

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Polimorfismo do complexo de repetições (TG) n (TA) n (CA) n do gene da enzima 3 β -hidroxiesteróide Desidrogenase Tipo II e Risco de Câncer de Próstata: Análise de Uma Amostra da População do Rio Grande do Sul

Autor

TIAGO OSELAME FONTANIVE

Orientador: Dr. Walter José Koff

Porto Alegre, janeiro de 2011.

TIAGO OSELAME FONTANIVE

Polimorfismo do complexo de repetições (TG) n (TA) n (CA) n do gene da enzima 3 β -hidroxiesteróide Desidrogenase Tipo II e Risco de Câncer de Próstata: Análise de Uma Amostra da População do Rio Grande do Sul

Orientador: Dr. Walter José Koff

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, como requisito para obtenção de título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, janeiro de 2011.

***“Se o desejo de alcançar a meta estiver
vigorosamente vivo dentro de nós,
não nos faltarão forças para encontrar
os meios de alcançá-la e traduzi-la em atos”.***

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, aos anjos e espíritos de luz pela presença constante em minha vida, iluminando-a e por me possibilitar caminhos que tanto enriquecem o meu existir.

Aos pacientes que consentiram em participar do presente estudo, pela disponibilidade em auxiliar na geração do conhecimento científico.

Aos meus pais, que tanto amo, por uma vida inteira incentivando a minha busca pelo conhecimento e por terem acreditado sempre em mim, fazendo com que me sentisse muitas vezes especial.

Ao Dr. Walter J. Koff, pela oportunidade e confiança depositada em mim ao me aceitar como orientando, possibilitando a realização de um grande sonho.

À Dra. Ilma S. Brum da Silva, a quem admiro muito, por ter me aceito de braços abertos em seu laboratório para a realização deste projeto, pela paciência e grande incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao colega prof. Vanderlei, pelos inúmeros auxílios, ensinamentos e por seu constante bom humor que tanto alegrou o LaBiMET.

Aos meus irmãos Patrícia e Daian e amigos, em especial Vani, que me incentivaram durante estes dois anos.

Ao Vinícius pelo companheirismo e grande incentivo para alcançar o sonho de ser Mestre.

À colega Bruna Amorin, pela companhia nos estudos e nas idas ao laboratório e pela amizade.

À toda equipe do LaBiMET e LAGOM por terem me recebido de braços abertos, o meu sincero agradecimento.

Ao ambulatório de Urologia do HCPA e ao Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral da UFRGS, por possibilitar a realização deste projeto.

Ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo suporte financeiro.

À todos os que me ajudaram, e que comigo conviveram, e que porventura não tiverem seus nomes escritos nesta página, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS	12
LISTA DE SIGLAS	13
LISTA DE FIGURAS	14
1 INTRODUÇÃO	15
1.2 Epidemiologia do Câncer de Próstata	15
1.3 Etiologia	18
1.4 Diagnóstico	19
1.5 Hormônios Androgênicos e Câncer de Próstata	21
1.6 Polimorfismos Genéticos e HSD3B2	22
1.7 Tratamento	27
2 JUSTIFICATIVA	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 MÉTODOS	30
4.1 População em Estudo	30
4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão	31
<i>4.2.1 Casos</i>	

4.2.2 Controles	31
4.3 Delineamento da Pesquisa	31
4.4 Variáveis em Estudo	32
4.5 Análise Laboratorial	32
4.6 Análise Molecular	32
4.6.1 Extração do DNA genômico	32
4.6.2 Condições de ciclagem	33
4.6.3 Análise de Fragmento por Eletroforese Capilar	34
4.7 Locais de realização da pesquisa	34
4.7.1 Coleta dos dados e amostra	34
4.7.2 Exames laboratoriais	35
4.7.3 Avaliação molecular	35
4.8 Cálculo do tamanho da amostra	35
4.9 Análise estatística	35
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
REFERÊNCIAS	38
6 ARTIGO	47
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
Anexo I	68
Anexo II	70
Anexo III	72

RESUMO

Introdução: Diferentes estudos sugerem que a diidrotestosterona (DHT) exerce um importante papel na carcinogênese prostática. A incompleta inativação ou a baixa degradação da DHT na próstata pode levar ao acúmulo de DHT, e talvez, aumento da ação androgênica. A enzima 3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo II (HSD3B2) é responsável pela inativação da DHT na próstata. Neste estudo, um complexo polimórfico de repetições dinucleotídicas (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* no gene HSD3B2 foi avaliado em relação ao risco do desenvolvimento do câncer de próstata.

Métodos: Amostras de sangue foram coletadas de 169 indivíduos com câncer de próstata e 161 de indivíduos controle. A análise do polimorfismo no gene HSD3B2 foi realizada utilizando PCR para amplificar a região do polimorfismo, os produtos de PCR foram analisados através de eletroforese Capilar. Os alelos do polimorfismo (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* foram dicotomizados em curto (≤ 285) e longo (> 285).

Resultados: Um total de 36 alelos, que variam de 267 pb a 361 pb de tamanho foram genotipados em nosso estudo. O alelo com o comprimento de 285 pb foi o mais frequente, representando 36,4% de todos alelos genotipados, sendo seguido pelo alelo 288 pb e 337 pb, representando 17,3% e 15,4%, respectivamente. Na análise de risco, não foi verificada diferença significativa entre os diferentes genótipos em relação ao grupo câncer e controle em relação ao risco no desenvolvimento do câncer de próstata, bem como em relação a sua distribuição nos diferentes grupos ($p > 0,05$).

Conclusões: Estes resultados sugerem que não há correlação na amostra estudada entre o número de repetições do polimorfismo HSD3B2 e o risco de câncer de

próstata. Outros dados clínicos, tais como idade, níveis de testosterona total e livre também não estiveram associados com o polimorfismo no presente estudo.

ABSTRACT

Background: Different studies suggest that dihydrotestosterone (DHT) plays an important role in prostate carcinogenesis. The incomplete inactivation or low degradation of DHT in the prostate can lead to its accumulation, and probable increased androgen action. The enzyme 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II (HSD3B2) is responsible for the inactivation of DHT in the prostate. A complex polymorphic dinucleotide repeat (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* in the HSD3B2 gene was evaluated against the risk of developing prostate cancer.

Methods: Blood samples were collected from 169 individuals with prostate cancer and 161 control individuals. The analysis of the HSD3B2 gene polymorphism was performed using PCR to amplify the region of polymorphism; the PCR products were analyzed by Capillary electrophoresis. The alleles of the polymorphism (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* were dichotomized into short (≤ 285) and long (> 285).

Results: A total of 36 alleles varying from 267 pb to 361 pb were genotyped in our study. The 285 pb allele was the most frequent representing 36.4% of all genotyped alleles, followed by 288 pb and 337 pb, representing 17.3% and 15.4%, respectively. In the risk analysis, there were no significant differences between the different genotypes in relation to cancer and control group in relation to risk in the development of prostate cancer and compared distribution in different groups ($p > 0.05$).

Conclusion: These results suggest that there is no correlation in the sample between the number of repetitions of the HSD3B2 polymorphism and risk of prostate

cancer. Other clinical data such as age and levels of total and free testosterone are not associated with polymorphism in this study.

LISTA DE ABREVIATURAS

CaP – câncer de próstata

DHEA – dehidroepiandrosterona

DHT – diidrotestosterona

HSD3B2 – 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II

PSA – Antígeno Prostático Específico

TNM - *Tumor-Nodes-Metastasis*

TR – Toque Retal

RR – Risco Relativo

SNPs – Single Nucleotide Polymorphisms

LISTA DE SIGLAS

FDA – *United States Food and Drug*

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

AJCC – *American Joint Comitee on Cancer Stagig*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estimativa de CaP a cada 100.000 homens de acordo com a região territorial.

Figura 2 – Localização do gene HSD3B2 no cromossomo 1p13.

1 INTRODUÇÃO

1.2 Epidemiologia do Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) apresenta grandes diferenças em sua incidência entre as populações em todo o mundo, a relação de países com baixos e altos índices de CaP variam de 60 a 100 vezes (1-2).

Esse tipo de câncer, sem considerar o câncer de pele não melanoma, é a doença maligna mais comum em homens norte-americanos e europeus, representando um grande desafio de saúde pública (3), sendo a sexta causa mais comum de câncer no mundo (4). Nos Estados Unidos da América (EUA) aproximadamente um em seis homens pode ser diagnosticado com CaP durante a sua vida, sendo considerado o câncer não cutâneo mais comum e a segunda causa de morte por câncer nesse país (5-7). De acordo com os dados do *American Cancer Society* (2010), a estimativa para o ano de 2010 nos EUA foi de 217.730 novos casos de CaP e 32.050 mortes associadas a esta doença, representando uma grande incidência e mortalidade (8).

Foram estimados no Brasil para o ano de 2010, que também são válidos para o ano de 2011, 489.270 casos novos de câncer, sendo que os tipos mais incidentes, com exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de

próstata e de pulmão no sexo masculino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (9).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CaP é o mais frequente em todas as regiões do Brasil. No Brasil este tipo de tumor tem um risco estimado de 69/100.000 na região Sul, 69/100.000 na região Sudeste, 62/100.000 na região Centro-Oeste, 48/100.000 na região Nordeste, e 24/100.000 na região Norte (risco estimado a cada 100 mil homens), sendo que a estimativa para o Rio Grande do Sul foi de 4.510 novos casos e em Porto Alegre de 690 novos casos para o ano de 2010 (9).

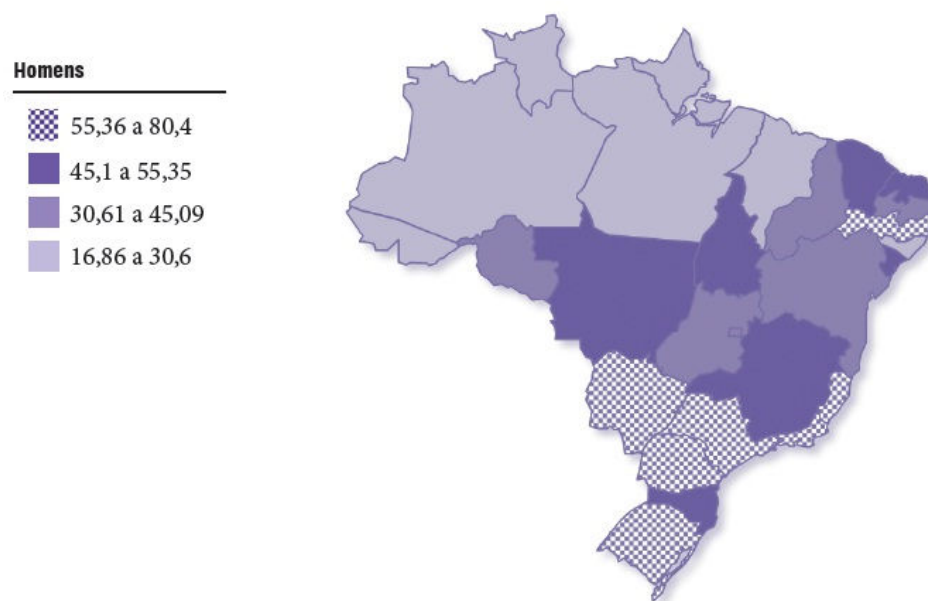


Figura 1. Estimativa de CaP a cada 100.000 homens de acordo com a região territorial.
Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>>

Nos EUA a sua incidência varia marcadamente entre as diferentes etnias, os afro-americanos apresentam as taxas mais elevadas do mundo (185,3 a cada 100.000 habitantes/ano), seguido por caucasiano-americanos (107,8 a cada 100.000

habitantes/ano). As taxas na Europa variam quase sete vezes (15-100 a cada 100.000 habitantes/ano, dependendo do país). As menores prevalências são observadas em populações asiáticas (variando de 3-7 à 22-47 a cada 100.000 habitantes/ano) (10). Essas variações podem ser explicadas pelas diferenças nos fatores dietéticos e ambientais (11). No entanto, os fatores genéticos também podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento da doença.

Alguns homens com CaP permanecem assintomáticos e morrem por causas independentes e não como um resultado do próprio câncer. Isto pode ser devido à idade avançada de muitos homens no momento do diagnóstico, tumor de crescimento lento, ou devido a problemas decorrentes da doença (12). A estimativa do número de homens com carcinoma de próstata latente (isto é, o câncer que está presente na próstata, mas nunca detectado ou diagnosticado durante a vida de um paciente) é maior do que o número de homens com a doença detectada clinicamente. Portanto, é necessário que haja uma maior compreensão dos mecanismos biológicos e genéticos que determinem porque alguns carcinomas de próstata permanecem clinicamente silenciosos, ao passo que outros podem causar problemas graves, com risco de vida (12).

Além disso, a idade é um importante fator de risco para o CaP, sendo raramente visto em homens com menos de 40 anos, a incidência aumenta rapidamente com cada década posterior. A probabilidade de serem diagnosticados com CaP é de 1 em 9.422 para homens com menos de 40 anos, 1 em 41 para os homens com 40 a 59 anos, 1 em 16 para os homens com 60 a 69 anos e 1 em cada 8 homens com idade entre 70 a 79 anos (8).

1.3 Etiologia

Embora pouco se saiba sobre a etiologia do CaP, evidências sugerem a combinação de fatores genéticos e ambientais na iniciação e progressão do tumor (6,13). A idade, etnia e história familiar são fatores que influenciam, substancialmente, o risco de desenvolver o CaP. Fatores relacionados à dieta e ao metabolismo de hormônios também contribuem para a carcinogênese prostática (14-15).

A maior incidência do CaP é evidenciada em países escandinavos como Suécia, Noruega e Finlândia. É considerada intermediária no Brasil e nos EUA, e baixa em países do extremo oriente, como China, Índia e Japão, aonde é 6 a 25 vezes menor (4). Estudos epidemiológicos mostram que a doença é dez vezes mais comum em norte-americanos do que em japoneses que residem no Japão. A frequência, contudo, se iguala quando os japoneses passam a residir nos EUA, indicando a influência dos fatores ambientais e/ou dietéticos na carcinogênese deste tipo de tumor. Diferenças no consumo de gordura animal talvez expliquem estas variações geográficas. Para confirmar esta hipótese, um estudo foi realizado por Fair *et al.*, através de um experimento com camundongos portadores de CaP. Decorrido algum tempo, o volume do tumor foi três vezes maior nos animais que receberam dieta com 40% de gordura do que naqueles cujo teor de gordura era de 2,3% (16).

A idade tem sido considerada como o principal fator de risco para o CaP, sendo seguida pelo histórico familiar. O risco de desenvolver CaP aumenta com o número de diagnósticos desta neoplasia em uma família, bem como com todos os diagnósticos que ocorrem em idades mais jovens. O risco no desenvolvimento em um homem com um irmão que teve CaP é de duas vezes maior do que a população geral em desenvolver este tipo de câncer. Se um indivíduo tiver mais de dois

parentes de primeiro grau diagnosticados em qualquer idade, o risco aumenta para cinco vezes (17-18). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que homens com mãe e/ou irmã com diagnóstico de câncer de mama ou de ovário, apresentam aumento do risco no desenvolvimento da neoplasia prostática (19).

Em um estudo realizado por Steinberg *et al.* (1990) foi demonstrado que homens com parentes de primeiro grau afetado (irmão e/ou pai) apresentam um aumento de duas a três vezes nas chances de desenvolver este tipo de câncer (20). Um estudo mais recente estimou que 42% do risco de CaP é explicado por fatores genéticos, sendo considerado um dos mais prevalentes dos tipos de câncer (21). Estudos epidemiológicos mais recentes tem explorado a hereditariedade em genes relacionados a hormônios como um caminho para o entendimento do seu papel na carcinogênese do CaP (10).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico do CaP deve ser feito na fase inicial, para que se possa obter maior sucesso no tratamento (22-23). Enquanto a incidência do CaP está ligada às características demográficas e genéticas da população, a mortalidade alta é causada pelo retardo do diagnóstico, que favorece a ocorrência de tumores com alta capacidade biológica de invasão local e de disseminação para outros órgãos. Tais tumores são muitas vezes incuráveis em fase metastática (24-25).

O CaP é uma doença que pode ser detectada precocemente por meio de métodos diagnósticos de triagem, sendo que os exames preventivos são: toque retal (TR) e a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA) (23).

A descoberta do PSA em 1979 por Wang *et al.* (1979) marcou o início de uma nova era no diagnóstico e tratamento dos pacientes com CaP (26). Durante as

últimas duas décadas, a dosagem do PSA plasmático tem sido utilizada como uma valiosa ferramenta de triagem para a vigilância do CaP (27).

O PSA é uma protease sérica de regulação andrógena, sendo produzido tanto pelo tecido prostático normal quanto pelas células do câncer. No câncer, ocorre um aumento dos níveis plasmáticos do PSA devido a alterações na permeabilidade celular causada pelas células cancerígenas. O PSA está presente no líquido seminal, onde apresenta a função de liquefação do sêmen após a ejaculação (28-29).

O *United States Food and Drug* (FDA) aprovou a sua utilização em 1986 para monitorizar a doença, mas rapidamente foi adotado para detecção precoce, aumentando a taxa de diagnóstico de CaP (30).

Apesar de amplamente aceito como marcador do CaP, o PSA é específico do tecido prostático e não do câncer. Deste modo, seus níveis séricos também podem elevar-se em pacientes com hiperplasia prostática benigna (HBP) ou prostatites (31). Além disso, os programas de detecção de CaP utilizando o PSA levaram a um aumento significativo das taxas de diagnóstico desta patologia. No entanto, devido à sua baixa especificidade, quando uma biópsia prostática é realizada em pacientes com níveis de PSA entre 3,0 a 10 ng/mL o exame é negativo em 70 a 80% (32-33).

Adicionalmente, níveis mais baixos de PSA não excluem a presença de CaP. No estudo de Thompson *et al.* (2004), que avaliaram 2.950 homens com níveis de PSA abaixo de 4,0 ng/mL e sem alteração no toque retal, que foram submetidos a biópsia prostática, foi demonstrado que 15% dos homens tinham CaP e destes 15% já apresentavam escore de *Gleason* de 7 ou maior (34-36). Além do PSA, o TR apresenta alta especificidade (94%) e baixa sensibilidade (50%), assim como baixo valor preditivo positivo (21% - 53%) (37-39).

A graduação histológica de *Gleason* (1974, 1977 e 1992), revista por Epstein *et al.* (2006), é o fator prognóstico isolado mais frequentemente utilizado para graduação do CaP, valorizando-se a heterogeneidade histológica do CaP, o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático. Nesse sistema, os tumores são classificados em cinco padrões de acordo com a arquitetura glandular. O diagnóstico final na Escala de *Gleason* é dado pela soma dos padrões primário (predominante) e secundário (áreas menos representativas), de forma que as neoplasias sejam classificadas em um escore variável de 2 a 10 (40-43).

Associado ao grau de *Gleason* na definição do prognóstico está o estadiamento que é fundamental na escolha da terapia. O sistema TNM, foi adotado para CaP pela *American Joint Comitee on Cancer Stagig* (AJCC) em 1975, sendo posteriormente modificado em 1992, 1997 e em 2002, e é o mais amplamente utilizado para o estadiamento da doença na atualidade (44-45). Este sistema baseia-se na extensão do tumor primário, na presença de comprometimento linfonodal e na existência ou não de metástases em órgãos à distância.

1.5 Hormônios Androgênicos e Câncer de Próstata

As características estabelecidas do CaP sugerem que hormônios esteróides, particularmente os andrógenos possuem um papel importante na carcinogênese prostática. No entanto, os mecanismos precisos dos efeitos androgênicos neste processo ainda são desconhecidos (46).

Os andrógenos são hormônios esteróides que induzem a diferenciação e maturação dos órgãos reprodutivos masculinos e desenvolvimento das características sexuais secundárias. No homem, andrógenos são formados

primeiramente nos testículos e glândula adrenal, e em uma menor extensão em tecidos periféricos, como a próstata e a pele (10).

Os efeitos dos andrógenos são mediados pela testosterona e/ou diidrotestosterona (DHT) nas células-alvo. A ligação destes ligantes induz o receptor de andrógeno a assumir uma configuração que conduz à ativação (ou inibição) transcricional e permite a transmissão de sinais extracelulares em respostas intracelulares, pela ativação de elementos promotores responsivos e o recrutamento de cofatores (47).

Os hormônios esteroidais desempenham um papel importante em todos os estágios da carcinogênese prostática. Assim, tem sido demonstrado que indivíduos eunucos não desenvolvem CaP (48), e que os andrógenos são necessários para a iniciação do CaP em modelos animais (49-50).

1.6 Polimorfismos Genéticos e HSD3B2

A herdabilidade de uma neoplasia maligna é avaliada entre 5 a 10% de todos os cânceres humanos. Portanto, cerca de 90% dos casos correspondem à forma esporádica da doença, que resulta da associação entre os fatores ambientais e das variáveis que definem uma susceptibilidade genética ao desenvolvimento tumoral (51).

A genética é um fator contribuinte importante para o desenvolvimento e a progressão do CaP. Diversos estudos suportam o papel dos fatores genéticos, incluindo a agregação familiar de CaP, estudos de gêmeos, e a ocorrência da doença em pacientes jovens (52-53).

Polimorfismos são variantes genéticas que ocorrem em pelo menos 1% da população. Variantes polimórficas significam diferenças alélicas no gene e, conseqüentemente, diferenças na função das proteínas (54-57). Estas variações determinam as diferenças fenotípicas entre os indivíduos, ou seja, a individualidade genômica de cada um (58).

A variação da incidência e mortalidade causada pelo CaP em diferentes regiões do mundo sugere que a sua origem seja multifatorial e poligênica. Os eventos moleculares envolvidos na iniciação, bem como na progressão neoplásica do CaP são ainda mal compreendidos. Variações polimórficas em seres humanos podem ser responsáveis por diferenças inter-individuais na susceptibilidade a doenças multifatoriais (59).

Os polimorfismos de genes envolvidos na cascata do metabolismo dos andrógenos podem influenciar geneticamente o risco de CaP. A variação polimórfica da sequência do DNA destes genes, altera a função das proteínas envolvidas no metabolismo dos andrógenos e pode resultar em diferenças no risco e apresentação da doença. Assim como, a distribuição destes polimorfismos, de maneira variável nos diversos grupos populacionais, pode implicar em diferentes prevalências da neoplasia (60).

Vários autores têm relatado polimorfismos em genes associados com o CaP esporádicos e familiares. Algumas vias podem estar envolvidas no desenvolvimento e progressão tumoral, polimorfismos associados ao receptor de andrógenos, genes envolvidos com o controle do ciclo celular, adesão celular, relacionados com a angiogênese, genes do receptor da vitamina D, HSD3B2 e 5alfa-redutase (61-62). No entanto, as associações de polimorfismos com fenótipos de CaP continuam

sendo fragmentados, em alguns casos mal fundamentados, demonstrando a necessidade de novos estudos.

O CaP apresenta uma dependência hormonal conhecida, alterações genéticas em andrógenos são alvos candidatos para conferir uma maior susceptibilidade genética para a neoplasia prostática. Diferentes estudos foram realizados, com polimorfismos em genes envolvidos na via androgênica e sua relação com o risco de desenvolvimento de CaP.

A inativação da DHT na próstata é um importante determinante na concentração intracelular da DHT e é um potencial modulador da atividade androgênica na glândula prostática. A incompleta inativação ou a baixa degradação do DHT na próstata pode levar ao acúmulo de DHT, e talvez, aumento da ação androgênica. Assim, enzimas que inativam a DHT podem ter um papel na predisposição ao CaP (63).

A enzima HSD3B é um componente crítico e fundamental para o metabolismo da via androgênica, pois catalisa a produção da androstenediona em tecidos esteriodogênicos e converte a DHT ativa em metabólitos inativos em tecidos-alvos de esteróides. A família de genes HSD3B apresenta dois genes e cinco pseudogenes, os quais estão presentes no cromossomo 1p13. O gene HSD3B1 codifica a enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo I, que é expresso, exclusivamente, na placenta e em tecidos não esteroidogênicos. O gene da HSD3B2 codifica a enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II, que é predominantemente expressa em tecidos clássicos envolvidos na esteroidogênese, ou seja, nas glândulas supra-renais, testículos e ovários (figura 2). A HSD3B2 é uma das duas enzimas responsáveis pela degradação do DHT em 3 β -androstenediol. Além disso, a HSD3B2 está envolvida na produção de testosterona, através de seu

papel na conversão de dehidroepiandrosterona (DHEA) em androstenediona, um precursor da testosterona (64-65). Um complexo de repetições dinucleotídicas $(TG)n(TA)n(CA)n$ foi estudada e descrita no íntron 3 do HSD3B2 e foi demonstrado ser altamente polimórfico, constituído de pelo menos 25 alelos diferentes (66-67).

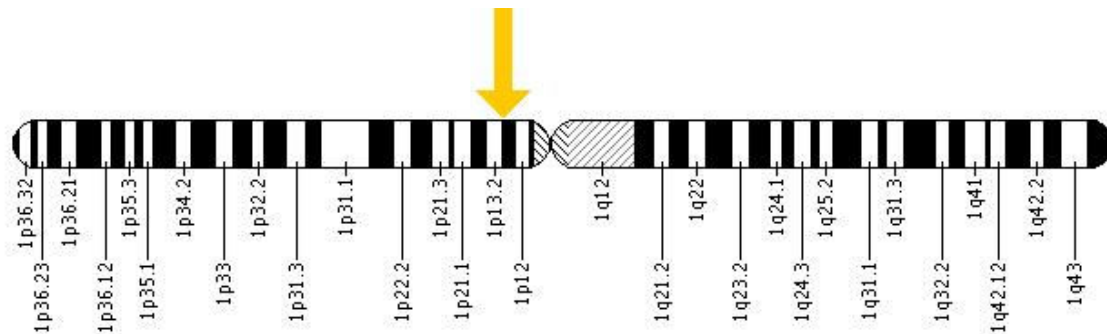


Figura 2. Localização do gene HSD3B2 no cromossomo 1p13. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3284>>

Em estudo realizado por Devgan *et al.* (1997) foi examinada a distribuição da repetição do complexo $(TG)n(TA)n(CA)n$ no gene HSD3B2, demonstrando que existe um alto risco em descendentes africanos, risco-intermediário em descendentes europeus e baixo risco em descendentes asiáticos. Um total de 25 alelos diferentes foram identificados, onde o alelo 289 bp foi o mais frequente em todos os grupos populacionais. Além disso, o alelo 275 bp foi significativamente mais comum entre homens afro-americanos, o 340 bp entre homens europeu-americanos e o 281 bp e alelos entre o 302 até o 334 bp foram encontrados de forma significativa em asiáticos, demonstrando diferenças na distribuição alélica de acordo com a etnia em estudo (66).

A alta frequência destes alelos parece estar associada com o aumento do risco de CaP quando comparados com casos-controle, em diferentes grupos raciais/étnicos. Esta diversidade racial/étnica no locus do HSD3B2 sugere que pode ter um papel na variação racial e étnica no risco de CaP. Adicionalmente, a triagem

do gene HSD3B2 pode levar a identificação de polimorfismos que talvez predisponham homens ao CaP, especialmente utilizando o alto risco de repetições em *tandem* de alelos já caracterizados (66).

Em um estudo recente realizado por Neslund-Dudas *et al.* (2007) foi demonstrado que em caucasianos a repetição do complexo de repetições dinucleotídicas (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* no íntron 3 está associado com o aumento do risco de CaP e a agressividade deste tipo de tumor (68).

Além disso, Chang *et al.* (2002), sequenciaram a região promotora, exons e junções exon-intron, e na região 3'- não traduzida de ambos os genes, HSD3B1 e HSD3B2, identificando quatro SNPs informativos que não mudam de aminoácidos. Foi evidenciado que homens com os genótipos em cada variante B1 N367T ou c7519g-B2 tinham um risco relativo (RR) de 1,76 (95% CI: 1,21–2,57, $p = 0.003$) para CaP, comparado com homens que eram do tipo homozigotos selvagem, em ambos os genes. O risco de CaP hereditário foi mais forte, com um RR de 2,17 (95% CI: 1.29–3.65, $p = 0.003$). Portanto, os SNPs parecem ter um efeito aumentando o risco, principalmente para os casos hereditários de CaP. No entanto, nenhum estudo confirmou estas evidências (69).

Em outro estudo, realizado por Berndt *et al.* (2007), foram genotipados 14 SNPs em 488 casos de CaP e 617 controles, em genes envolvidos na regulação ou no metabolismo hormonal, incluindo o gene HSD3B2. Nesse estudo, foi demonstrado uma associação não significativa com os polimorfismos estudados, com exceção de heterozigotos para SHBG D356N. Esse polimorfismo parece estar associado com um risco aumentado no desenvolvimento de CaP em comparação com o genótipo homozigoto selvagem, especialmente entre caucasianos não-hispânicos (OR = 1,54 IC 95%: 1,13-2,09, $p = 0,006$) (70).

O perfil de expressão gênica de 33 amostras de CaP metastático andrógeno-dependente, proveniente de biópsias de medula óssea, foram examinadas por *microarray* (71). Eles encontraram um aumento da expressão do gene HSD3B2, juntamente com uma série de genes envolvidos na síntese e catabolismo de andrógenos no CaP andrógeno-dependente. Os autores sugeriram que a maior expressão do gene HSD3B2 aumentaria os níveis de androstenediona intracelular, gerando substrato para a conversão à testosterona. Esta observação indica que a regulação alta de HSD3B2, em combinação com outros genes relacionados com andrógenos é um mecanismo para aumentar os níveis intracelulares de andrógenos no CaP andrógeno-independente.

1.7 Tratamento

O tratamento mais comum para o CaP avançado é a terapia ablativa androgênica, o que efetivamente resulta em regressão do tumor. No entanto, apesar da privação à andrógeno, a maioria dos pacientes desenvolvem tumores andrógeno-independente. O papel dos genes envolvidos na biossíntese e na cascata de andrógenos e a carcinogênese prostática tem sido amplamente investigada (72).

O tratamento convencional para o CaP localizado inclui a excisão cirúrgica da próstata (prostatectomia radical), radioterapia, através da irradiação externa ou com implante de isótopos radioativos (braquiterapia) (23).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar da triagem populacional com a avaliação dos níveis séricos do PSA, e toque retal, os estudos até o momento, são controversos, de que este rastreamento diminui a mortalidade doença específica. Além disso, tem sido sugerido que um grande número de tumores, se detectado precocemente, teria um comportamento indolente, não colocando a saúde do paciente em risco ou trazendo um prejuízo à qualidade de vida e muitos deles não necessitariam de tratamento radical (73).

Desta forma, o desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas, marcadores tumorais e o melhor entendimento dos fatores envolvidos na etiologia da carcinogênese prostática, como a associação de fatores ambientais e genéticos, bem como a identificação de fatores de risco e de grupos populacionais susceptíveis ao desenvolvimento do CaP, possibilitarão a um melhor rendimento dos programas de rastreamento populacional, além da escolha mais adequada da terapêutica para cada paciente, diminuindo assim, de forma efetiva a morbidade e mortalidade associada a este tipo de câncer.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação do polimorfismo do complexo de repetições dinucleotídicas (TG) n (TA) n (CA) n do gene HSD3B2 com o risco do desenvolvimento de câncer de próstata em uma amostra da população do Rio Grande do Sul.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a distribuição do número de repetições do polimorfismo do complexo de repetições dinucleotídicas (TG) n (TA) n (CA) n em uma amostra de indivíduos com câncer de próstata e em um grupo controle;
- Correlacionar o número de repetições do polimorfismo do complexo de repetições (TG) n (TA) n (CA) n com os níveis séricos de testosterona total e livre, e PSA total.

4 MÉTODO

4.1 População em Estudo

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (número do projeto 08.635).

Foram estudados pacientes com diagnóstico de câncer de próstata e grupo controle.

Pacientes com diagnóstico estabelecido de câncer de próstata foram recrutados nos turnos de ambulatório do Serviço de Urologia do HCPA, e foram encaminhados a um ambulatório específico para o esclarecimento desta pesquisa. Foram explicados os objetivos da pesquisa e aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido, sendo realizada após, a coleta de sangue venoso periférico para avaliação do polimorfismo em estudo e para dosagem sérica de testosterona total, albumina, SHBG (obtendo-se o valor de testosterona livre através de fórmula) e dosagem de PSA total.

Os controles foram encaminhados dos ambulatórios de Urologia e, uma vez verificados os critérios de inclusão e exclusão, foram encaminhados ao ambulatório específico desta pesquisa. Após explicação dos objetivos da pesquisa e aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido, foi realizada coleta de sangue venoso periférico para avaliação do polimorfismo e dosagens hormonais em estudo. Foram

coletadas informações relacionadas aos dados de identificação, bem como informações da história clínica dos pacientes com CaP e controles (Anexo III).

4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

4.2.1 Casos

Pacientes com idade entre 45 a 75 anos com diagnóstico de câncer de próstata, que não receberam tratamento com hormonioterapia ou quimioterapia e sem diagnóstico de outra neoplasia concomitante, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do HCPA.

4.2.2 Controles

Pacientes do ambulatório de Urologia, entre 45 a 75 anos com PSA inferior a 2,0 ng/mL, exame de toque retal normal e que não apresentaram diagnóstico de outra neoplasia concomitante.

4.3 Delineamento da Pesquisa

Estudo caso-controle.

4.4 Variáveis em Estudo

- Análise da associação entre o polimorfismo do complexo de repetições (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* do gene HSD3B2 com o aumento do risco de câncer de próstata.

- Associação dos resultados moleculares com os níveis séricos de testosterona total e livre, bem como PSA total.

4.5 Análise Laboratorial

Amostras de sangue venoso foram colhidas para as dosagens de testosterona total e livre, albumina e SHBG, para obtenção do valor de testosterona livre, bem como dosagem de PSA total, pelo método de Quimioluminescência no Serviço de Patologia Clínica do HCPA.

4.6 Análise Molecular

4.6.1 Extração do DNA Genômico

A análise do polimorfismo do complexo de repetições dinucleotídicas (TG) n (TA) n (CA) n do HSD3B2, foi realizada através da extração do DNA genômico de leucócitos periféricos obtido das amostras de sangue de todos os participantes do estudo. A extração de DNA foi realizada a partir do sangue total coletado em tubos com EDTA. Logo após, foi realizada a lise de hemácias utilizando dois volumes de Solução de Lise de Hemácias (NH₄Cl 114 mM, NH₄HCO₃ 1mM) sendo incubada a solução por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, a solução foi centrifugada por 15 minutos à 3000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. A etapa de lise de hemácias foi repetida mais uma vez. Em seguida, realizou-se a lise de leucócitos com 1,8 mL de Solução de Lise de Leucócitos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0), 36 μ l de SDS a 10% e 30 μ L de Proteinase K (10 mg/mL). A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por aproximadamente 18

horas. Após a incubação, foi adicionado à solução 0,72 mL de Solução Saturada de NaCl (6M). A solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, foi transferido o sobrenadante e acrescentado 2 volumes de etanol absoluto gelado para precipitar o DNA. O DNA foi retirado e colocado em tubo *ependorf* contendo 0,9 mL de etanol 70% gelado e a solução foi centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm. Essa etapa se repetiu por mais duas vezes. Após desprezou-se o sobrenadante e o álcool foi evaporado no ar ambiente, ficando, somente, o *pellet* de DNA no *ependorf*. Na etapa final, o *pellet* foi ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0), aquecido por 5 minutos a uma temperatura de 65°C e, em seguida, armazenado a uma temperatura de 80°C negativos.

4.6.2 Condições de Ciclagem

A avaliação da diversidade do polimorfismo foi realizada através da técnica de PCR com análise de fragmento por eletroforese Capilar. Na amplificação dos fragmentos de DNA foram utilizados os primers 5'-AATAAAGTGATTACCTAGGTCCT-3' e 5'-GATTGGGTCATGATACAGCCGTAG-3', sendo este último marcado pela fluorescência 6-carboxifluoresceína (FAM).

Para a realização do PCR, foi utilizada uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 min., ciclos *touchdown* (desnaturação a 94 °C por 30 seg., anelamento por 30 seg. com temperatura decaindo 1 °C por ciclo de 62 a 54 °C e extensão a 68 °C por 1 min.), 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg., anelamento a 54 °C por 30 seg., uma extensão a 68 °C por 1 min., e uma etapa final de 72 °C por 10 min.

4.6.3 Análise de Fragmento por Eletroforese Capilar

A análise do polimorfismo no gene HSD3B2 foi realizada utilizando PCR com um dos primers marcado com fluorescência para amplificar a região adjacente ao polimorfismo. Os produtos do PCR foram analisados através de eletroforese Capilar em analisador genético ABI 3130xl (Applied Biosystems Inc.) com a identificação dos alelos. Um μL do produto amplificado foi adicionado a 8,8 μL de formamida (HiDye formamide, Applied Biosystems Inc.) e 0,2 μL de marcador de peso molecular interno GS500-LIZ (Applied Biosystems Inc.), desnaturados a 95°C por 5 minutos e imediatamente colocados no gelo por, no mínimo, 5 minutos. As amostras foram injetadas no analisador genético ABI 3130xl (Applied Biosystems Inc.) usando um CaPilar de 36 cm x 50 μm com o polímero apropriado (Performance Optimized Polymer-7 – POP7, Applied Biosystems Inc.) nas seguintes condições: injeção por 15 segundos a 1,6 kV e corrida por 1800 segundos a 15 kV na temperatura de 60°C. Os tamanhos das seqüências amplificadas foram calculadas por comparação com o padrão de peso molecular GS500-LIZ através do programa GeneMapper® (Applied Biosystems Inc.).

4.7 Locais de realização da pesquisa

4.7.1 Coleta dos Dados e Amostra

Foram utilizadas 188 amostras coletadas e armazenadas pelo projeto 04.243 para avaliação do polimorfismo em estudo, sendo que 105 e 83 correspondem a casos e controles, respectivamente. Esta possibilidade de reutilização do DNA

desses pacientes consta no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto 04.243

4.7.2 Exames Laboratoriais

As dosagens foram realizadas no Serviço de Patologia Clínica do HCPA.

4.7.3 Avaliação Molecular

Esta avaliação foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.8 Cálculo do tamanho da Amostra

O cálculo amostral foi baseado no estudo de Neslund-Dudas *et al.* (2007) utilizando-se o software WinPepi 3.0, onde foi considerado um poder de 80 % e um nível de significância de 95% para o polimorfismo do complexo de repetições dinucleotídicas (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* do gene HSD3B2. O tamanho da amostra calculado foi de 526 indivíduos, sendo 263 pacientes com CaP e 263 casos-controle.

4.9 Análise estatística

Foi realizada a curva ROC para determinar o ponto de corte do comprimento dos alelos do polimorfismo em estudo, sendo dicotomizados em curto (≤ 285 pb) e longo (> 285 pb), sendo subdivididos em indivíduos com genótipo “longo” (alelo > 285 pb), “curto” (alelo ≤ 285 pb), “longo/longo” (contendo dois alelos com comprimento > 285 pb) “longo/curto” (alelo > 285 pb e ≤ 285 pb) e “curto/curto” (contendo dois

alelos com comprimento ≤ 285 pb). A associação dos diferentes genótipos do polimorfismo com o grupo câncer e controle foi realizada pelo teste do qui-quadrado. As associações entre o polimorfismo e fatores de risco foram calculadas também pelo teste do qui-quadrado. Foi realizada correlação entre as diferentes variáveis analisadas.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes e os indivíduos controles foram esclarecidos em relação ao estudo e somente participaram após terem assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos I e II). Não houve implicação do estudo sobre o atendimento prestado aos pacientes no ambulatório. A retirada de uma amostra de sangue venoso não requer procedimento especial e envolve riscos mínimos para os pacientes. Uma vez que se trata de informações genéticas específicas, foi garantido aos pacientes o sigilo em relação às informações obtidas e uso absolutamente restrito para fins de pesquisa científica.

Não foi oferecido aconselhamento genético, uma vez que, até o momento, não existem evidências para que se mude o manejo dos pacientes de acordo com as variantes do polimorfismo estudado, e nem para que se faça alguma abordagem diagnóstica diferente para as pessoas saudáveis que apresentem diferença no número de tal polimorfismo. A fase de estudo está ainda relacionada a buscar risco associado com o desenvolvimento de câncer de próstata; não existem estratégias específicas para preveni-lo ou para abordagem especial dos pacientes de acordo com a presença ou não do polimorfismo.

REFERÊNCIAS

1. Stanford JL SR, Coyle LM, et al. Prostate Cancer Trends 1973-1995. National Cancer Institute 1999:99-4543.
2. Miller BA KL, Bernstein L, et al. Racial/Ethnic Patterns of Cancer in the United States 1988-1992. National Cancer Institute 1996:96-4104.
3. Kesarwani P, Ahirwar DK, Mandhani A, Mittal RD. Association between -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and progression of prostate cancer in North Indian population. DNA Cell Biol 2008;27(9):505-510.
4. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. Lancet 2003;361(9360):859-864.
5. Beuten J, Gelfond JA, Byrne JJ, Balic I, Crandall AC, Johnson-Pais TL, Thompson IM, Price DK, Leach RJ. CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians. Carcinogenesis 2008;29(9):1751-1757.
6. dos Santos RM, de Jesus CM, Trindade Filho JC, Trindade JC, de Camargo JL, Rainho CA, Rogatto SR. PSA and androgen-related gene (AR, CYP17, and CYP19) polymorphisms and the risk of adenocarcinoma at prostate biopsy. DNA Cell Biol 2008;27(9):497-503.
7. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin 2008;58(2):71-96.
8. Society AC. Cancer Facts and Figures 2010: Atlanta; 2010.

9. INCA. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2010. 2010.
10. Chokkalingam AP, Stanczyk FZ, Reichardt JK, Hsing AW. Molecular epidemiology of prostate cancer: hormone-related genetic loci. *Front Biosci* 2007;12:3436-3460.
11. Carter BS, Carter HB, Isaacs JT. Epidemiologic evidence regarding predisposing factors to prostate cancer. *Prostate* 1990;16(3):187-197.
12. Ruijter E, van de Kaa C, Miller G, Ruitter D, Debruyne F, Schalken J. Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocr Rev* 1999;20(1):22-45.
13. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349(4):366-381.
14. Lima MM, Jr., Oliveira MN, Granja F, Trindade AC, De Castro Santos LE, Ward LS. Lack of association of GSTT1, GSTM1, GSTO1, GSTP1 and CYP1A1 polymorphisms for susceptibility and outcome in Brazilian prostate cancer patients. *Folia Biol (Praha)* 2008;54(3):102-108.
15. Zeegers MP, Kiemeneij LA, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(11 Pt 1):1765-1771.
16. Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(5):414-428.
17. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 2002;168(3):906-913.

18. Hampel H, Sweet K, Westman JA, Offit K, Eng C. Referral for cancer genetics consultation: a review and compilation of risk assessment criteria. *J Med Genet* 2004;41(2):81-91.
19. Edwards SM, Eeles RA. Unravelling the genetics of prostate cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004;129C(1):65-73.
20. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990;17(4):337-347.
21. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000;343(2):78-85.
22. Brawer MK, Stamey TA, Fowler J, Droller M, Messing E, Fair WR. Perspectives on prostate cancer diagnosis and treatment: a roundtable. *Urology* 2001;58(2):135-140.
23. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 2010;24(18):1967-2000.
24. Coldman AJ, Phillips N, Pickles TA. Trends in prostate cancer incidence and mortality: an analysis of mortality change by screening intensity. *CMAJ* 2003;168(1):31-35.
25. Stamey TA, Kabalin JN. Prostate specific antigen in the diagnosis and treatment of adenocarcinoma of the prostate. I. Untreated patients. *J Urol* 1989;141(5):1070-1075.
26. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17(2):159-163.

27. Reynolds MA. Molecular alterations in prostate cancer. *Cancer Lett* 2008;271(1):13-24.
28. Lilja H. A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 1985;76(5):1899-1903.
29. Lilja H, Ulmert D, Vickers AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 2008;8(4):268-278.
30. Etzioni R, Gulati R, Falcon S, Penson DF. Impact of PSA screening on the incidence of advanced stage prostate cancer in the United States: a surveillance modeling approach. *Med Decis Making* 2008;28(3):323-331.
31. Schalken JA, Bergh A, Bono A, Foster C, Gospodarowicz M, Isaacs WB, Rubin M, Schroder F, Tribukait B, Tsukamoto T, Wiklund P. Molecular prostate cancer pathology: current issues and achievements. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2005(216):82-93.
32. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994;151(5):1283-1290.
33. Djavan B, Zlotta A, Remzi M, Ghawidel K, Basharkhah A, Schulman CC, Marberger M. Optimal predictors of prostate cancer on repeat prostate biopsy: a prospective study of 1,051 men. *J Urol* 2000;163(4):1144-1148; discussion 1148-1149.
34. Qiu SD, Young CY, Bilhartz DL, Prescott JL, Farrow GM, He WW, Tindall DJ. In situ hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. *J Urol* 1990;144(6):1550-1556.

35. Stamey TA, Chen Z, Prestigiacomo A. Serum prostate specific antigen binding alpha 1-antichymotrypsin: influence of cancer volume, location and therapeutic selection of resistant clones. *J Urol* 1994;152(5 Pt 1):1510-1514.
36. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Parnes HL, Minasian LM, Ford LG, Lippman SM, Crawford ED, Crowley JJ, Coltman CA, Jr. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level \leq 4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 2004;350(22):2239-2246.
37. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51(1):15-36.
38. Grubb RL, 3rd, Kibel AS. Prostate cancer: screening, diagnosis and management in 2007. *Mo Med* 2007;104(5):408-413; quiz 413-404.
39. Perrer S. Cancer statistics. *Cancer J Clin* 1996;46:5-27.
40. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL. Update on the Gleason grading system for prostate cancer: results of an international consensus conference of urologic pathologists. *Adv Anat Pathol* 2006;13(1):57-59.
41. Gleason. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma; 1977.
42. Gleason D. F. MGT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcionama by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of Urology* 1974;111:58-64.
43. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 1992;23(3):273-279.
44. Carter H. B. PAW. Diagnosis and staging of prostate cancer. edition t, editor. WB Saunders; 2002.
45. Partin AW, Catalona WJ, Southwick PC, Subong EN, Gasior GH, Chan DW. Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer

- detection: influence of total PSA, prostate volume, and age. *Urology* 1996;48(6A Suppl):55-61.
46. Bosland MC. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2000(27):39-66.
 47. Gobinet J, Poujol N, Sultan C. Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198(1-2):15-24.
 48. Wu CP, Gu FL. The prostate in eunuchs. *Prog Clin Biol Res* 1991;370:249-255.
 49. Pollard M, Luckert PH. The inhibitory effect of 4-hydroxyphenyl retinamide (4-HPR) on metastasis of prostate adenocarcinoma-III cells in Lobund-Wistar rats. *Cancer Lett* 1991;59(2):159-163.
 50. Pollard M, Luckert PH, Sporn MB. Prevention of primary prostate cancer in Lobund-Wistar rats by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Cancer Res* 1991;51(13):3610-3611.
 51. Yuspa SH. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis* 2000;21(3):341-344.
 52. Ekman P. Genetic and environmental factors in prostate cancer genesis: identifying high-risk cohorts. *Eur Urol* 1999;35(5-6):362-369.
 53. Gronberg H, Damber L, Damber JE. Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol* 1994;152(5 Pt 1):1484-1487; discussion 1487-1489.
 54. A Rossit NC-F. Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Rev Soc Bras Cancerol* 2001;10 26-31.
 55. Conforti N. Suscetibilidade genética ao câncer. JC. FCR, editor. São Paulo-SP: Atheneu; 2004.

56. Jorde Carey WB. *Variação genética: sua origem e detecção*: Elsevier; 2004.
57. Wunsch Filho V, Zago MA. Modern cancer epidemiological research: genetic polymorphisms and environment. *Rev Saude Publica* 2005;39(3):490-497.
58. RB Parmigiani AC. *O Genoma Humano e o Câncer*. CG Ferreira JC, editor, 3 ed. São Paulo-SP: Atheneu; 2004.
59. Kesarwani P, Mandal RK, Maheshwari R, Mittal RD. Influence of caspases 8 and 9 gene promoter polymorphism on prostate cancer susceptibility and early development of hormone refractory prostate cancer. *BJU Int* 2010.
60. Coughlin SS, Hall IJ. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Ann Epidemiol* 2002;12(3):182-196.
61. Dianat SS, Margreiter M, Eckersberger E, Finkelstein J, Kuehas F, Herwig R, Ayati M, Lepor H, Djavan B. Gene polymorphisms and prostate cancer: the evidence. *BJU Int* 2009;104(11):1560-1572.
62. Gelmann EP, Semmes OJ. Expression of genes and proteins specific for prostate cancer. *J Urol* 2004;172(5 Pt 2):S23-26; discussion S26-27.
63. Ntais C, Polycarpou A, Tsatsoulis A. Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur J Endocrinol* 2003;149(6):469-477.
64. Lachance Y, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Dumont M, de Launoit Y, Guerin S, Leblanc G, Labrie F. Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992;267(5):3551.
65. Olsson M, Ekstrom L, Guillemette C, Belanger A, Rane A, Gustafsson O. Correlation between circulatory, local prostatic, and intra-prostatic androgen levels. *Prostate* 2010.

66. Devgan SA, Henderson BE, Yu MC, Shi CY, Pike MC, Ross RK, Reichardt JK. Genetic variation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in three racial/ethnic groups: implications for prostate cancer risk. *Prostate* 1997;33(1):9-12.
67. Verreault H, Dufort I, Simard J, Labrie F, Luu-The V. Dinucleotide repeat polymorphisms in the HSD3B2 gene. *Hum Mol Genet* 1994;3(2):384.
68. Neslund-Dudas C, Bock CH, Monaghan K, Nock NL, Yang JJ, Rundle A, Tang D, Rybicki BA. SRD5A2 and HSD3B2 polymorphisms are associated with prostate cancer risk and aggressiveness. *Prostate* 2007;67(15):1654-1663.
69. Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J. Joint effect of HSD3B1 and HSD3B2 genes is associated with hereditary and sporadic prostate cancer susceptibility. *Cancer Res* 2002;62(6):1784-1789.
70. Berndt SI, Chatterjee N, Huang WY, Chanock SJ, Welch R, Crawford ED, Hayes RB. Variant in sex hormone-binding globulin gene and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(1):165-168.
71. Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM, Febbo PG, Balk SP. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(5):2815-2825.
72. Sharifi N. New agents and strategies for the hormonal treatment of castration-resistant prostate cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19(7):837-846.
73. Taneja SS, Hsu EI, Cheli CD, Walden P, Bartsch G, Horninger W, Babaian RJ, Fritsche HA, Childs S, Stamey TA, Sokoll LJ, Chan DW, Brawer MK, Partin AW, Lepor H. Complexed prostate-specific antigen as a staging tool:

results based on a multicenter prospective evaluation of complexed prostate-specific antigen in cancer diagnosis. *Urology* 2002;60(4 Suppl 1):10-17.

6 ARTIGO

O presente artigo será submetido ao periódico *The Prostate*.

Polymorphism of complex repeats (TG)*n*(TA)*n*(AC)*n* of the gene of enzyme 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II and Risk of Prostate Cancer: Analysis of a sample from the population of Rio Grande do Sul

Fontanive, T.O.¹, Amorin, B.¹, Biolchi, V.¹, Brum, I.S^{1*}, Koff, W.J²

¹ Laboratory of Endocrine and Tumor Molecular Biology, Universidade Federal of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Department of Urology of Hospital de Clínicas of Porto Alegre, Brazil.

*e-mail: wkoff@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Background: Different studies suggest that dihydrotestosterone (DHT) plays an important role in prostate carcinogenesis. The incomplete inactivation or low degradation of DHT in the prostate can lead to its accumulation, and probable increased androgen action. The enzyme 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II (HSD3B2) is responsible for the inactivation of DHT in the prostate. A complex polymorphic dinucleotide repeat (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* in the HSD3B2 gene was evaluated against the risk of developing prostate cancer.

Methods: Blood samples were collected from 169 individuals with prostate cancer and 161 control individuals. The analysis of the HSD3B2 gene polymorphism was performed using PCR to amplify the region of polymorphism; the PCR products were analyzed by Capillary electrophoresis. The alleles of the polymorphism (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* were dichotomized into short (≤ 285) and long (> 285).

Results: A total of 36 alleles varying from 267 pb to 361 pb were genotyped in our study. The 285 pb allele was the most frequent representing 36.4% of all genotyped alleles, followed by 288 pb and 337 pb, representing 17.3% and 15.4%, respectively. In the risk analysis, there were no significant differences between the different genotypes in relation to cancer and control group in relation to risk in the development of prostate cancer and compared distribution in different groups ($p > 0.05$).

Conclusion: These results suggest that there is no correlation in the sample between the number of repetitions of the HSD3B2 polymorphism and risk of prostate cancer. Other clinical data such as age and levels of total and free testosterone are not associated with polymorphism in this study.

Keyword: polymorphism, HSD3B2, prostate cancer.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common malignancy among Americans and Europeans, representing a major public health challenge (1-2), being the sixth most common cause of cancer worldwide (3). The estimate for 2010 in the U.S. was of 217,730 new cases of PCa and 32,050 deaths associated with this disease,

representing a high incidence and mortality (4). For Brazil, the estimate for 2010, which is also valid for 2011, is of 489,270 new cases of cancer. The most common types, except for skin cancer of the non-melanoma type, are prostate and lung cancer in men, following the same magnitude pattern observed for Latin America (5).

The polymorphisms of genes involved in the androgen metabolism cascade may genetically influence the risk of PCa. The polymorphic variation of these genes DNA sequence alters the function of proteins involved in the androgens metabolism and may result in differences in risk and disease presentation. Likewise, the variable distribution of these polymorphisms in different population groups may imply different prevalences of the neoplasm (6).

The HSD3B2 gene encodes enzyme 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II, which is predominantly expressed in tissues involved in steroidogenesis, namely the adrenals, testicles and ovaries. HSD3B2 is one of the two enzymes responsible for the degradation of DHT in 3 β -androstenediol (7-10). Besides, HSD3B2 is involved in progesterone production by mean of its role in the conversion of androstenedione, a precursor of testosterone. A complex of dinucleotide repeat (TG) n (TA) n (CA) n was studied and described in intron 3 of HSD3B2 present in chromosome 1p13. This repeat is highly polymorphic, consisting of at least 25 different alleles (7,10). Some studies suggest an association between this polymorphism and the risk of developing PCa (11-14).

The aim of this study was to evaluate a possible association of polymorphism (TG) n (TA) n (CA) n of gene HSD3B2 in relation in relation to the risk of developing PCa.

Methods

Study Population and Data Collection

After approval by the local ethics committee, we performed a case-control study to research patients with prostate cancer and controls. Patients were recruited from the outpatient clinic of the Urology Service, Hospital de Clinicas of Porto Alegre (HCPA). After clarification of the goals of research and application of the term of informed consent (IC), we collected peripheral venous blood for assessment of polymorphism and total and free testosterone serum measurement, and total PSA dosage. Study participants declared to be Caucasians or Afro-descendants.

Patients diagnosed with prostate cancer without hormone therapy or chemotherapy and without the concomitant diagnosis of another neoplasm, aged from 45 to 75 years, were included in the Cancer group. The control group included patients aged 45 to 75 years with PSA below 2.0 ng / mL, normal digital rectal examination and have shown no concurrent diagnosis of another neoplasm.

Genotyping

The analysis of polymorphism (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* of gene HSD3B2 was performed by extracting genomic DNA from peripheral leukocytes obtained from blood samples of all study participants.

Molecular analysis was performed using a previously described primer pair (10). PCR was performed with primers tagged with a fluorescent 6-carboxyfluorescein (FAM) to amplify the region adjacent to the polymorphism. The PCR products were analyzed by capillary electrophoresis on ABI 3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems Inc.) with the identification of alleles. One μ L of the amplified product was added to 8.8 μ L

of formamide (HiDye formamide, Applied Biosystems Inc.) and 0.2 μ L of internal molecular weight marker GS500-LIZ (Applied Biosystems Inc.), denatured at 95°C for 5 minutes and immediately placed on ice for at least 5 minutes. The samples were injected into the genetic analyzer ABI 3130xl (Applied Biosystems Inc.) using a 36 cm x 50 μ m Capillary with the appropriate polymer (Performance Optimized Polymer-7 – POP7, Applied Biosystems Inc.) under the following conditions: injection for 15 seconds at 1.6 kV and 1800 seconds run at 15 kV at 60°C. The sizes of the amplified sequences were calculated by comparison with the standard GS500-LIZ molecular weight through the program GeneMapper® (Applied Biosystems Inc.).

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed with software SPSS (version 19.0). We performed the ROC curve to determine the cutoff length of alleles of the polymorphism under study, dichotomized into short (\leq 285 bp) and long ($>$ 285 bp) being subdivided into subjects with "long" (allele $>$ 285 bp), "short" (\leq 285 bp allele), "long/long" (containing two alleles with length $>$ 285 bp) "long/short" (alleles $>$ 285 bp and \leq 285 bp) and "short/short" (containing two alleles with length \leq 285 bp) genotypes. The association of different genotypes of the polymorphism with cancer and control groups was performed by chi-square. Binary logistic regression adjusted for age was applied to estimate the odds ratio (OR) with 95% confidence interval for the association between different genotypes of the polymorphism and the risk of developing prostate cancer. The associations between polymorphism and risk factors were also calculated by chi-square. We performed linear correlation between the different clinical variables analyzed.

RESULTS

Characterization of Samples

A total of 169 individuals with PCa and 161 controls met all criteria and were included in the study. The mean age was 63 ± 6 and 60 ± 7 years in the case and control groups, respectively. The median total testosterone was 3.9 (3.3-5.2) for the cancer group and 4.2 (3.3-5.5) for the control group. Mean free testosterone was 8.0 ± 2.8 and 8.2 ± 3.05 for cases and controls, respectively; serum PSA was 9.5 (5.21-17.30) and 2.76 (0.92-4.57) for cases and controls, respectively. Total PSA levels were significantly higher in the cancer group compared with the control group ($p < 0.05$). Cases and controls did not differ significantly regarding age, race, family history, total and free testosterone and BMI ($p > 0.05$). However, when the data were correlated, we found a negative correlation of BMI in relation to the levels of total and free testosterone, of -3.15 ($p = 0.01$) and -2.33 ($p = 0.023$), respectively (Table 1).

HSD3B2 Polymorphism

A total of 36 alleles with sizes varying from 267 pb to 361 pb were genotyped in our study. The most frequent allele measured 285 pb, representing 36.4% of all genotyped alleles, followed by alleles 288 pb and 337 pb, representing 17.3% and 15.4%, respectively. Figure 1 shows the distribution of polymorphism according to race. The dichotomization of the sizes of the alleles from 285 bp cutoff resulted in the formation of groups with long, short, long/long, long/short and short/short genotypes. By correlating the different genotypes with the cancer and control groups, no significant difference was evidenced in its presentation, as well as in relation to the risk of developing prostate cancer. There was no significant difference between the different genotypes in relation to cancer and control group on risk analysis for the

development of prostate cancer by binary logistic regression adjusted for age (Table 2).

There was no significant statistic difference when correlating the total PSA serum level and total and free testosterone in relation to different genotypes (Table 3).

DISCUSSION

The variation in incidence and mortality caused by prostate cancer in different regions of the world suggests that their origin is multifactorial and polygenic. The molecular events involved in neoplastic initiation and development of PCa is still poorly understood (15).

Our aim was to elucidate the potential effect of the polymorphism of the complex dinucleotide repeats (TG)*n*(TA)*n*(CA)*n* present in the third intron of HSD3B2 gene in relation to the risk of development of PCa. Due to the presence of different sized alleles of the polymorphism, the analysis was simplified by means of the subdivision into short (≤ 285 bp) and long (> 285 bp) alleles.

In our study we analyzed both races together because they have a similar frequency distribution between cases and controls. A significant association in relation to the polymorphism and the risk of PCa development was not observed when the genotypes were correlated in the study population.

The 285 pb sized allele was the most frequent in all groups. Devgan *et al.* (1997), examined the distribution of the repeats polymorphism HSD3B2 showing that there is a high risk among African descendents, intermediary risk among Europeans descendents and low risk among Asian descendents. A total of 25 different alleles

were identified. Allele 289 bp was the most frequent for all population groups. The high frequency of these alleles may be associated to the increased risk of PCa when compared to control cases in different racial/ethnic groups (7).

A recent study carried out by Neslund-Dudas *et al.* (2007) shows that the polymorphism repeats in Caucasians is associated to an increased risk of PCa, as well as to the aggressiveness of this tumor (16). In this study the alleles were dichotomized into long (≥ 283 pb) and short (< 283 pb), showing that the short allele is related to the increased risk of developing PCa. Besides, the most frequent allele was the 283 pb representing 35.3% of studied samples. The authors suggest that the presence of short alleles may predispose the individual to an altered protein, making the HSD3B2 more active, indirectly producing larger amounts of testosterone and degrading DHT more quickly. This results in an imbalance on testosterone and DHT levels (17-19). However, it has been shown that in primary PCa cells compared with adjacent normal prostate tissue, DHT levels are higher in cancerous tissue (20).

Although little is known about the etiology of PCa, evidence suggests the combination of genetic and environmental factors influence the initiation and progression of the tumor (21-22). Age, ethnicity and family history are factors that substantially influence the risk of developing PCa. Factors related to diet and hormone metabolism also contribute to prostate carcinogenesis (23-24). However, when comparing the family history as a risk factor in the study population we did not find a statistically significant difference between cancer and control groups.

In addition, other studies have focused on the research of polymorphisms in the HSD3B2 gene as a path to understanding the molecular role of PCa. Chang *et al.* (2002), sequenced the promoter region, exons and exon-intron junctions, and 3'-

untranslated region of both genes, HSD3B1 and HSD3B2, identifying four informative SNPs that do not change amino acids. It was evidenced that men with genotypes in each B1 N367T or c7519g-B2 variant had a relative risk (RR) of 1.76 (95% CI: 1.21–2.57, $p=0.003$) for PCa, compared with men who were homozygous wild-type, in both genes. The risk of hereditary PCa was stronger with RR of 2.17 (95% CI: 1.29–3.65, $p=0.003$). Therefore, SNPs present in genes HSD3B1 and HSD3B2 seem to increase the risk, especially for cases of hereditary PCa (11). However, until now no study has confirmed this evidence.

Another study genotyped 14 SNPs in 488 prostate cancer cases and 617 controls, in genes involved in the hormonal regulation or metabolism, including gene HSD3B2. This study demonstrated a nonsignificant association with the studied polymorphisms, except for SHBG D356N heterozygotes (25).

The gene expression profile of 33 samples of metastatic androgen-dependent PCa, from bone marrow biopsies were examined by microarray (26). They found an increased expression of the gene HSD3B2, along with a number of genes involved in the synthesis and catabolism of androgens in androgen-dependent PCa. The authors suggested that increased expression of the gene HSD3B2 would increase the levels of intracellular androstenedione, generating a substrate for conversion into testosterone. This observation indicates that upregulation of HSD3B2 in combination with other genes related to androgens may be a mechanism to increase intracellular levels of androgens in androgen-independent PCa.

A negative correlation between levels of BMI and total and free testosterone was observed from the results. Some studies corroborate our observations, indicating that total testosterone levels decline with increase of BMI (27). This may occur partly because of SHBG is decreased; however, free testosterone levels (not bound to

SHBG), are also decreased, especially in individuals with high BMI. No statistical difference was found when the BMI was compared in different groups, similar to other findings (28).

The heritability of a malignancy is estimated between 5 to 10% of all human cancers. Therefore, about 90% of the cases correspond to the sporadic form of the disease resulting from the association between environmental factors and variables that define a genetic susceptibility to tumor development (29).

In our study we found no association between the studied polymorphism and the risk of PCa development, although two other studies have suggested an association. This result may be due to the polymorphism's need of other genetic or environmental factors to exert an increase on neoplasm risk. Moreover, there is a large genetic heterogeneity in the studied population, which may also influence genetic analyses. It should be noted that we consider that our sample was adequate to identify the really significant differences between groups, with adequate statistical power for this proposal.

Thus, further studies involving repeats polymorphism of gene HSD3B2 and other polymorphisms that are associated with androgen pathway are needed in order to characterize the risk groups for the development of prostate cancer.

Acknowledgements

We thank Fund of Incentive to Research and Events of Hospital de Clínicas of Porto Alegre and Laboratory of Endocrine and Tumor Molecular Biology of Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Table 1: Characteristics of Samples

Characteristics	PCa	Control
Age (years) ^a	63 ± 6	60 ± 7
Race ^c		
Caucasians	103(74%)	131(80%)
Afro-descendants	36(26%)	33(20%)
Family History	22 (13%)	22 (12.4%)
Total Testosterone ^b	3.9 (3.3-5.2)	3.89 (3.08-5.46)
Free Testosterone ^a	8.11 ± 2.8	8.4 ± 3.09
PSA*	9.5 (5.21-17.30)	2.76 (0.92-4.57)
BMI ^a	25.69 ± 0.52	26.9 ± 0.49

^a values given as mean ± standard deviation; ^b values given as median data (percentile 25-75); ^c the difference of n in relation to polymorphism is related to the cases in which the race was not declared by the patient; * p < 0.05.

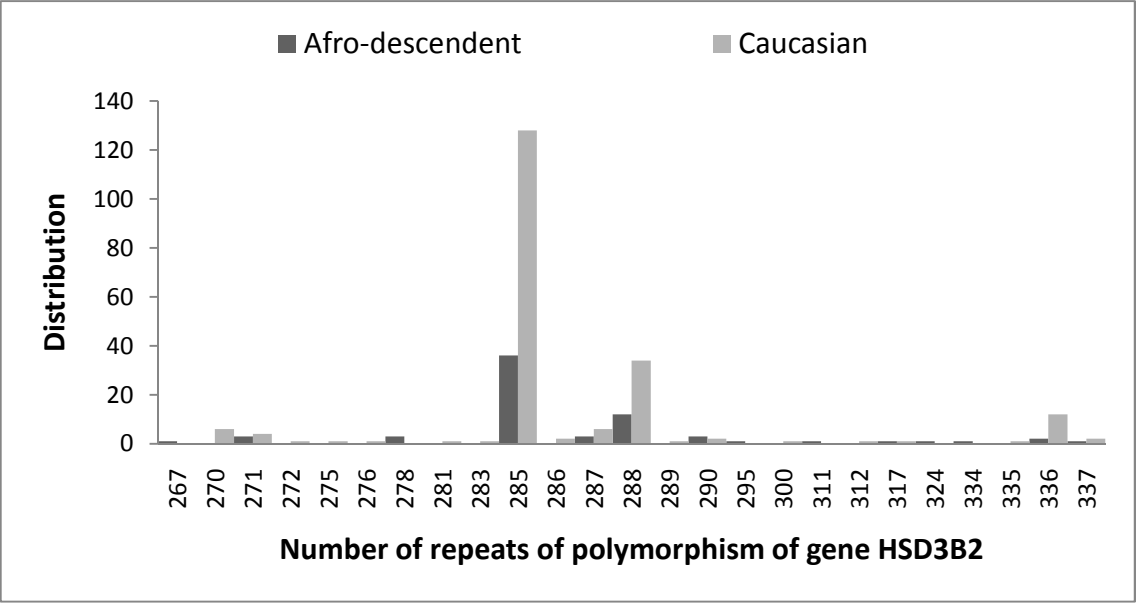
Table 2: Association between genotypes of the HSD3B2 gene polymorphism and the Risk for Prostate Cancer

Genotype HSD3B2	Cancer n (%)	Control n (%)	^aOR (CI)	<i>P</i>
Homozygotes	47 (28)	20 (19)		
Heterozygotes	123 (72)	84 (81)	0.801 (0.500-1.283)	0.356
Total	170 (100)	104 ()		
Long/Short	74 (87)	67 (88)		
Short/Short	11 (13)	9 (12)	0.904 (0.353-2.315)	0.833
Total	85 (100)	76 (100)		
Long/Long	37 (33)	33 (33)		
Long/Short	74 (67)	67 (67)	1.015 (0.572-1.802)	0.959
Total	111 (100)	100 (100)		
Long/Long	37 (77)	33 (79)		
Short/Short	11 (23)	9 (21)	0.917 (0.338-2.489)	0.865
Total	48 (100)	42 (100)		
Long	24 (45)	19 (36)		
Short	29 (55)	33 (64)	1.437 (0.658-3.141)	0.362
Total	53 (100)	52 (100)		
Long	24 (39)	19 (36)		
Long/Long	37 (61)	33 (64)	1.127 (0.525-2.417)	0.759
Total	61 (100)	52 (100)		
Long	24 (24)	19 (36)		
Long/Short	74 (76)	67 (64)	1.144 (0.576-2.273)	0.701

Total	98 (100)	52 (100)		
Long	24 (69)	19 (68)		
Short/Short	11 (31)	9 (32)	1.033 (0.356-3.004)	0.952
Total	35 (100)	28 (100)		
Short	29 (44)	33 (50)		
Long/Long	37 (56)	33 (50)	0.784 (0.395-1.555)	0.485
Total	66 (100)	66 (100)		
Short	29 (28)	33 (33)		
Long/Short	74 (72)	67 (67)	0.796 (0.437-1.448)	0.454
Total	103 (100)	100 (100)		
Short	29 (72)	33 (78)		
Short/Short	11 (27)	9 (22)	0.719 (0.261-1.979)	0.522
Total	40 (100)	42 (100)		

^a Odds Ratios adjusted by age; CI = 95%

Figure 1. Polymorphism distribution according to race



References

1. Kesarwani P, Ahirwar DK, Mandhani A, Mittal RD. Association between -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and progression of prostate cancer in North Indian population. *DNA Cell Biol* 2008;27(9):505-510.
2. Silva Neto B, Koff WJ, Biolchi V, Brenner C, Biolo KD, Spritzer PM, Brum IS. Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest* 2008;26(1):74-80.
3. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003;361(9360):859-864.
4. AC S. *Cancer Facts and Figures 2010*: Atlanta; 2010.
5. INCA. *Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2010*. 2010.
6. Coughlin SS, Hall IJ. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Ann Epidemiol* 2002;12(3):182-196.
7. Devgan SA, Henderson BE, Yu MC, Shi CY, Pike MC, Ross RK, Reichardt JK. Genetic variation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in three racial/ethnic groups: implications for prostate cancer risk. *Prostate* 1997;33(1):9-12.
8. Lachance Y, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Dumont M, de Launoit Y, Guerin S, Leblanc G, Labrie F. Characterization of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase gene and its expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992;267(5):3551.

9. Olsson M, Ekstrom L, Guillemette C, Belanger A, Rane A, Gustafsson O. Correlation between circulatory, local prostatic, and intra-prostatic androgen levels. *Prostate* 2010.
10. Verreault H, Dufort I, Simard J, Labrie F, Luu-The V. Dinucleotide repeat polymorphisms in the HSD3B2 gene. *Hum Mol Genet* 1994;3(2):384.
11. Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J. Joint effect of HSD3B1 and HSD3B2 genes is associated with hereditary and sporadic prostate cancer susceptibility. *Cancer Res* 2002;62(6):1784-1789.
12. Ozen M, Hopwood VL, Balbay MD, Johnston DA, Babaian RJ, Logothetis CJ, von Eschenbach AC, Pathak S. Correlation of non-random chromosomal aberrations in lymphocytes of prostate cancer patients with specific clinical parameters. *Int J Oncol* 2000;17(1):113-117.
13. Slager SL, Zarfes KE, Brown WM, Lange EM, McDonnell SK, Wojno KJ, Cooney KA. Genome-wide linkage scan for prostate cancer aggressiveness loci using families from the University of Michigan Prostate Cancer Genetics Project. *Prostate* 2006;66(2):173-179.
14. Xu J, Zheng SL, Chang B, Smith JR, Carpten JD, Stine OC, Isaacs SD, Wiley KE, Henning L, Ewing C, Bujnovszky P, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB. Linkage of prostate cancer susceptibility loci to chromosome 1. *Hum Genet* 2001;108(4):335-345.
15. Kesarwani P, Mandal RK, Maheshwari R, Mittal RD. Influence of caspases 8 and 9 gene promoter polymorphism on prostate cancer susceptibility and early development of hormone refractory prostate cancer. *BJU Int* 2010.

16. Neslund-Dudas C, Bock CH, Monaghan K, Nock NL, Yang JJ, Rundle A, Tang D, Rybicki BA. SRD5A2 and HSD3B2 polymorphisms are associated with prostate cancer risk and aggressiveness. *Prostate* 2007;67(15):1654-1663.
17. Comstock GW, Gordon GB, Hsing AW. The relationship of serum dehydroepiandrosterone and its sulfate to subsequent cancer of the prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993;2(3):219-221.
18. Dorgan JF, Albanes D, Virtamo J, Heinonen OP, Chandler DW, Galmarini M, McShane LM, Barrett MJ, Tangrea J, Taylor PR. Relationships of serum androgens and estrogens to prostate cancer risk: results from a prospective study in Finland. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7(12):1069-1074.
19. Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ. Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(16):1118-1126.
20. Ji Q, Chang L, Stanczyk FZ, Ookhtens M, Sherrod A, Stolz A. Impaired dihydrotestosterone catabolism in human prostate cancer: critical role of AKR1C2 as a pre-receptor regulator of androgen receptor signaling. *Cancer Res* 2007;67(3):1361-1369.
21. dos Santos RM, de Jesus CM, Trindade Filho JC, Trindade JC, de Camargo JL, Rainho CA, Rogatto SR. PSA and androgen-related gene (AR, CYP17, and CYP19) polymorphisms and the risk of adenocarcinoma at prostate biopsy. *DNA Cell Biol* 2008;27(9):497-503.
22. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003;349(4):366-381.
23. Lima MM, Jr., Oliveira MN, Granja F, Trindade AC, De Castro Santos LE, Ward LS. Lack of association of GSTT1, GSTM1, GSTO1, GSTP1 and

- CYP1A1 polymorphisms for susceptibility and outcome in Brazilian prostate cancer patients. *Folia Biol (Praha)* 2008;54(3):102-108.
24. Zeegers MP, Kiemeneij LA, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(11 Pt 1):1765-1771.
 25. Berndt SI, Chatterjee N, Huang WY, Chanock SJ, Welch R, Crawford ED, Hayes RB. Variant in sex hormone-binding globulin gene and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(1):165-168.
 26. Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM, Febbo PG, Balk SP. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(5):2815-2825.
 27. Zumoff B, Strain GW, Miller LK, Rosner W, Senie R, Seres DS, Rosenfeld RS. Plasma free and non-sex-hormone-binding-globulin-bound testosterone are decreased in obese men in proportion to their degree of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71(4):929-931.
 28. Visvanathan K, Helzlsouer KJ, Boorman DW, Strickland PT, Hoffman SC, Comstock GW, O'Brien TG, Guo Y. Association among an ornithine decarboxylase polymorphism, androgen receptor gene (CAG) repeat length and prostate cancer risk. *J Urol* 2004;171(2 Pt 1):652-655.
 29. Yuspa SH. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis* 2000;21(3):341-344.

7 CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Não há correlação entre o número de repetições do polimorfismo do complexo de repetições (TG) n (TA) n (CA) n do gene HSD3B2 e o risco de câncer de próstata na amostra estudada;
- Não houve correlação em relação aos fatores clínicos e o câncer de próstata, bem como em relação ao número de repetições do polimorfismo estudado;
- Não foi evidenciada diferença significativa em relação aos níveis de testosterona total e livre no grupo câncer e controle, assim como em comparação com o número de repetições do polimorfismo.
- Foi verificado um aumento significativo dos níveis de PSA no grupo câncer quando comparado com o grupo controle.

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver câncer na próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr. tem/teve câncer de próstata, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso (10 mL de sangue) na ocasião de sua entrada no estudo. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 1 polimorfismo em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata, que pode estar associado ao desenvolvimento de câncer de próstata e à forma com que ele se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver câncer de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

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

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

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são Dr. Tiago Oselame Fontanive, Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva e Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 51 2101-8286, 51 9392-0723), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável: _____

Nome

Assinatura

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver câncer na próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Para sabermos quais polimorfismos estão associados a esta doença, precisamos conhecer sua frequência em pessoas saudáveis para podermos comparar com os pacientes. Através das perguntas que lhe fizemos, do exame de PSA e de toque retal, consideramos que você tem baixa probabilidade de ter câncer na próstata, podendo fazer parte do estudo para a comparação. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso (10 mL de sangue). Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 1 polimorfismo em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata, que podem estar associados ao desenvolvimento do câncer e à forma como ele se apresenta. Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação precoce de pacientes sob risco de desenvolver câncer na próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o Sr.

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

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

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são Dr. Tiago Oselame Ferraz, Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva e Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 51 2101-8286, 93920723), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

Local e data

Paciente ou responsável: _____

Nome

Assinatura

ANEXO III

Fichas Casos / Controle

Nome:

Idade:

Prontuário:

Raça:

Naturalidade:

Procedência:

PSA:

Toque Retal:

Histórico Familiar: () Sim () Não

Peso e Altura:

Atividade Física: () Sim () Não

Observações: