, Inami M, Takahashi S, Kojo H, Notsu Y, Okuhara M. FK143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 α -reductase: (1) *In vitro* effects on human and animal prostatic enzymes. *J. Steroid Biochem Molec Biol* 1995; 4:357-363.
14. Normington K, Russell DW. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5 α -reductase isozymes.
15. Pratis K, O'Donnell L, Ooi GT, McLachlan RI, Robertson DM. Enzyme assay for 5 α -reductase type 2 activity in the presence of 5 α -reductase type 1 activity in rat testis. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2000; 75:75-82.
16. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randell RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
17. Fuganti PE, Tobias-Machado M, Pinto MA, Simardi LH, Wroclawski ER. Twelve core prostate biopsy versus six systematic sextant biopsies. *Brazilian Journal of Urology.* 2002;28:207-213.

18. Kelloff GJ, Lieberman R, Steele VE, Boone CW, Lubet RA, Kopelovich L, Malone WA, Crowell JA, Higley HR, Sigman CC. Agents, biomarkers, and cohorts for chemopreventive agent development in prostate cancer. *Urology* 2001;57(4 Suppl 1):46-51.
19. Bostwick DG, Burke HB, Wheeler TM, Chung LW, Bookstein R, Pretlow TG, Nagle RB, Montironi R, Lieber MM, Veltri RW. The most promising surrogate endpoint biomarkers for screening candidate chemopreventive compounds for prostatic adenocarcinoma in short-term phase II clinical trials. *J Cell Biochem Suppl* 1994;19:283-289.
20. Civantos F, Soloway MS, Pinto JE. Histopathological effects of androgen deprivation in prostatic cancer. *Semin Urol Oncol* 1996;14(2 Suppl 2):22-31.
21. Hellerstedt BA, Pienta KJ. The current state of hormonal therapy for prostate cancer. *Cancer J Clin* 2002;52(3):154-179.
22. Nakamura Y, Suzuki T, Nakabayashi M, Endoh M, Sakamoto K, Mikami Y, Moriya T, Ito A, Takahashi S, Yamada S, Arai Y, Sasano H. *In situ* androgen producing enzymes in human prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2005;12:101-107.
23. Andriole G, Bostwick D, Brawley O, Gomella L, Marberger M, Tindall D, Breed S, Somerville M, Rittmaster R. Chemoprevention of prostate cancer

in men at high risk: rationale and design of the reduction by dutasteride of prostate cancer events (reduce) trial. *The Journal of Urology* 2004;172:1314-1317.

24. Torres JM, Ruiz E, Ortega E. Development of a quantitative RT-PCR method to study 5 alpha-reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status. *Prostate* 2003;56:74-79.
25. Iehlé C, Radvanyi F, Medina SGD, Ouafik L, Gérard H, Chopin D, Raynaud JP, Martin PM. Differences in steroid 5 α -reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1999; 68:189-195.
26. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Scott Lucia M, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes D, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman C. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003;349(3):215-224.
27. Andriole GL, Humphrey P, Ray P, Gleave ME, Trachtenberg J, Thomas LN, Lazier CB, Rittmaster RS. Effect of the dual 5 alpha-reductase inhibitor dutasteride on markers of tumor regression in prostate cancer. *Journal of Urology* 2004;172:915-919.

28. Presti JC, Fair WR, Andriole G, Sogani PC, Seidmon EJ, Ferguson D, Ng J, Gormley GJ. Multicenter, randomized, double-blind, placebo controlled study to investigate the effect of finasteride (MK-906) on stage D prostate cancer. *Journal of Urology* 1992;148:1201-1204.
29. Brufsky A, Fonteine-Rothe P, Berlane K, Rieker P, Jiroutek M, Kaplan I, Kaufman D, Kantoff P. Finasteride and flutamide as potency-sparing androgen-ablative therapy for advanced adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 1997;49:913-920.
30. Cote RJ, Skinner EC, Salem CE, Mertes SJ, Stanczyk FZ, Henderson BE, Pike MC, Ross RK. The effect of finasteride on the prostate gland in men with elevated serum prostate-specific antigen levels. *Br J Cancer* 1998;78(3):413-418.
31. Shirakawa T, Okada H, Acharya B, et al. Messenger RNA levels and enzyme activities of 5 α -reductase types 1 and 2 in human benign prostatic hyperplasia (BPH) tissue. *Prostate* 2004;58:33-40
32. Söderström TG, Bjelfman C, Brekkan E, Ask B, Egevad L, Norlén BJ, Rane A. Messenger ribonucleic acid levels of steroid 5 α -reductase 2 in human prostate predict the enzyme activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(2):855-858.

33. Titus MA, Gregory CW, Ford III OH, Schell MJ, Maygarden SJ, Mohler JL.
Steroid 5 α -reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. Clin
Cancer Res. 2005;11(12)4365-4371.

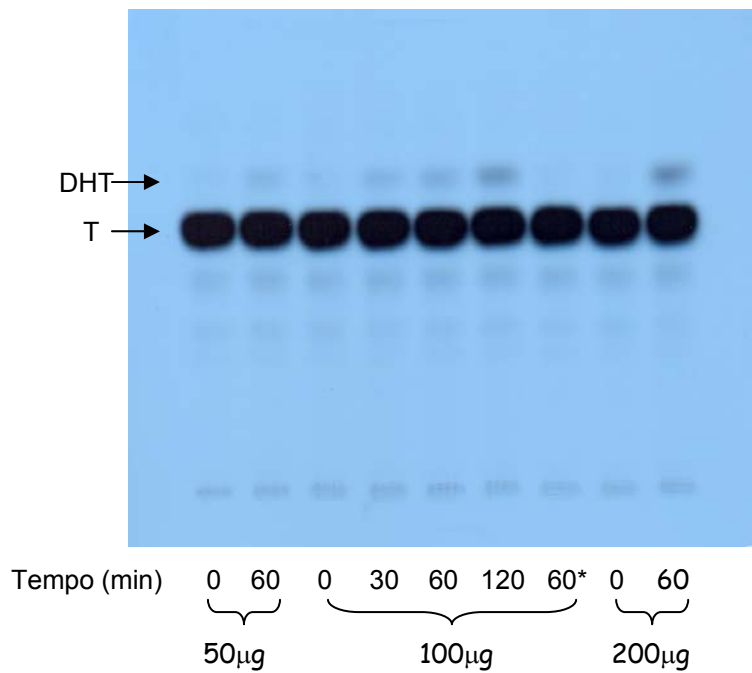


Figura 1. Autorradiografia de cromatografia em camada delgada de extrato lipídico radioativo de sistema enzimático da 5α -R2. Está indicado as diversas concentrações de proteína de biópsias (50, 100 e 200 μ g) que foram incubados durante tempos diferentes (0, 30, 60, 120 minutos). * Controle da reação incubado sem NAPDH.

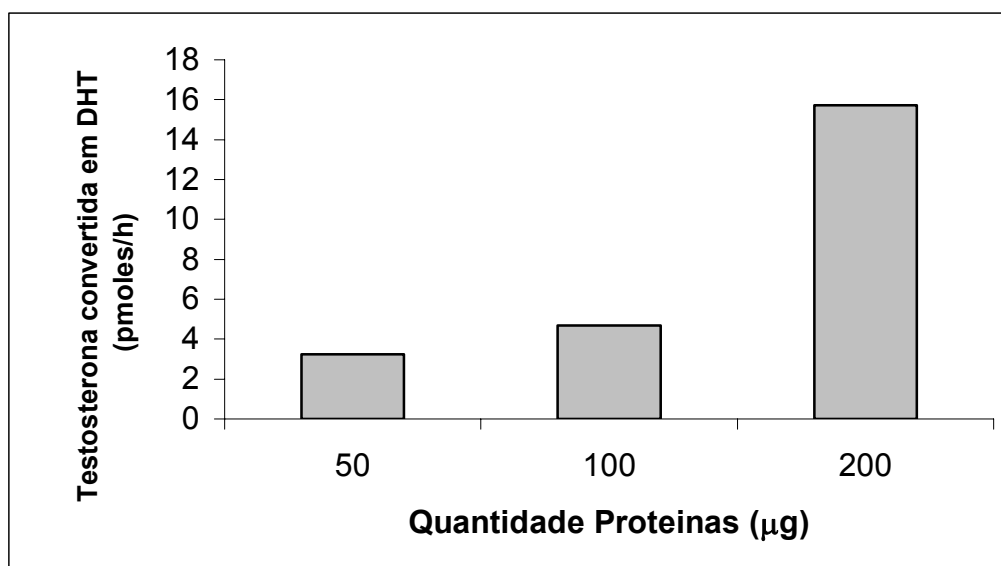


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de proteínas obtidas de homogeneizados de biópsias na formação de diidrotestosterona (DHT), em pH 5, durante 60 minutos de incubação. (Experimento representativo de um *pool* de amostras de biópsias de próstata com e sem câncer)

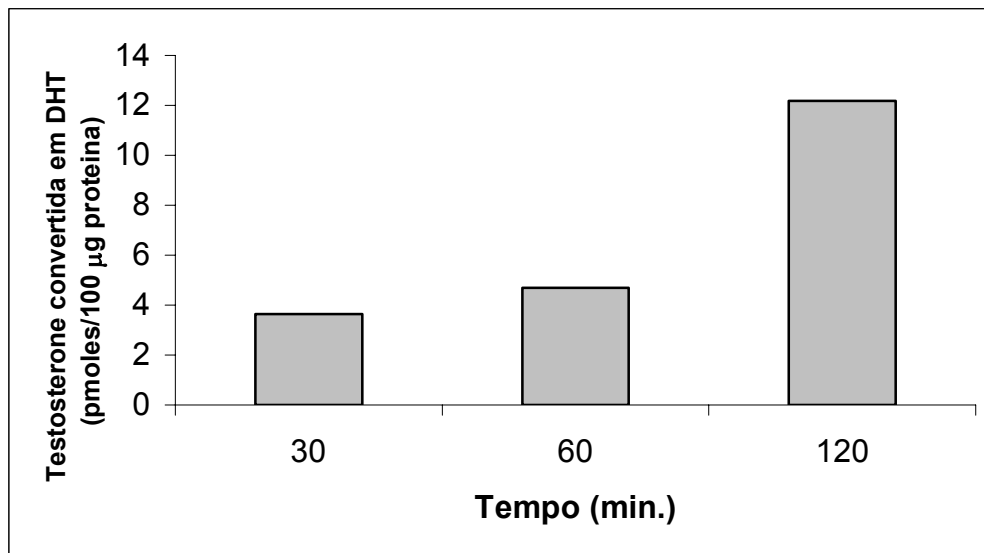


Figura 3. Efeito do tempo de incubação na formação diidrotestosterona (DHT), em pH 5, usando 100 µg proteínas de homogeneizado de biópsias de próstata. (Experimento representativo de um *pool* de amostras de biópsias de próstata com e sem câncer)

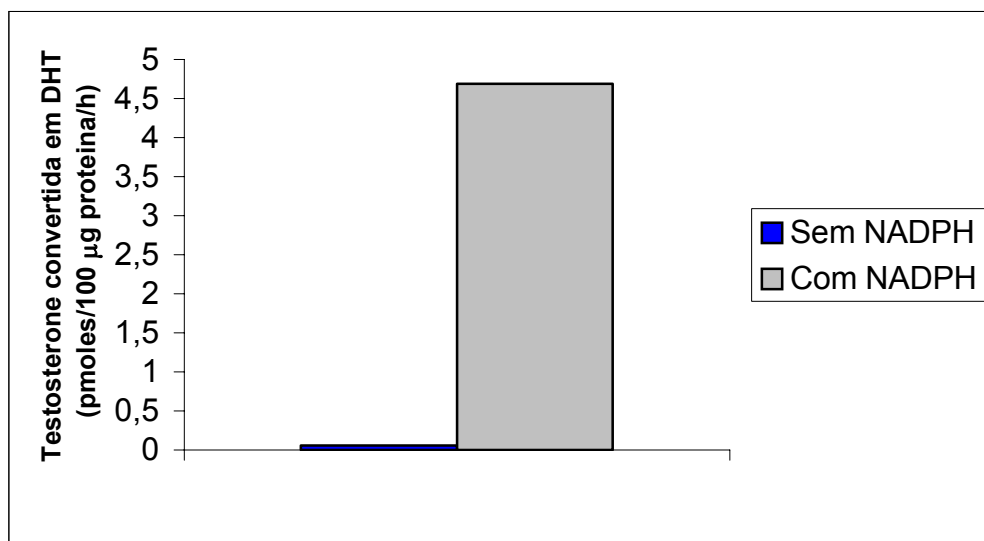


Figure 4. Importância do NADPH na formação da diidrotestosterona (DHT). A reação foi realizada em pH 5, usando 100 µg de proteína de homogeneizado de biópsias de próstata, durante 60 minutos.

Tabela 1. Comparação dos níveis de 5 α -redutase-2 entre tecidos normais e neoplásicos (CaP) obtidos de biópsias de próstata. (logs pmol/mg.proteína/min)

| Lado | Normal | CaP | P | P* |
|----------|-----------------|-----------------|-------|-------|
| | n=22 | n=7 | | |
| Esquerdo | 0,64 \pm 1,17 | 1,79 \pm 1,15 | 0,032 | 0,016 |
| | n=21 | n=8 | | |
| Direito | 0,79 \pm 1,14 | 1,62 \pm 1,13 | 0,061 | 0,028 |

Resultados estão apresentados como média \pm DP. *Após o ajuste para o antígeno específico prostático em regressão linear múltipla

7. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo dos Pacientes:

1. DATA: ___/___/_____
2. Iniciais do paciente: ___ ___ ___
3. N.º do prontuário no HCPA: _____
4. Raça: **(B)** **(N)** **(A)** **(O)**
5. Idade: _____ anos
6. PSA: 6.1.Total: _____; 7.2. Livre: _____; (data do PSA ___/___/___)
7. Medicamentos em uso: (finasterida) (testosterona) (alfa-bloqueador) (dutasterida) (outros): _____
8. Procedimento realizado: **(Bx)** **(RTUP)** **(PS)** **(PRR)**
9. Indicação do procedimento: **(PSA elevado)** **(Nódulo)** **(STUI/RU/HPB)** **(CaP)**
10. Urocultura pré-operatória: (+) (-) **(n.s.)**
11. Diagnóstico anátomo-patológico: **(CaP)** **(HPB)** **(Prostatite)** **(tecido normal)**
(PIN alto grau) (PIN baixo grau)
12. Se CaP:
 - 12.1. Gleason pré-operatório: score (de 2 a 10) _____ (___+___)
 - 12.2. Gleason pós-operatório: score (de 2 a 10) _____ (___+___)
 - 12.3. Estádio pré-operatório (TNM): _____
 - 12.4. Estádio pós-operatório (TNM): _____
 - 12.5. Nadir do PSA: _____
 - 12.6. Cintilografia óssea pré-operatória: (+) (-) **(indeterminada)** **(não realizada)**

LEGENDA: B = branco; N = negro; A = amarelo; O = outras / Bx = biópsia guiada por ecografia transretal de próstata; RTUP= ressecção transuretral de próstata; PS= prostatectomia simples; PRR= prostatectomia radical retropúbica / STUI = sintomas do trato urinário inferior/ RU= retenção urinária; HPB= hiperplasia prostática benigna; CaP= adenocarcinoma de próstata/ n.s.= não solicitada.

Anexo 2

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
SERVIÇO DE UROLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

BIÓPSIA DE PRÓSTATA

Estamos realizando um estudo científico que envolve a utilização de amostras de próstata. Essa pesquisa tem por finalidade trazer avanços no conhecimento de algumas doenças que atigem a próstata. Esse conhecimento poderá ser útil, no futuro, para o aumento da acurácia no diagnóstico (detecção) de câncer de próstata, bem como para potenciais benefícios terapêuticos (melhores tratamentos). Para tanto necessitamos pequenas amostras de próstata obtidas através de biópsias ou de cirurgias. Os colaboradores serão os pacientes que tenham biópsias ou cirurgias já indicadas e agendadas por critérios médicos independentes deste estudo, ou seja, o paciente não fará o procedimento de biópsia exclusivamente para o estudo, mas sim, como parte da investigação a que está sendo submetido. As biópsias transretais de próstata realizados no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas, coletam usualmente 12 fragmentos para fins assistenciais. Solicitamos sua permissão para coletar apenas mais 2 fragmentos para fins de pesquisa.. Apenas esses dois fragmentos seriam utilizados no estudo, sem interferir na capacidade do procedimento em diagnosticar a doença que o atinge. Seu consentimento deverá ser **VOLUNTÁRIO, LIVRE e ESCLARECIDO**, sendo que o senhor poderá aceitar livremente participar ou não do nosso estudo. Ademais informamos que sua identidade será mantida confidencialmente.

Eu,.....RG.....,após ter lido este documento e após tê-lo compreendido, aceito voluntariamente colaborar com o estudo científico em questão, concordando, portanto, que sejam coletadas duas amostras de próstata a mais do que as 12 habituais no procedimento a que necessito ser submetido por razões médicas independentes do presente estudo científico.

Paciente:

...../...../.....
data da assinatura

Pesquisadores:

Dr. Osmar Luiz Magalhães de Oliveira (Telefone 9112.3000)
Dr. Emanuel Burck dos Santos (Telefone 9997.2321)
Serviço de Urologia do HCPA (Telefone 3316.8286)

...../...../.....
data da assinatura

Anexo 3

| | | pH 5,0 | | | | |
|----------|-----------|----------------------|-----------|--------------------|------------|-------|
| | | Atividade Enzimática | | Anátomo-patológico | | PSA |
| Paciente | | Esquerdo | Direito | Esquerdo | Direito | Total |
| AM.S | 989776/0 | 0,009086 | 0,0042339 | CaP | CaP | 8,74 |
| EM | 931726/4 | 0,010178 | 0,012196 | NI | NI | 10,44 |
| MRS | 993234/4 | 0,015559 | 0,001662 | NI | NI | 8,59 |
| NSP | 951327/6 | 0,001947 | 0,0050634 | PIN | PIN | 4,6 |
| VML | 975572/9 | 0,002838 | 0,0087826 | CaP | CaP | 8,7 |
| AV | ,9113455 | 0,003959 | 0,0025677 | Prostatite | Prostatite | 5,66 |
| ERP | 1001652/5 | 0,00456 | 0,0008131 | CaP | NI | 8,09 |
| MMT | 991014/2 | 0,00022 | 0,0006079 | NI | NI | 9,25 |
| MD | 734090/4 | 0,000087 | 0,0116706 | NI | NI | 16,68 |
| PDC | 880753/9 | 0,047012 | 0,0467116 | CaP | CaP | 6,01 |
| LPO | 724494/0 | 0,017138 | 0,0167622 | PIN | PIN | 16,12 |
| LL | 978657/5 | 0,000212 | 0,0018775 | NI | CaP | 4,67 |
| RGW | 857092/1 | 0,00168 | 0,0013696 | NI | NI | 3,31 |
| NSB | 1E+07 | 0,007457 | 0,0060159 | CaP | CaP | 70,1 |
| WLN | 994385/3 | 0,000631 | 0,0007704 | CaP | CaP | 89,2 |
| JMF | 500141/7 | 0,003012 | 0,0138328 | NI | NI | 4,99 |
| AAF | 73192/7 | 0,003546 | 0,0054227 | CaP | CaP | 8,47 |
| OMS | 930067/4 | 0,011103 | 0,0017037 | NI | NI | 7,66 |
| ST | 959850/9 | 0,00087 | 0,0014356 | NI | NI | 7,5 |
| IAO | 989222/8 | 0,004239 | 0,00876 | NI | NI | 3,11 |
| JOR | 92666/0 | 0,000066 | 0,004482 | NI | NI | 23,5 |
| LFR | 832385/9 | 0,002402 | 0,002104 | NI | NI | 6,1 |
| ZSC | 4E+06 | 0,005134 | 0,00077 | Prostatite | Prostatite | 28,55 |
| RBR | 934949/9 | 0,000765 | 0,000654 | NI | NI | 21 |
| JCSS | 559167/2 | 0,00067 | 0,0000543 | NI | NI | 4,73 |
| JAP | 857409/7 | 0,002823 | 0,00065 | NI | NI | 6,09 |
| ARG | 709954/2 | 0,00012 | 0,000789 | NI | NI | 1,73 |
| BSS | 882174/6 | 0,000434 | 0,0015703 | NI | NI | 1,06 |
| JAK | 909960/7 | 0,002939 | 0,0038493 | NI | Pin | 7,01 |
| JCGT | 990525/8 | 0,00114 | 0,000765 | NI | NI | 5,45 |
| VB | 266961/2 | 0,005955 | 0,0034534 | NI | NI | 0,953 |
| AJS | 949643/9 | 0,001092 | 0,0014256 | NI | CaP | 62,97 |
| JGF | 869282/4 | 0,00765 | 0,0000345 | NI | NI | 7,45 |
| VD | 949781/9 | 0,004951 | 0,00467 | Prostatite | NI | 6,54 |