

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA MÉDICA

DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DO
RECEPTOR DE ANDRÓGENOS E DA 5- α REDUTASE TIPO II
RELACIONADOS AO CÂNCER DE PRÓSTATA EM UMA AMOSTRA DA
POPULAÇÃO MASCULINA DO ESTADO DE SÃO PAULO.

MARCELO LIMA RIBEIRO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CHRISTINE HACKEL

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas do aluno **Marcelo Lima Ribeiro**.

Campinas, 12 de ~~Julho~~ de 2001.

Profa. Dra. Christine Hackel
Orientadora

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
(UNICAMP) PARA A OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS
MÉDICAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS.

CAMPINAS
2001



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
R354d
 V. 16 E. 399
 TOMBO BC/ 46399
 PROC. 16.392101
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 15/09/01
 N.º CPD

CM00159821-8

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

R354d

Ribeiro, Marcelo Lima

Distribuição dos polimorfismos dos genes do receptor de andrógenos e da 5- α Redutase tipo II relacionados ao câncer de próstata em uma amostra da população masculina do estado de São Paulo / Marcelo Lima Ribeiro. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Christine Hackel

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. DNA. 2. Polimorfismos (Genética) - Brasil. I. Christine Hackel. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Christine Hackel

Membros:

1. Profe. Dr. Ana Beatriz Alvarez Perez
2. Profe. Dr. Edilson Sartoreto
3. Profe. Dr. Christine Hackel

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 12/07/01

55867006

DEDICATÓRIA

*Aos meus Pais e à minha família,
por todo amor, carinho e apoio,
dedico este trabalho*

O importante é isto:
Estar pronto para, a
qualquer momento,
sacrificar o que somos
pelo o que podemos vir a ser.

Charles Du Bois

*Comece tudo que você
possa fazer ou sonhar
poder. A ousadia tem
dentro de si genialidade,
poder e magia.*

Goethe

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais por toda amizade, incentivo, amor, confiança.... e tudo mais que possibilitou meu crescimento pessoal e profissional

Aos meus irmãos Henrique, Flavia e Paula pela paciência e amizade durante esses anos...

Aos meus avós Afrânio, Izaura e Dirce pelo carinho e amor...

À Chris, por me ensinar "os primeiros passos" no meio científico, pela confiança em meu trabalho, e por todas as oportunidades ao longo desses anos...

Aos meus tios Rodolfo, Jandira, Cíntia, Renato, Dilma, Paulo e Salete, e primos Jû, Rafa Patrícia, Carolina e Fernando, agradeço o companheirismo

Aos membros da banca examinadora Dra Ana Beatriz Alvarez Perez e Dra Edi Lúcia Sartorato pela colaboração e sugestões no trabalho

À Fernanda pelas divertidas conversas, por sua agradável companhia, sua alegria contagiante (exceto nas segundas) e finalmente por todo seu amor e carinho durante esses últimos meses....

À Madã pela amizade, carinho, pelas horas de descontração, e pela grande ajuda na extração de DNA, lhe sou eternamente grato...

Ao meu Grande amigo Lúcio pelos valiosos artigos, pelas intermináveis e hilárias conversas no ICQ e pelo auxílio em parte da metodologia deste trabalho

Aos grandes atletas da sinuca e do pebolin Andrey (gnominho), André (KB), Osmar (Slot) pela amizade, pelas besteiras.... Andrey, valeu pelo LapTop e pela sociedade na M&A Design!!

À galera do lab Camila, Helo, Frau, Eliana, Marcela, Jû, Junia, Ericka, Lucy, Fer2, Eduardo, Raquel, Ed, Jair, Mit pela amizade, e pelos momentos de descontração; gostaria também de agradecer minhas companheiras de coleta de sangue Bel e Dani

Às Dras Maricilda e Edi por toda ajuda nesses anos de CBMEG

À Dra Andréa e Dr Mesquita pelo DNA dos doadores de sangue e pacientes utilizados no presente estudo

Aos funcionários do Hemocentro-Unicamp pelo acesso e por toda ajuda com os doadores de sangue

À Sandra, Tânia, Fabiana e Patrícia por todo apoio logístico

Aos doadores de sangue e pacientes incluídos neste trabalho

À FAPESP pelo apoio financeiro

Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras Tabelas e Gráficos.....	iv
Resumo.....	vii
I. Introdução.....	1
1. A Próstata.....	2
1.1. Características Gerais.....	2
1.2. Regulação Hormonal da Próstata.....	5
2. Epidemiologia do Câncer de Próstata.....	7
2.1. Fatores de Risco.....	8
2.1.1. Hereditários.....	8
2.1.2 O Fumo, o Álcool e Fatores Ocupacionais.....	9
2.1.3. Dieta.....	10
2.1.4. Vasectomia, Atividade Sexual e Física.....	12
2.1.5. Hormônios.....	13
3. Regulação Hormonal da Próstata.....	16
3.1. O Gene <i>AR</i>	17
3.2. O Gene <i>SRD5A2</i>	23
3.3. O Gene <i>CYP17</i>	26
3.4. O Gene <i>HSD3B2</i>	27
3.5. Outros Genes Envolvidos.....	28
3.5.1. O Gene <i>VRD</i>	28
3.5.2. O Gene <i>PSA</i>	29
3.5.3. O Gene <i>HPC2/ELAC2</i>	30
II. Objetivos.....	31
III. Material e Métodos.....	33
1. Casuística.....	34
2. Métodos.....	35
2.1. Extração de DNA.....	35
2.2. Análise dos Polimorfismos do Éxon 1 do gene <i>AR</i>	36

2.2.1. Repetições CAG.....	36
2.2.2. Repetições GGN.....	38
2.2.3. Polimorfismo S1/S2.....	39
2.3. Análise dos Polimorfismos do Gene SRD5A2.....	40
2.3.1. Polimorfismo Val89Leu.....	40
2.3.2. Polimorfismo Ala49Thr.....	40
3. Análise dos Dados.....	44
IV. Resultados.....	45
1. Análise das Populações de Doadores.....	46
1.1. Polimorfismos do Gene AR.....	46
1.1.1. Repetições CAG.....	46
1.1.2. Repetições GGN.....	48
1.1.3. Polimorfismo S1/S2.....	50
1.1.4. Análise dos Haplótipos mais Frequentes.....	51
1.2. Polimorfismos do Gene SRD5A2.....	52
1.2.1. Polimorfismo Val89Leu.....	52
1.2.2. Polimorfismo Ala49Thr.....	54
2. O Risco de Câncer de Próstata.....	55
2.1. Gene AR.....	55
2.1.1. Poliglutaminas.....	55
2.1.2. Poliglicinas.....	56
2.1.3. Polimorfismo S1/S2.....	58
2.1.4. Análise de Haplótipos em Pacientes com Câncer de Próstata.....	59
2.1.5. Análise do Risco Relativo para os Três Polimorfismos.....	59
2.2. Gene SRD5A2.....	60
V. Discussão.....	61
1. Aspectos Étnicos e Populacionais.....	62
2. Polimorfismos Genéticos.....	67
2.1. O Receptor de Andrógenos.....	67

2.2. A 5 α -Redutase Tipo II.....	70
VI. Conclusões.....	72
VII. Summary.....	75
VIII. Referências bibliográficas.....	77
IX. Anexos.....	103
1. Parecer do Comitê de ética.....	104
2. Artigo submetido ao <i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>	107

°C – grau Celsius

χ^2 – Qui Quadrado

μCi - microCurie

μg - micrograma

μl - microlitro

μM - micromolar

AAG – androstenediol glucoronideo

Ala – alanina

AR – gene do receptor de andrógenos

ARE – elemento responsivo aos andrógenos

ASOH – *Allelic Specific Oligonucleotide Hybridization*

BSA – soro albumina bovina

CAG – poliglutaminas

Ci - Curie

CYP11A – Gene do citocromo P450, subfamília XIa

CYP17 – Gene do citocromo P450, subfamília XVII

DHT – di-hidrotestosterona

DMSO – dimetilssulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs - desoxinucleotídeos

dp – desvio padrão

DTT – ditioneitol

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

g- grama

GGN – poliglicinas

HBP – hiperplasia benigna de próstata

HPC – *Hereditary Prostate Cancer*

HPC2/ELAC2 – Polycomb 2 Homolog/E. coli Homolog 2

HSD17B3 - gene 17β hidroxi-esteróide desidrogenase tipo III

HSD3B1 - gene 3β hidroxi-esteróide desidrogenase Tipo I

HSD3B2 - gene 3β hidroxi-esteróide desidrogenase Tipo II

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCA – Instituto Nacional do Câncer

l - litro

Leu – leucina

LH – hormônio luteinizante

M- molar

M- molaridade

mA- mili Ampère

mCi- milicurrie

mg- miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

min- minutos

ml- mililitro

mm- milímetro

mM- milimolar

mmol- milimol

N - normalidade

NADPH – forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NaOH – hidróxido de sódio

ng- nanograma

nm- nanômetro

nmol- nanomol

pb- pares de bases

PCR – reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pmol- picomol

PSA – antígeno prostático específico

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

rpm- rotações por minuto

RR – risco relativo

SDS- dodecilsulfato de sódio

Ser – serina

SHBG – globulina transportadora de hormônios sexuais

SRD5A1 – gene 5 α redutase tipo I

SRD5A2 – gene 5 α redutase tipo II

SSC – NaCl/citrato de sódio

ssDNA – DNA de esperma de salmão

T – testosterona

TAE – Tris/ácido acético/EDTA

Taq – DNA Polimerase de *Thermus aquaticus*

TBE – Tris/ácido bórico/EDTA

TE- Tris- EDTA

TEMED – N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina

Thr – treonina

Tris- Tris(hidroximetil)aminometano

U- unidades

V- volts

Val – valina

VDR – gene do receptor de vitamina D

Vmax – velocidade máxima

W- watts

x – Média

Figura 1 - Aparelho reprodutor masculino – Página 3.

Figura 2 - Hormônios envolvidos na regulação da próstata – Página 6.

Figura 3 - Distribuição das taxas de incidência por 100.000 homens nos estados brasileiros – Página 8.

Figura 4 - Diagrama simplificado da biosíntese de testosterona T – Testosterona; AR – Receptor de andrógenos, DHT- Di-hidrotestosterona e ARE – Elementos responsivos aos andrógenos – Página 17.

Figura 5 - Representação esquemática do gene AR – Página 18.

Figura 6 - Representação esquemática do gene AR e os polimorfismos estudados nesse trabalho – Página 19.

Figura 7- Representação esquemática do gene *SRD5A2* e os polimorfismos estudados nesse trabalho – Página 23.

Figura 8- Ciclo utilizado para a amplificação das repetições CAG – Página 36.

Figura 9 – Análise do número de repetições CAG – Página 38.

Figura 10- Ciclo utilizado para a amplificação das repetições GGC – Página 39.

Figura 11 – Padrão de restrição da enzima *Stu* I para os alelos S1 e S2 – Página 39.

Figura 12 – Padrão de restrição da enzima *Rsa* I para os alelos Val89 e Leu89 – Página 40.

Figura 13- Gel de poliacrilamida 6%; as setas indicam o número de repetições CAG, observados nas colunas 1-7 – Página 46.

Figura 14- Gel de poliacrilamida 6%; as setas indicam o número de repetições GGN, observados nas colunas 1,2,3 e 4. As letras G, A, T, C correspondem ao seqüenciamento de DNA utilizado para estimar o número de repetições – Página 48.

Figura 15- Gel de agarose 1.5%; M- marcador de peso molecular, 1 e 2- alelo S1, 3 e 4- alelo S2 – Página 50.

Figura 16- Gel de agarose 1000 3%; M- marcador de peso molecular, 1- Val/Leu, 2- Leu/Leu e 3- Val/Val – Página 52.

Figura 17- Membranas hibridizadas com as sondas ALA49 e THR49; a seta indica os controles positivos para essa substituição – Página 54.

Tabela I - Seqüência de *primers* utilizados nesse trabalho – Página 37.

Tabela II - Tempos, temperaturas e números de ciclos nas reações de PCR para os polimorfismos de restrição– Página 41.

Tabela III – Distribuição do número de repetições CAG em caucasóides e negróides de Campinas – Página 47.

Tabela IV - Distribuição do número de repetições CAG em caucasóides e negróides de São José do Rio Preto – Página 48.

Tabela V - Distribuição do número de repetições GGN em caucasóides e negróides de Campinas – Página 49.

Tabela VI - Distribuição do número de repetições GGN em caucasóides e negróides de São José do Rio Preto – Página 50.

Tabela VII - Distribuição dos genótipos S1 e S2 em caucasóides e negróides de Campinas – Página 51.

Tabela VIII - Distribuição dos genótipos S1 e S2 em caucasóides e negróides de São José do Rio Preto – Página 51.

Tabela IX - Distribuição dos haplótipos mais freqüentes para as repetições CAG e GGC e S1/S2 – Página 52.

Tabela XI - Distribuição dos genótipos Val/Val, Val/Leu e Leu/Leu em caucasóides e negróides de Campinas – Página 53.

Tabela XII - Distribuição dos genótipos Val/Val, Val/Leu e Leu/Leu em caucasóides e negróides de SJ do Rio Preto – Página 53.

Tabela XIII - Distribuição do número de repetições CAG em pacientes com câncer de próstata e em doadores – Página 55.

Tabela XIV - Distribuição do número de repetições GGN em pacientes com câncer de próstata e em doadores – Página 57.

Tabela XV - Distribuição dos genótipos S1 e S2 em pacientes com câncer de próstata e em doadores – Página 58.

Tabela XVI – Análise do risco relativo para cada polimorfismo – Página 58.

Tabela XVII - Distribuição dos haplótipos mais freqüentes para as repetições CAG e GGC e S1/S2 – Página 59.

Tabela XVIII – Análise do risco relativo para diferentes combinações dos polimorfismos do gene *AR* – Página 60.

Tabela XIX - Distribuição dos genótipos Val/Val, Val/Leu e Leu/Leu em pacientes e doadores e análise de RR – Página 60.

Tabela XX - Distribuição do número de repetições CAG e GGN em diferentes populações – Página 65.

Tabela XXI – Distribuição dos genótipos Val/Val, Val/Leu e Leu/Leu em diferentes populações – Página 65.

Gráfico 1 – Distribuição das repetições CAG em doadores e pacientes – Página 56.

Gráfico 2 – Distribuição das repetições GGN em doadores de sangue e pacientes com câncer de próstata – Página 57.

Dentre os fatores predisponentes ao câncer de próstata, existem evidências que suportam a hipótese de etiologia hormonal decorrente da ação dos andrógenos. A testosterona, sintetizada a partir do colesterol por uma série de reações envolvendo enzimas do citocromo P450, é convertida em di-hidrotestosterona (DHT) sob ação enzimática da 5 α -redutase (SRD5A2), em alguns tecidos andrógenos dependentes. A DHT liga-se ao receptor de andrógenos (AR), e o complexo DHT-AR promove a transcrição dos genes que contém elementos responsivos aos andrógenos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a distribuição de polimorfismos nos genes AR (CAG, S1/S2, GGN) e SRD5A2 (Ala49Thr, Val89Leu), de considerada relevância no estabelecimento do risco de câncer de próstata, em 200 doadores de sangue de duas cidades do estado de São Paulo e 92 pacientes com câncer de próstata, por PCR, PCR-RFLP e ASOH.

Nossos dados indicam que as frequências desses marcadores assemelham-se aos resultados observados em populações Norte Americanas e Européias. Dessa forma, pode-se concluir que os fatores genéticos relacionados ao risco de câncer de próstata, considerados relevantes na maioria das populações, também podem ser aplicados a essas populações urbanas brasileiras, onde contribuições significativas de "pools" gênicos de europeus e de africanos podem ser encontradas. Em relação aos pacientes, os resultados obtidos sugerem que o número de repetições GGN parece ser o melhor marcador molecular para o risco de câncer de próstata.

I- INTRODUÇÃO



1- A PRÓSTATA

O termo próstata deriva do grego *próstates*, que significa estar adiante, e foi utilizado pela primeira vez, por Herophilus de Alexandria em 335 A.C., para descrever uma estrutura que está localizada no abdômen, em frente à bexiga. Sua forma, geralmente, é comparada à de uma castanha, e é atravessada pela uretra (NETTO, 1999).

A próstata é responsável pela produção do líquido prostático, secreção que, juntamente com o produto das vesículas seminais e das glândulas periuretrais irá constituir o esperma, que é expelido durante a ejaculação. A maior parte do esperma é produzida pelas vesículas seminais, que juntamente com a secreção prostática totalizam 70% do esperma. A secreção da próstata contém espermina, que atua na liquefação do esperma e, além disso, o líquido prostático participa da nutrição e preservação dos espermatozóides. Apesar de sua existência ser conhecida há muito tempo, só recentemente recebeu maior atenção, por ser sede de vários processos inflamatórios, hiperplásicos e neoplásicos (BLANDY & LYTTON, 1986; NETTO, 1999).

1.1- CARACTERÍSTICAS GERAIS

A próstata está localizada na base da bexiga urinária (Figura 1) e pode ser dividida em lobos laterais, anterior, posterior e mediano. Esta divisão somente é nítida no período embrionário; no adulto, o limite entre os lobos é impreciso, pois não existem septos de tecido conjuntivo que os separe.

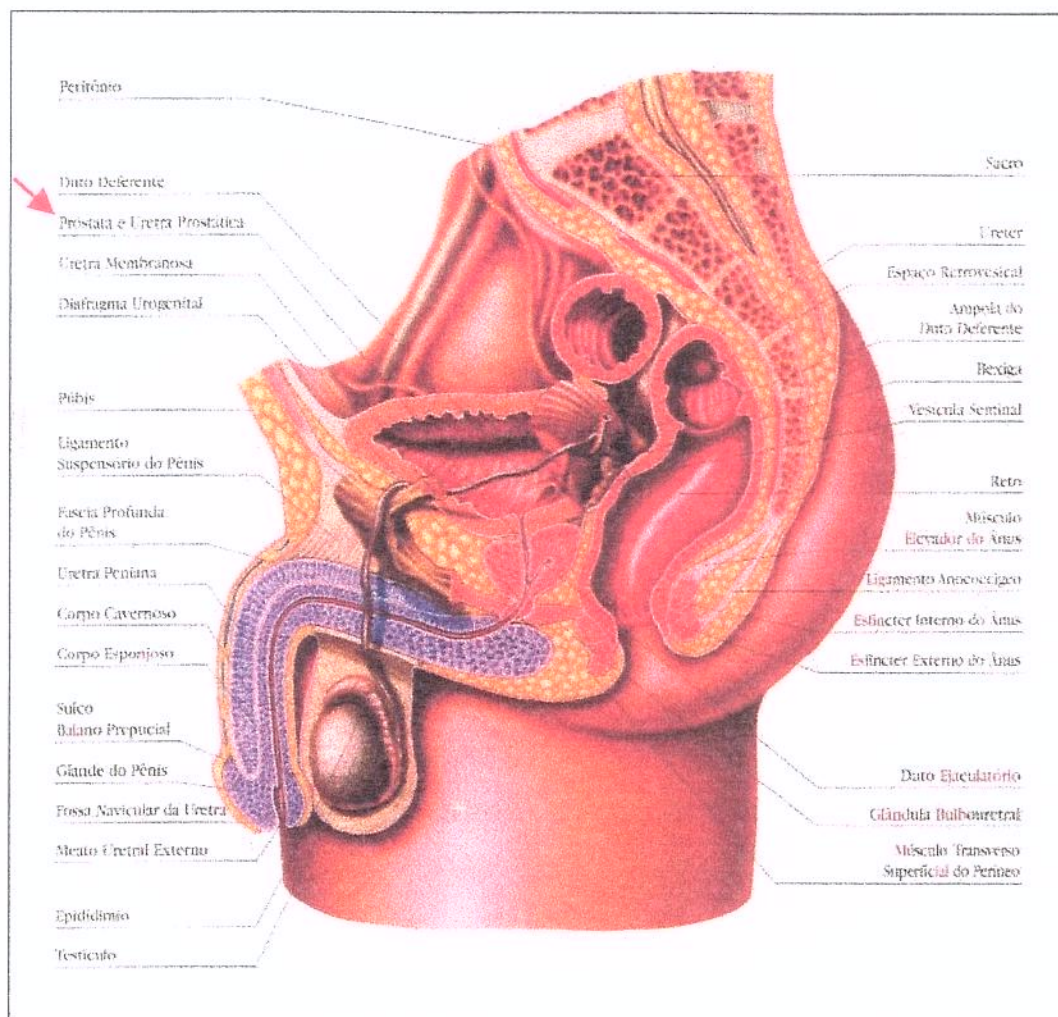


Figura 1 – Aparelho reprodutor masculino.

A uretra divide a próstata em um plano sagital, que permite identificar uma porção anterior fibromuscular e outra posterior predominantemente glandular. Na porção anterior, chamada de **zona anterior**, predomina a musculatura lisa. A porção posterior é subdividida em duas: a **zona central** e a **periférica**.

A **zona central** representa 25% do volume prostático e contém o ducto ejaculatório. É nessa região que se originam os processos inflamatórios, e aproximadamente 5 a 10% das neoplasias. A **zona periférica** corresponde a 70% do volume prostático, e está localizada na porção póstero-inferior da

glândula. Nesta zona originam-se 65 a 70% dos cânceres de próstata. Ainda é possível identificar uma **zona de transição**, compreendendo de 5 a 10% do volume total da próstata. Consiste em dois lobos laterais que envolvem a uretra em sua porção mais distal, e é o local de origem das hiperplasias benignas da próstata (KIRBY & CHRISTMAS, 1993; NETTO, 1999).

A próstata apresenta, fundamentalmente, dois tipos de tecidos: o **epitélio** - que constitui as glândulas e o **estroma** - situado entre as glândulas, cujo componente de maior importância clínica é a musculatura lisa. No jovem a proporção estroma/epitélio glandular é de 2:1, e à medida que envelhece a proporção passa para 5:1 (NETTO, 1999).

A próstata provém da diferenciação do seio urogenital aproximadamente na décima segunda semana de vida intra-uterina. Os ductos prostáticos rapidamente crescem, arborizam e canalizam por meio de estímulo da testosterona (T), secretada pelos testículos embrionários (KIRBY & CHRISTMAS, 1993).

O principal alvo da T e de seu mais ativo metabólito, a di-hidrotestosterona (DHT), é o mesênquima, que desempenha um importante papel no desenvolvimento da próstata. O epitélio glandular é oriundo da diferenciação de células endodérmicas, enquanto o mesênquima origina o estroma e as fibras musculares lisas. O tamanho final da próstata depende do grau de diferenciação das células mesenquimais sob influência da DHT.

1.2- REGULAÇÃO HORMONAL DA PRÓSTATA

No recém-nascido a próstata pesa 1g; aos 12 anos, antes da puberdade, pesa 4g; após a puberdade começa a crescer, e aos 20 anos chega a pesar 20g. Entre os 30 e 50 anos o crescimento ocorre lentamente; dos 50 aos 70 anos, contudo, é acelerado dobrando de peso a cada 4,5 anos, atingindo em média 60-70g; a partir dos 70 anos o crescimento volta a ser lento. O crescimento da próstata é contínuo e dependente de um processo regulatório complexo, com a participação dos andrógenos durante os processos de morfogênese, citodiferenciação, proliferação e produção de secreções específicas (NETTO, 1999).

Desses andrógenos, 95% correspondem à testosterona, que é sintetizada nas células de Leydig dos testículos, por estímulo do hormônio luteinizante (LH) da hipófise, que por sua vez, é regulado pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRF) do hipotálamo (Figura 2). Os 5% restantes, liberados principalmente na forma de androstenediona, são sintetizados nas adrenais sob ação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise, que é regulado pelo GnRF (PEELING & GRIFFITHS, 1986). A prolactina e o hormônio de crescimento (GH) também estimulam a produção de andrógenos tanto nos testículos como nas adrenais, tendo a primeira um efeito mitogênico sobre as células epiteliais da próstata (GALBRAITH & DUCHENSE, 1997).

No plasma, 98% da T circulante é reversivelmente ligada a várias proteínas, sendo a albumina sérica humana e a globulina transportadora de hormônios sexuais (SHBG) as mais importantes. Conseqüentemente somente 2% da T permanece livre. Esta fração, que é considerada a forma biologicamente ativa do hormônio, entra nas células prostáticas por difusão simples e é rapidamente metabolizada. Mais de 90% da T livre é irreversivelmente convertida, sob ação da 5α -redutase com o NADPH como cofator, ao mais ativo metabólito intracelular, a DHT. Esta tem grande afinidade com receptores androgênicos,

que se expressam na maioria das células prostáticas, podendo estimular a proliferação celular (KIRBY & CHRISTMAS, 1993).

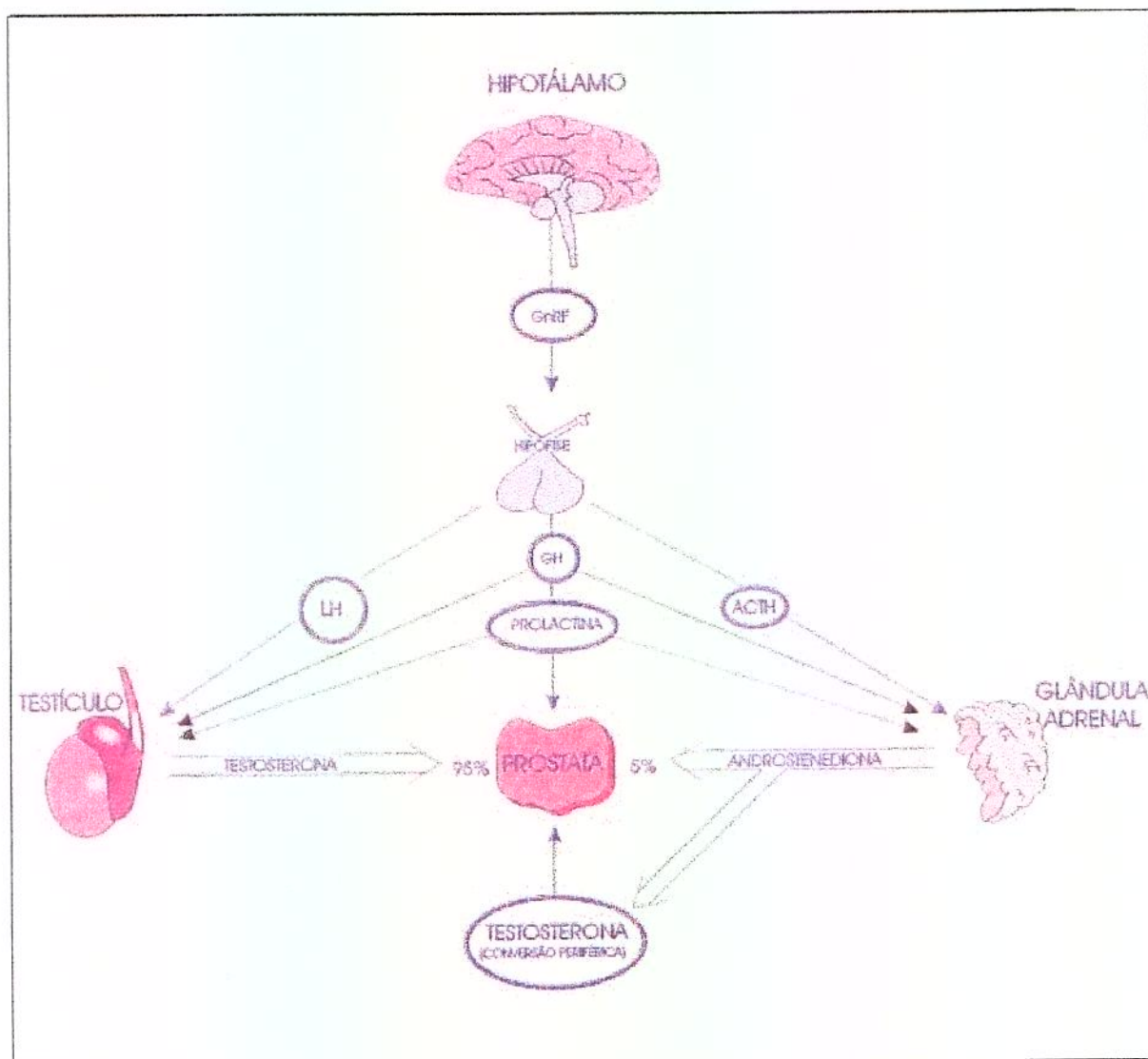


Figura 2 – Hormônios envolvidos na regulação da próstata.

Além de desempenhar um importante papel durante a diferenciação e desenvolvimento da próstata normal, os andrógenos também são responsáveis pela iniciação e manutenção da hiperplasia benigna da próstata (HBP) e do câncer prostático (GRIFFITHS, MORTON, NICHOLSON, 1997).

2- EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE PRÓSTATA

O câncer de próstata é hoje um crescente problema de saúde do homem, sendo mais comum na população masculina com faixa etária superior a 65 anos (CANARY & SOUHAMI, 1989). Para o ano 2000, estimou-se que, entre os tumores malignos, o câncer de próstata teria a terceira taxa mais elevada de mortalidade (8.34/100.000) e a primeira em incidência (18.14/100.000), sem levar em consideração os tumores de pele não melanoma. Analogamente ao que ocorre em países desenvolvidos, o aumento das taxas de mortalidade e incidência estimadas para o ano 2000, no Brasil, muito provavelmente refletem o envelhecimento da população. A Figura 3 mostra a representação espacial das taxas de incidência por 100.000 homens, estimadas para o ano 2000. Adicionalmente, especula-se que o aumento da incidência em alguns países seja devido a uma melhor identificação de casos subclínicos, facilitado pela expansão do uso do teste de PSA (**Antígeno Prostático Específico**). Por outro lado, o aumento concomitante da mortalidade sugere que o aumento da incidência não pode ser inteiramente explicado por um viés produzido pelo aumento da proporção de casos novos diagnosticados em fase mais precoce (INCA, 2000).

Os fatores de risco considerados mais importantes para o câncer de próstata são a **idade** e a **etnia**, sendo que cerca de 80% dos casos são diagnosticados em homens com mais de 65 anos. O câncer de próstata é extremamente raro antes dos 40, mas o aumento com a idade é maior do que o observado em qualquer outro tipo de câncer (ROSS *et al.*, 1998).

Nos Estados Unidos, a incidência de câncer de próstata é 3 vezes mais elevada em negros norte-americanos do que em asiáticos, e intermediária (1,5 vezes) em caucasianos (ROSS *et al.*, 1998; GREENLEE *et al.*, 2000; HABEL, VAN DEN EEDEN, FRIEDMAN, 2000). Entretanto, alguns autores observaram que

japoneses e chineses que vivem nos Estados Unidos têm uma incidência da neoplasia 40-50% superior à observada em japoneses e chineses em seus países de origem (SHIMIZU, ROSS, BERNSTEIN, 1991; PLATZ *et al.*, 2000). Isso sugere que **fatores ambientais** e/ou **genéticos** possam ter um papel fundamental na determinação do risco de câncer de próstata.

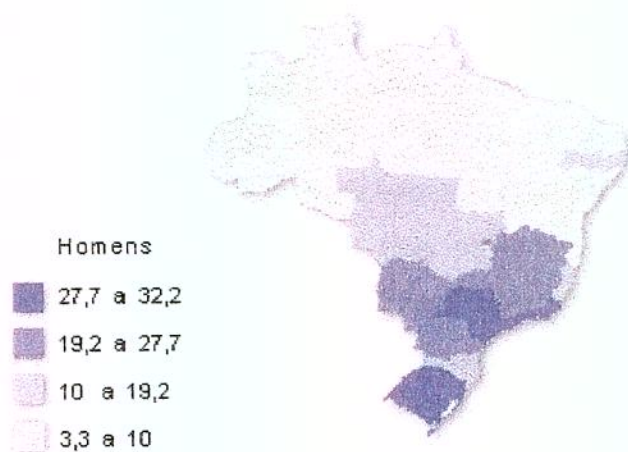


Figura 3 – Distribuição das taxas de incidência por 100.000 homens nos estados brasileiros. Fonte: <http://www.inca.org.br>

2.1- FATORES DE RISCO

2.1.1- HEREDITÁRIOS

Embora a maioria dos casos de câncer de próstata seja esporádica, estima-se que pelo menos 10% de todos os casos da doença possam ter um forte componente familiar (CARTER *et al.*, 1992; SCHAID *et al.*, 1998).

SMITH *et al.* (1996) mapearam um *locus* para o câncer de próstata hereditário, chamado HPC1, em 1q24-q25. A evidência de ligação do HPC1 foi demonstrada em famílias com mais de 5 afetados e idade precoce de diagnóstico

(GRÖNENBERG *et al.*, 1997; GRÖNENBERG *et al.*, 1999). Subseqüentemente, BERTHON *et al.* (1998) identificaram um segundo *locus* em 1q42.2-q43 (HPC2) em um estudo com famílias francesas e alemãs com câncer de próstata. No entanto outros autores não conseguiram demonstrar essa ultima associação (GIBBS *et al.*, 1999; WHITTEMORE *et al.*, 1999). Um terceiro *locus*, HPCX, mapeado em Xq27-q28 foi descrito em um estudo com 360 famílias (XU *et al.*, 1998).

Mais recentemente, um *locus* mapeado em 1p36, associado a um risco aumentado para câncer de cérebro, foi relacionado ao risco para a neoplasia da próstata em famílias com pelo menos um indivíduo afetado com câncer de cérebro (GIBBS *et al.*, 1999). Entretanto, BERRY *et al.* (2000) não obtiveram o mesmo resultado. Finalmente, SUAREZ *et al.* (2000) sugerem uma forte ligação entre o câncer de próstata familiar e a região 16q23. Subseqüentemente, PARIS *et al.* (2000) mapearam esse *locus* precisamente em 16q23.2, correspondendo, possivelmente, a um gene de supressão tumoral implicado no desenvolvimento de formas familiares ou não de câncer de próstata.

2.1.2- O FUMO, O ÁLCOOL E FATORES OCUPACIONAIS

Os resultados de estudos que relacionam o fumo ao risco de câncer de próstata fornecem dados contraditórios. Alguns autores consideram que o cigarro está associado a um risco aumentado para a doença (HSING *et al.* 1990b; HSING *et al.*, 1991). Experimentos mostram que o componente N-nitroso induz o câncer de próstata em animais de laboratório (POUR, 1983). Essa relação entre o fumo e o câncer pode ser possivelmente hormonal, pois o cigarro tem um efeito antiestrogênico, e homens fumantes possuem níveis elevados de androsterona e de testosterona, o que poderia aumentar o risco para a neoplasia (MacMAHON *et al.*, 1982; DAI *et al.*, 1988).

Por outro lado, alguns estudos de caso-controle (YU, HARRIS, WYNDER, 1988; FINCHAM *et al.*, 1990; HAYES *et al.*, 1994; SIEMIATYCKI *et al.*, 1995; LUMEY *et al.*, 1997) e de coorte não demonstraram qualquer relação entre o fumo e o risco de câncer de próstata (DOLL *et al.*, 1994). Adicionalmente, HSING *et al.* (1990) detectaram um modesto, porém significativo, risco para a doença em indivíduos que tomam mais de 5 copos de café por dia.

A grande maioria dos estudos que tentou relacionar a ingestão de álcool e o risco de câncer de próstata falhou em demonstrar esta associação (BOSLAND, 1988; LUMEY, PITTMAN, WYNDER, 1998). Entretanto HAYES *et al.* (1996) detectaram um risco elevado em indivíduos que tinham o hábito de consumir muito álcool, porém, quando esses foram retirados da amostra, nenhuma relação com a neoplasia foi observada.

Um risco aumentado para o câncer de próstata foi observado em vários estudos de fatores ocupacionais, incluindo trabalhadores das forças armadas dos Estados Unidos e de indústrias nucleares (BOSLAND, 1988; KRSTEV *et al.*, 1998). Há também evidências de que um maior risco possa estar associado a exposição à radiação ionizante, e uma fraca associação relacionada à exposição ao cádmio (BOSLAND, 1988). Por outro lado, SHIMIZU, KATO, SCHULL (1991) não detectaram qualquer risco para o câncer de próstata em sobreviventes da bomba atômica, no Japão.

2.1.3- DIETA

A associação entre a dieta e o risco de câncer de próstata tem sido extensivamente estudada. Alguns trabalhos indicam que a ingestão de grande quantidade de gordura, principalmente a saturada, representa um risco significativamente aumentado para a doença (HAYES, 1995; KOLONEL, NOMURA, COONEY, 1999). Essa relação parece ser mais evidente em negros norte-americanos do que em norte-americanos descendentes de europeus

(HAYES *et al.*, 1999). Resultados de um estudo de caso-controle sugerem que mais de 25% dos cânceres de próstata diagnosticados nos Estados Unidos podem ser atribuídos à ingestão de gordura saturada (HANKIN *et al.*, 1992). WHITTEMORE *et al.* (1995) estimaram que a ingestão de gordura pode ser responsável por 10-15% da diferença de incidência de câncer de próstata entre europeus norte-americanos e negros norte-americanos ou asiáticos.

A migração de áreas de baixo risco, como o Japão, para países de alto risco, como os Estados Unidos, aumenta consideravelmente o risco para tal doença. Essa variação pode ser devido a diferenças ambientais incluindo o modo de vida e particularmente os hábitos alimentares (BOSLAND, 1988; PLATZ *et al.*, 2000).

Alguns outros estudos detectaram um risco elevado para a doença em indivíduos que ingerem muita proteína, pouca fibra e carboidratos complexos (BOSLAND, 1988; KOLONEL, 1996). Em um trabalho com homens saudáveis, DORGAN *et al.* (1996) concluíram que a combinação de muita gordura e pouca fibra na dieta aumenta a concentração de testosterona total e de testosterona ligada a SHBG, tanto no plasma como na urina, quando comparada com uma dieta de pouca gordura e muita fibra.

Tomates e seus derivados são importantes fontes de nutrientes como vitamina C, vitamina A, folato e potássio e de alguns carotenóides, particularmente o licopeno (BEECHER, 1998). As propriedades antioxidantes do licopeno têm aumentado o interesse nos estudos do tomate como um alimento com potencial propriedade anticancerígena (DI MASCIO, KAISER, SIES 1989). O licopeno parece ser o carotenóide mais eficiente na remoção de oxigênio e radicais livres *in vitro*, fatores estes que poderiam contribuir para a carcinogênese prostática (DI MASCIO, KAISER, SIES 1989; WOODAL *et al.*, 1997).

Estudos epidemiológicos mostram que há uma forte evidência de que o consumo de tomate possa reduzir o risco de câncer de próstata, pulmão e estômago (ver em revisão GIOVANNUCCI, 1999). Em relação ao câncer de próstata GANN *et al.* (1999) e GUTTENPLAN *et al.* (2001) detectaram uma relação inversa entre a ingestão de licopeno e o risco para a doença, o que não foi observado em outros estudos (HSING *et al.*, 1990a; NOMURA *et al.*, 1997).

Por outro lado, a ingestão excessiva de vitamina A e de β -caroteno têm sido relacionada ao risco de câncer de próstata (ver revisão em BOSLAND, 1988). Postulando-se que retinóides e/ou carotenóides aumentem a carcinogênese da próstata em certas circunstâncias e em algumas populações, embora um “efeito protetor” não possa ser excluído. Os mecanismos pelos quais retinóides e/ou carotenóides inibem ou promovem a carcinogênese ainda não são conhecidos, propondo-se a mediação de receptores esteroidais (BOSLAND, 2000).

2.1.4- VASECTOMIA, ATIVIDADE SEXUAL E FÍSICA

Em relação à vasectomia os dados são contrastantes (ver revisão em BOSLAND, 2000), propondo-se três prováveis mecanismos através dos quais a vasectomia poderia aumentar o risco de câncer de próstata, a saber : **1-** elevação da circulação de andrógenos, **2-** mecanismos imunológicos envolvendo anticorpos antiesperma e **3-** redução da produção de fluído seminal (HONDA *et al.* 1988; JOHN *et al.* 1995).

BOSLAND (1988) sugere que o risco para a doença possa estar associado ao nível da atividade sexual, mas ainda não há evidências que comprovem essa relação. TSITOURAS, MARTIN, HARMAN (1982) relataram uma associação positiva entre o nível de atividade sexual e o nível de T total em homens com idade entre 60-79 anos.

Dados contraditórios também foram observados em estudos que relacionam a atividade física a um risco aumentado de câncer de próstata (GIOVANNUCCI *et al.*, 1998; BOSLAND, OAKLEY-GIRVAN, WHITTEMORE, 1999). É possível que o tipo e o tempo de atividade física influencie a concentração de andrógenos circulantes e talvez o risco para a doença. Os dados relacionados à obesidade ou um índice de massa corporal aumentado, como fatores de risco, também são conflitantes (DEMARK-WAHNEFRIED *et al.*, 1997; BOSLAND, OAKLEY, WHITTEMORE, 1999). Por outro lado, parece haver uma relação entre a massa muscular e o risco de câncer de próstata, provavelmente devido à exposição exógena ou endógena a hormônios androgênicos ou outros fatores anabólicos (SEVERSON *et al.*, 1988; LANDRY & PRIMOS, 1990). HABEL, VAN DEN EEDEN, FRIEDMAN (2000) analisaram as relações entre características corporais de homens adultos e o risco de câncer de próstata, detectando apenas uma fraca associação entre a altura, a idade de início da necessidade de barbear-se e o risco para a doença.

2.1.5- HORMÔNIOS

KRIEG, NASS, TUNN (1993) estudaram a concentração dos hormônios esteróides no estroma e epitélio da próstata em indivíduos com idades variando entre 20 e 80 anos. A concentração de di-hidrotestosterona no epitélio diminui consideravelmente com a idade, mas permanece estável no estroma, enquanto a testosterona se mantém em ambos. Esses dados sugerem que a atividade da 5 α -redutase diminui com a idade no epitélio, mas se mantém no estroma. Entretanto, a concentração de estradiol no estroma aumenta com a idade, o que não ocorre no epitélio. Essas observações sugerem que o estroma da próstata é importante para a ação e metabolismo de andrógenos e estrógenos. Então, é compreensível que com o aumento da idade aumente o risco de câncer de próstata.

Eunucos, cujos testículos foram removidos ou nunca se desenvolveram, não desenvolvem o câncer de próstata ou HBP. Além disso, a castração e a

terapia com estrógenos podem produzir um efeito paliativo contra a doença. Alguns pesquisadores, no entanto, acreditam que o risco para tal neoplasia é determinado pelo tempo de exposição do tecido prostático a elevados níveis de andrógenos (HENDERSON *et al.*, 1982).

A relação entre os andrógenos e o desenvolvimento de câncer de próstata é biologicamente plausível, pois essa doença se desenvolve em um tecido andrógeno-dependente e é geralmente sensível a andrógenos. Alguns trabalhos estudam a atividade enzimática da 5 α -redutase através da medida dos níveis séricos de um dos metabólitos diretos da DHT, a 3 α , 17 β androstenediol glucoronídeo (AAG). Observou-se que o nível desse metabólito é menor em populações asiáticas (baixo risco) do que em norte-americanos descendentes de europeus (maior risco). Sugerindo-se assim, que a atividade enzimática da 5 α -redutase seria menor nos asiáticos, e conseqüentemente reduziria a formação de DHT e a estimulação androgênica da próstata (LOOOKINGBILL *et al.*, 1991; ROSS *et al.*, 1992; GANN *et al.*, 1996). Entretanto, o mesmo não foi observado por SANTNER *et al.* (1998).

Além disso, em outros estudos, não foi possível detectar diferenças significativas nos níveis dos metabólitos da 5 α -redutase entre negros norte-americanos, que possuem um maior risco, e norte-americanos descendentes de europeus (risco intermediário). O nível de DHT circulante e as taxas de DHT/T não foram diferentes nas populações estudadas (asiáticos, negros e brancos), que diferem no risco de câncer de próstata (de JONG *et al.*, 1991; WU *et al.*, 1995; PLATZ *et al.*, 2000). Então, a relação entre a atividade enzimática da 5 α -redutase e o risco de câncer de próstata ao nível populacional ainda não está clara. Visto que menos de 10% da DHT circulante é produzida pela próstata e uma grande parte do AAG sérico é derivado de fontes não prostáticas, estes, portanto, não são bons indicadores da atividade da 5 α -redutase na próstata (HORTON, 1982; MOGHISSI, ABLAN, HORTON, 1984; HORTON, HAWKS, LOBO, 1992).

GANN *et al.* (1996) detectaram uma associação entre o risco de câncer de próstata e níveis elevados de T e androstenediona ou com a diminuição dos níveis de SHBG e estradiol em homens com mais de 61 anos. No entanto, esses dados não foram confirmados por outros autores (NOMURA *et al.*, 1988; BARRET-CONNOR *et al.*, 1990; COMSTOCK, GORDON, HSING, 1993; HSING & COMSTOCK, 1993; NOMURA *et al.*, 1996; PLATZ *et al.*, 2000).

Para ROSS *et al.* (1998) as diferentes taxas de incidência de câncer de próstata entre negros norte-americanos, caucasianos e asiáticos podem ser explicadas por diferenças na biossíntese de T por um lado e o seu metabolismo por outro. Os níveis circulantes de T e/ou T livre são significativamente maiores em negros norte-americanos do que em seus conterrâneos descendentes de europeus (ROSS *et al.*, 1986). Entretanto, em uma vasta revisão BOSLAND (2000) salienta que estudos étnico-raciais não apresentam evidências substanciais de que níveis elevados de T livre possam estar associados ao câncer de próstata.

3- REGULAÇÃO HORMONAL NA PRÓSTATA

A testosterona é sintetizada a partir do colesterol por uma série de reações enzimáticas, como podemos observar na Figura 4. Primeiramente o colesterol, sob ação enzimática da 20,22 desmolase (gene *CYP11A*) é convertido em pregnenolona. Subseqüentemente uma enzima, codificada pelo gene *CYP17*, participa de duas reações seqüenciais, sendo que primeiramente ocorre a conversão da pregnenolona para 17OH-pregnenolona (atividade 17 α -hidroxilase) que posteriormente é convertida em di-hidroepiandrosterona (atividade 17,20 liase). Esta última, sob ação da 3 β hidroxí-esteróide desidrogenase (gene *HSD3B2*) é convertida em androstenediona, que, então, origina a testosterona (atividade 17 β hidroxí-esteróide desidrogenase – gene *HSD17B3*) – ROSS *et al.*, 1999.

Inicialmente a T é difundida para as células prostáticas, onde é rapidamente convertida, sob ação enzimática da 5 α -redutase (gene *SRD5A2*), em DHT. Esta se liga com grande afinidade ao receptor de andrógenos (gene *AR*), e o complexo DHT-AR promove a transcrição dos genes que contém elementos responsivos aos andrógenos (ARE), dentre os quais se encontram o gene do PSA e genes que controlam a divisão celular (LÓPEZ-OTÍN & DIAMANDIS, 1998; ROSS *et al.*, 1998). Embora a T também possua a capacidade de ligar-se à proteína AR, seu papel parece ser secundário, pois não ocorre o desenvolvimento da glândula em homens portadores de deficiência da enzima 5 α -redutase (IMPERATO-McGINLEY *et al.*, 1992).

As enzimas 3 α e 3 β hidroxí-esteróide desidrogenases agem em conjunto para regular a concentração intracelular dos esteróides. Estes são primeiramente reduzidos (5 α -redutase) e posteriormente hidroxilados, o que reduz a afinidade de

ligação dos esteróides aos receptores intracelulares, tornando-os mais hidrofílicos e favorecendo a sua excreção. A reação da 3 β desidrogenase inativa irreversivelmente a DHT na próstata, regulando, pois, a concentração desta nas células prostáticas (REICHARDT, 1999).

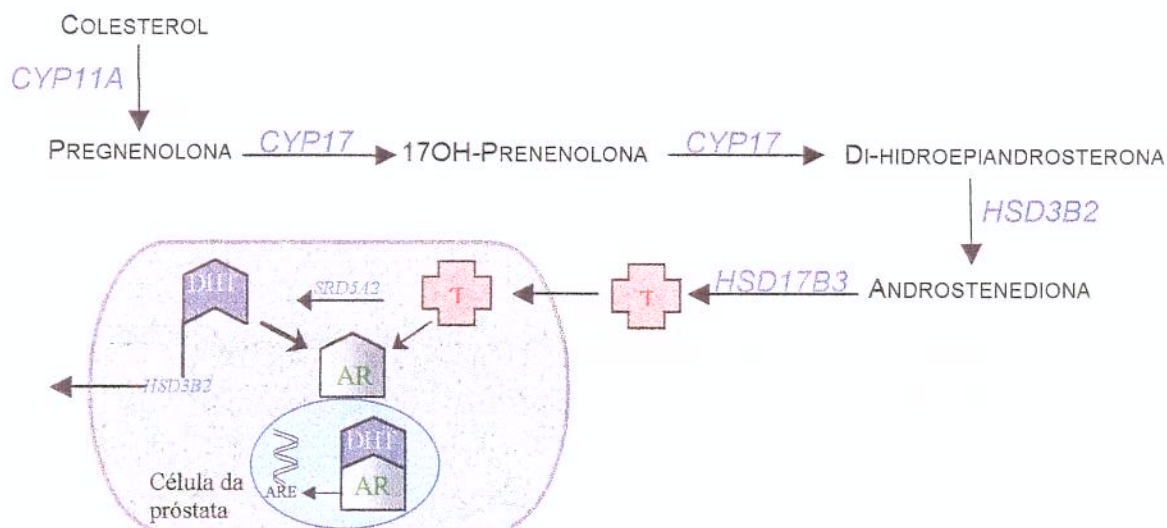


Figura 4- Diagrama simplificado da biosíntese de testosterona **T** – Testosterona; **AR** – Receptor de andrógenos, **DHT**- Di-hidrotestosterona e **ARE** – Elementos responsivos aos andrógenos.

3.1- O GENE **AR**

O gene do receptor de andrógenos, localizado no cromossomo X (Xq11-q12), está organizado em 8 éxons (Figura 5), com uma região codificadora de aproximadamente 2757 pares de bases (pb). A proteína pode ser dividida em três domínios funcionais : a região N-terminal (éxon 1), essencial para a ativação da regulação transcricional; a região central (éxons 2 e 3), que consiste de dois *zinc-fingers* responsáveis pela ligação ao DNA, sendo que o primeiro deles (éxon 2) parece conferir especificidade ao receptor e o segundo (éxon 3) auxilia na dimerização do receptor quando esse se liga ao DNA; e a região C-terminal, (éxons 4-8), responsável pela ligação aos andrógenos (LUBAHN *et al.*, 1989).

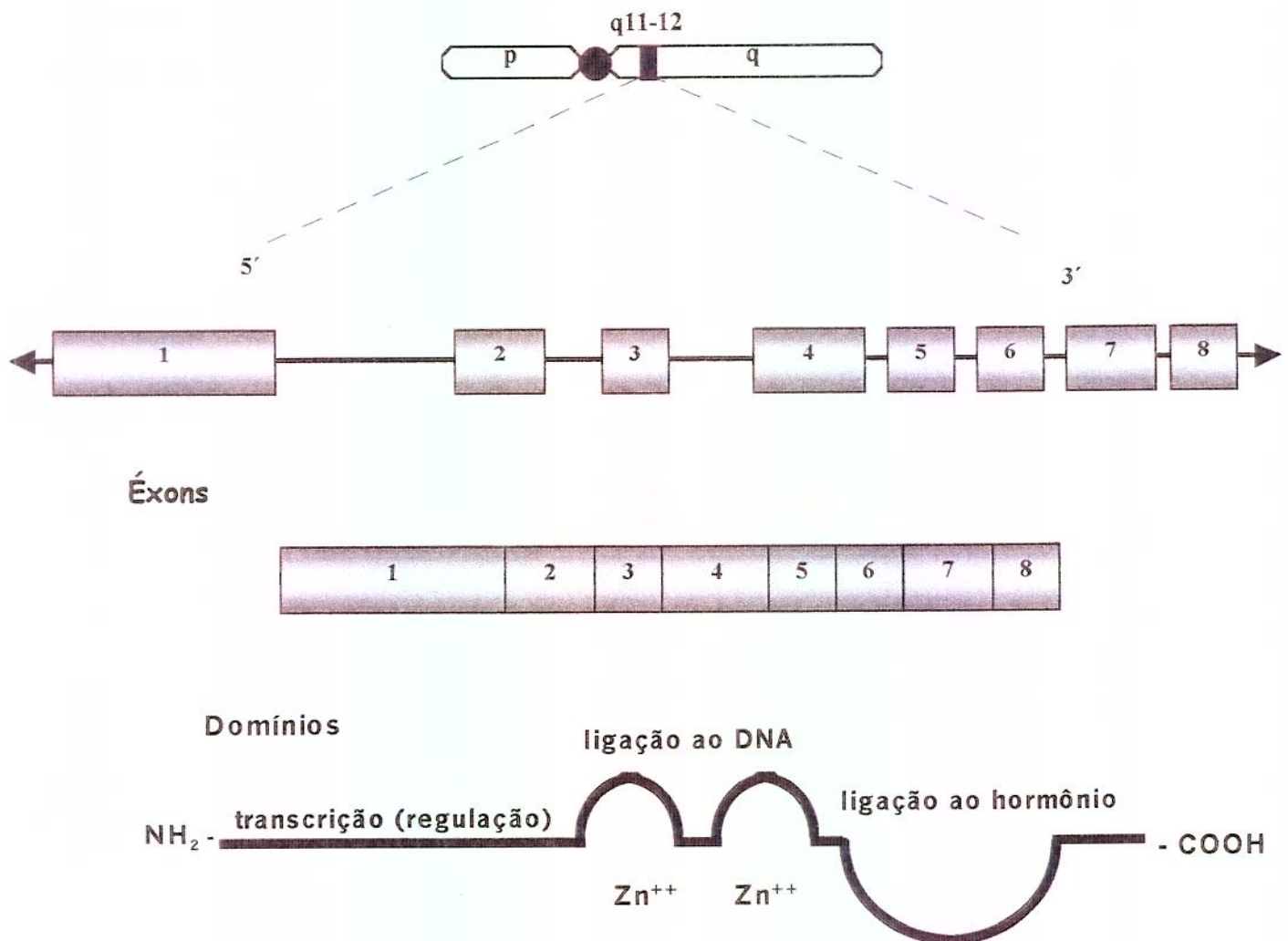


Figura 5- Representação esquemática do gene AR.

COETZEE & ROSS (1994) sugeriram que polimorfismos envolvendo dois microsatélites, localizados no éxon 1 do gene em questão, podem estar associados com o desenvolvimento do câncer de próstata (Figura 6). Esses dois microsatélites codificam repetições homopoliméricas de glutamina (CAG) e de glicina (GGN), respectivamente. O número de glutaminas pode variar entre 8 e 35 repetições, e o número de glicinas pode variar entre 10 e 30 repetições na população normal norte-americana (HSING *et al.*, 2000; IRVINE *et al.*, 1995; EDWARDS *et al.*, 1992). Em relação às repetições GGN (GGT₃GGG₁GGT₂GGC_n)

parece não haver variação no número de GGT e GGG, sendo somente variável o número de GGC (HSING *et al.*, 2000).

Um terceiro polimorfismo situado entre estes dois microsátélites (Figura 6), é originado por uma substituição de um único nucleotídeo no códon 211 (G1733A) que cria um sítio de restrição para a enzima *Stu I* (LU & DANIELSEN, 1996). O alelo S1, que não é digerido pela enzima de restrição, foi associado com um aumento estatisticamente significativo no risco de câncer de próstata em homens com idade inferior a 65 anos (ROSS *et al.*, 1999).

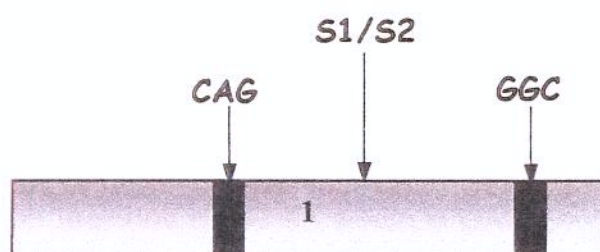


Figura 6- Representação esquemática do gene AR e os polimorfismos estudados nesse trabalho.

Análises realizadas nos Estados Unidos mostraram uma variação média do número de repetições CAG entre grupos étnico/raciais, observando-se valores médios inferiores entre negros, intermediários em caucasianos e mais elevados em asiáticos (EDWARDS *et al.*, 1992; SARTOR, ZHENG, EASTHAM, 1999; HSING *et al.*, 2000). ROSS *et al.* (1995) observaram que esses grupos étnicos tem alto, intermediário e baixo risco de câncer de próstata respectivamente, sugerindo uma possível associação entre o menor tamanho do alelo CAG e um maior risco. No entanto, PLATZ *et al.* (2000) não detectaram variação no número de repetições entre caucasianos e asiáticos.

Estudos *in vitro* feitos por CHAMBERLAIN, DRIVER, MIESFIELD (1994) mostraram que a eliminação de poliglutaminas resulta na elevação da atividade

transcricional da proteína receptora de andrógenos, sugerindo que a presença desta cadeia de aminoácidos é inibitória da função transativadora. KAZEMI-ESFARJANI, TRIFIRO, PINSKY (1995) criaram uma série de recombinantes codificando 0, 12, 20, 30, 40 e 50 glutaminas e demonstraram uma relação inversa entre o tamanho e a transativação. Desse modo, segundo IRVINE *et al.* (1995), quanto menor o número de repetições CAG, maior o nível da função transativadora do receptor, resultando em um risco maior de câncer de próstata.

KRITHIVAS *et al.* (1999) sugerem que os níveis de andrógenos podem ser modulados pelo genótipo do AR. Os dados obtidos por esses autores permitem concluir que longos trechos de glutamina diminuem a atividade do AR no hipotálamo, resultando em uma diminuição do *feedback* negativo e aumentando os níveis de andrógenos séricos. Entretanto, apesar desses níveis de andrógenos estarem associados ao número de repetições CAG, nenhuma associação foi encontrada entre as repetições CAG e níveis de LH, o principal determinante do nível sérico de andrógenos.

Segundo HARDY *et al.* (1996), existem evidências de que um menor número de repetições CAG possa estar associado com uma idade mais precoce de manifestação do tumor. STANFORD *et al.* (1997) concluíram que cada repetição CAG adicional diminui em 3% o risco de câncer de próstata, e mais recentemente HSING *et al.* (2000) estimaram um risco 7% maior para cada repetição CAG a menos, reforçando a hipótese de que o tamanho deste microsatélite é um importante fator prognóstico do risco. Em relação à hiperplasia benigna de próstata, GIOVANNUCCI *et al.* (1999) estimaram um aumento no risco de 4,3% para cada decréscimo do número de repetições. Para YU *et al.* (2000) o aumento de 5 repetições CAG poderia diminuir o risco de câncer de mama em até 30%.

Outros autores, entretanto, não observaram correlação entre o número de repetições CAG e o risco de câncer de próstata (BRATT *et al.*, 1999; EDWARDS

et al., 1999; LANGE *et al.*, 2000). Os dados de BRATT *et al.* (1999) mostram que o número de repetições CAG está direta e significativamente correlacionado com a idade de diagnóstico do câncer de próstata em casos não hereditários, observando também que pacientes com longas repetições CAG respondiam melhor à endocrinoterapia. Além disso os estudos de LANGE *et al.* (2000) não mostraram associação entre alelos curtos CAG e manifestação precoce da doença.

O número de repetições CAG, segundo alguns autores, pode ter um papel importante na progressão do câncer de próstata. Um menor número de poliglutaminas pode estar ligado a uma fase mais avançada da doença em idade precoce, maior frequência de metástases e uma maior taxa de mortalidade (GIOVANNUCCI *et al.*, 1997; HAKIMI *et al.*, 1997). Dados semelhantes foram obtidos quando o número de repetições CAG foi avaliado em relação ao risco de câncer de mama (YU *et al.*, 2000).

Alguns autores consideram que o número de repetições GGN também pode ser informativo para o prognóstico do risco para o câncer de próstata, uma vez que o número médio de repetições em negros norte-americanos é significativamente menor do que o observado em caucasianos (IRVINE *et al.*, 1995; HAKIMI *et al.*, 1997). As consequências funcionais da variação do número de repetições GGN são pouco claras. GAO, MARCELLI, MCPAUL (1996) mostraram que a deleção da região de poliglicinas reduz a atividade transcricional do AR em 30%.

Os resultados oriundos da análise das repetições GGN também são conflitantes: enquanto IRVINE *et al.* (1995) consideram que longos alelos GGN (>16) estão associados ao maior risco de câncer de próstata, outros autores observaram um risco aumentado em homens com "curtos" alelos GGN (HAKIMI *et al.*, 1997; STANFORD *et al.*, 1997). Entretanto PLATZ *et al.* (1998) especularam que 23 repetições podem representar "*the coding sequence for optimal AR protein*

conformation and activity ". Desse modo, não haveria uma relação linear entre o número de repetições GGN e o risco de câncer de próstata, mas o risco poderia diminuir com o desvio, para qualquer direção, do número médio de repetições (23), em consequência da diminuição na atividade do AR. Em um trabalho posterior, HSING *et al* (2000) detectaram um risco 12% maior em indivíduos com menos de 23 repetições GGN.

PLATZ *et al.* (1998) consideram que as repetições GGN têm provavelmente um modesto papel no câncer de próstata. Todavia, para EDWARDS *et al.* (1999) o polimorfismo GGN tem um importante valor preditivo, pois seu efeito seria mais evidente nos primeiros estágios do tumor, podendo ajudar a determinar quais pacientes necessitam de um tratamento mais agressivo.

STANFORD *et al.* (1997) não detectaram correlação entre o número de repetições CAG e o risco de câncer de próstata, mas quando foram analisados indivíduos com menos de 22 repetições CAG e menos de 16 GGN, um risco aumentado para o câncer de próstata foi observado. CORREA-CERRO *et al.* (1999) e EDWARDS *et al.* (1999), no entanto, indicam que não há associação entre o risco de câncer de próstata e o número de repetições CAG e GGN.

Devido à proximidade entre essas duas repetições no éxon 1 do gene do receptor de andrógenos, poder-se-ia esperar um desequilíbrio de ligação entre ambas. Entretanto, não foi observada nenhuma associação preferencial entre os polimorfismos CAG e GGN na população masculina estudada por MACKE *et al.* (1993). Por outro lado, IRVINE *et al.* (1995) sugerem que, nos pacientes com câncer de próstata há uma indicação de desequilíbrio de ligação entre esses dois polimorfismos. Assim, o gene AR poderia ser um determinante no risco de câncer de próstata, possivelmente por uma influência direta do número de repetições CAG e/ou GGN na função da proteína. Posteriormente, PLATZ *et al.* (1998) observaram que há um desequilíbrio de ligação nesses dois microsatélites, tanto em controles como em pacientes.

3.2- O GENE *SRD5A2*

Em relação a 5 α -redutase, duas enzimas são conhecidas: a do tipo I, codificada pelo gene *SRD5A1* e que se expressa preferencialmente no couro cabeludo, na pele e fígado; e a do tipo II, codificada pelo gene *SRD5A2*, com forte expressão no tecido genital e na próstata. Considera-se que a enzima do tipo I é responsável pela recessão temporal dos cabelos, enquanto que a do tipo II está envolvida no desenvolvimento e crescimento da próstata (WILSON, GRIFFIN, RUSSEL, 1993).

O gene *SRD5A2* está localizado no cromossomo 2 na região 2p23 (MORISSETTE *et al.*, 1996). Este gene apresenta-se dividido em 5 éxons e 4 íntrons, codificando uma proteína composta por 254 aminoácidos (Figura 7). A isoenzima codificada por esse gene exibe maior afinidade do que a do tipo I por substratos esteróides, principalmente a testosterona (RUSSEL & WILSON, 1994).

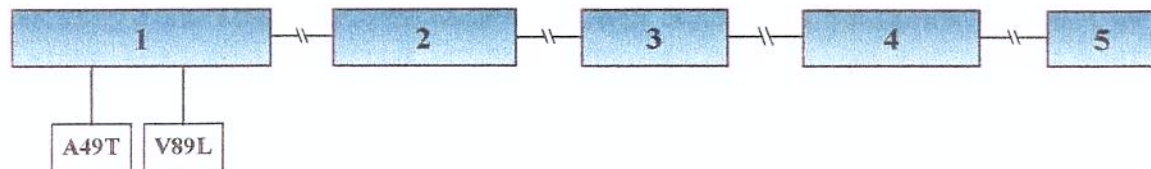


Figura 7- Representação esquemática do gene *SRD5A2* e os polimorfismos estudados nesse trabalho.

Alguns estudos dão suporte à hipótese de que a atividade da 5 α -redutase tipo II seja importante na determinação do risco de câncer de próstata. O aumento dos níveis de DHT pode, por meio da atividade enzimática da 5 α -redutase, aumentar o risco de câncer de próstata, ao passo que uma menor atividade enzimática pode conduzir a menores níveis de DHT intraprostático, reduzindo o risco para tal doença (COFFEY, 1993; GANN *et al.*, 1996;).

No primeiro trabalho em que se tentou relacionar o risco de câncer de próstata a polimorfismos no gene SRD5A2, Davis & Russel (1993) utilizaram o único marcador então descrito neste gene, o dinucleotídeo (TA)_n localizado na região 3' não traduzida. Este parecia pouco informativo, pois o alelo [(TA)₉] foi encontrado em 96% dos alelos estudados. Posteriormente, novas variantes alélicas foram detectadas em asiáticos e negros norte-americanos (REICHARDT *et al.*, 1995). Muito embora a existência de um alelo mais freqüente em negros norte-americanos com câncer de próstata tenha sido sugerida, nenhuma evidência funcional foi atribuída a esse alelo (ROSS *et al.*, 1995). Estudos complementares, realizados em diferentes grupos étnico/raciais, não detectaram qualquer relação entre as repetições (TA)_n e o risco de câncer de próstata (ROSS *et al.*, 1998).

Posteriormente, MAKRIDAKIS *et al.* (1997) demonstraram que um polimorfismo comum, a presença de valina ou leucina na posição 89 da enzima (Val89Leu), acha-se diferencialmente distribuído entre os grupos étnicos e parece ser determinante na atividade *in vivo* da 5 α -redutase (Figura 7). Segundo esses autores, os negros norte-americanos, que possuem maior risco de câncer de próstata, exibem maior freqüência do alelo que codifica para Val89. Já os norte-americanos descendentes de asiáticos, que possuem o menor risco, exibem freqüência elevada do alelo Leu89 (MAKRIDAKIS *et al.*, 1997).

Segundo MAKRIDAKIS *et al.* (1997), a variante contendo o aminoácido valina na posição 89 (Val89) exibe maior atividade enzimática do que a variante contendo o aminoácido leucina (Leu89). A variante L (Leu89) acha-se associada a baixos níveis séricos de AAG, usado como medida da atividade da 5 α -redutase. Dessa forma, esses autores consideram que o alelo Leu89 teria um efeito protetor para o câncer de próstata. FEBBO *et al.* (1999) e LUNN *et al.* (1999) não encontraram essa relação, e estes últimos ainda detectaram um maior, porém não significativo, risco associado a esse alelo. Subseqüentemente, JAFFE *et al.* (2000) não encontraram relação entre o polimorfismo Val89Leu e o risco de câncer de próstata, além de não detectarem variação étnica. Mais recentemente, NAM *et al.*

(2001), verificaram que pacientes com um alelo Val89 teriam um risco duas vezes maior para a doença e um aumento de duas vezes na progressão do câncer, quando comparados com pacientes com genótipo Leu/Leu, enquanto homozigotos Val/Val teriam um aumento de quatro vezes na progressão, não observando variações étnicas.

Outro polimorfismo no gene *SRD5A2* foi identificado em pacientes com câncer de próstata, envolvendo a substituição de alanina por treonina no códon 49 (Ala49Thr). Verificou-se que essa substituição acha-se associada a um risco significativamente aumentado para o câncer de próstata, particularmente nos casos avançados da doença, provavelmente devido à maior conversão de T para DHT (MAKRIDAKIS & REICHARDT, 1998).

Com efeito, MAKRIDAKIS, SALLE, REICHARDT, (2000) mostraram que para a variante Thr49 a conversão da testosterona é 5 vezes maior do que na enzima normal (Ala49). A caracterização bioquímica do produto contendo treonina indicou maior atividade enzimática *in vitro* e menor inibição pela finasterida, um conhecido inibidor da 5 α -redutase, utilizado no tratamento de hiperplasia benigna de próstata (MAKRIDAKIS *et al.*, 1998; MAKRIDAKIS *et al.*, 1999).

Em estudo realizado por MAKRIDAKIS *et al.* (1999), a frequência do alelo Thr49 variou entre 1 e 2,3% em controles em diferentes grupos étnicos e foi de aproximadamente 4% nos pacientes. Os resultados de JAFFE *et al.* (2000) sugerem que esse polimorfismo possa influenciar as características patológicas dos cânceres de próstata e ainda podem afetar o prognóstico, visto que o alelo Thr49 foi relacionado às formas mais invasivas da doença.

Estudos *in vitro* realizados por MAKRIDAKIS, SALLE, REICHARDT, (2000) mostraram que a atividade normal da enzima (Ala49-Val89) é de 1,9 nmol/min/mg, enquanto que o mutante Thr49 apresenta atividade enzimática aumentada ($V_{\max}$ =9,9 nmol/min/mg) e o mutante Leu89 exibe moderada redução enzimática

($V_{\max}=1,1$ nmol/min/mg). Quando ambos mutantes são misturados, a atividade média é de 5,5 nmol/min/mg. Entretanto, o vetor contendo o duplo mutante (Thr49-Leu89) codifica uma proteína com atividade de 2,9 nmol/min/mg, valor cerca de 50% inferior ao observado na situação em *trans*. Segundo os autores, tais dados indicam que a presença de Leu89 exerce um efeito parcialmente dominante no duplo mutante e que essa enzima não forma dímeros/hetero-dímeros ou os forma muito lentamente para serem detectados durante a realização do experimento.

3.3- O GENE *CYP17*

O gene *CYP17* está localizado no cromossomo 10, estando dividido em 8 éxons distribuídos em 6569pb (PICADO-LEONARD & MILLER, 1987). A região 5' não traduzida do *CYP17* contém um polimorfismo (T/C) que permite diferenciar dois alelos (A1 e A2) na população. A transição de T→C cria um segundo sítio promotor do tipo Sp1 (CCACC box), localizado a 34pb do primeiro códon de tradução (ATG) e, ao mesmo tempo, cria um sítio de restrição para a enzima *MspA* I, que permite identificar o alelo A2. Visto que o número de elementos promotores presentes na região 5' não traduzida está relacionada com a atividade de transcrição, e que a substituição de uma timina por citosina cria um CCACC box adicional no alelo A2, alguns autores consideram que este alelo exiba um aumento da taxa de transcrição. CAREY *et al.* (1994) detectaram uma associação preferencial do alelo A2 em famílias onde se observavam mulheres com ovários policísticos e homens com calvície, condições estas sabidamente relacionadas com níveis séricos elevados de andrógenos.

Em estudo de caso-controle, LUNN *et al.* (1999) sugerem que o alelo A2 ocorre em maior frequência em pacientes com câncer de próstata, mas demonstra este risco aumentado somente quando os genótipos A1/A2 e A2/A2 são combinados. GSUR *et al.* (2000) mostram uma associação do risco de câncer de próstata com o genótipo A2/A2, mas não observaram alteração nesse risco

para heterozigotos A1/A2, quando comparados com um grupo controle constituído por pacientes com HBP. Em contradição aos achados acima relatados, WADELIUS *et al.* (1999) relatam uma maior frequência de câncer de próstata em indivíduos com o genótipo A1/A1, quando comparados com controles de idades semelhantes. Posteriormente, HABUCHI *et al.* (2000) observaram que homens com o alelo A1 possuem um risco maior para o câncer de próstata e HBP, quando comparados com um grupo controle de indivíduos sadios. De acordo com estes autores, os genótipos A1/A1, A1/A2 e A2/A2 conferem, respectivamente, maior, intermediário e menor risco de câncer de próstata e HBP.

Controvérsias semelhantes relacionadas a este polimorfismo e o risco de câncer de mama têm sido relatadas. FEIGELSON *et al.* (1997) sugerem que o alelo CYP17A2 esteja associado com o risco aumentado de câncer de mama detectando um risco 2,5X maior para mulheres portadoras deste alelo. Outros autores demonstraram que as distribuições alélicas não diferem entre pacientes com câncer de mama e controles (HAMAJIMA *et al.*, 2000; KRISTENSEN *et al.*, 2000). Finalmente, KRISTENSEN *et al.* (2000) demonstraram experimentalmente que o segundo CCACC box (criado pela substituição T→C) não atua como sítio de ligação para Sp1, contrariando a hipótese de risco do alelo A2 e sugerindo que estes genótipos isoladamente seriam de pouco valor para estimar o risco de câncer de mama.

3.4- O GENE *HSD3B2*

Duas isoformas da 3 β hidroxí-esteróide desidrogenase foram descritas: a do tipo I, codificada pelo gene *HSD3B1*, que se expressa preferencialmente na mama, placenta e pele; e a do tipo II, codificada pelo gene *HSD3B2*, expressa na adrenal, testículos, ovários e próstata (DEVGAN *et al.*, 1997). O gene *HSD3B2* está localizado no cromossomo 1, na região 1p13 e está dividido em 4 éxons distribuídos em 7,8Kb (RHEAUME *et al.*, 1992).

Estudos em dinucleotídeos polimórficos [(TG)_n (TA)_n (CA)_n], localizados no íntron 3 deste gene, permitiram a identificação de 25 alelos os quais estavam distribuídos diferentemente entre norte-americanos decendentes de negros, de europeus e de asiáticos (DEVGAN *et al.*, 1997). Estes autores postularam que essas variantes alélicas podem desempenhar um importante papel na determinação do risco de câncer de próstata. Além disso, outras mutações poderiam resultar em uma degradação de DHT menor do que o normal, por meio da diminuição da atividade enzimática ou aumentar a sua atividade, reduzindo o risco da doença, devido ao aumento da degradação de DHT.

3.5- OUTROS GENES ENVOLVIDOS

3.5.1- O GENE *VDR*

Há algumas evidências de que a deficiência de vitamina D seja importante na ocorrência e progressão do câncer de próstata (SCHWARZ & HULKA, 1990). Sabe-se que esta vitamina regula a proliferação, a diferenciação celular e também pode influenciar a ativação do AR. O receptor de vitamina D (*VDR*) é obviamente fundamental nesse processo (FELDMAN, 1997).

O gene *VDR*, mapeado em 12q12-q14, está dividido em 9 éxons e possui vários polimorfismos no íntron 8 e no éxon 9, que estão em desequilíbrio de ligação (MORRISON *et al.*, 1994). Destes, os polimorfismos *Bsm* I, *Apa* I e *Taq* I, localizados na região 3' não traduzida, foram associados a um risco aumentado de câncer de próstata e/ou a um fenótipo agressivo (TAYLOR *et al.*, 1996; INGLES *et al.*, 1997). TAYLOR *et al.* (1996) observaram um risco aumentado para a doença para os genótipos TT e Tt do polimorfismo *Taq* I, o que não foi confirmado em estudo realizado por BOUSEMA *et al.* (2000). HABUCHI *et al.* (2000) observaram que o polimorfismo *Bsm* I deve influenciar o risco de câncer de próstata, tendo em vista que os genótipos BB e Bb exibem menor risco. Outro polimorfismo, definido

pelo número variável de adenosinas na região 3' não traduzida, foi estudado por INGLES *et al.* (1997). Alelos longos (>18 adenosinas) foram associados a um risco 4,6 vezes maior de câncer de próstata. Para FELDMAN (1997), esses polimorfismos podem alterar o nível de expressão do mRNA ou sua estabilidade, alterando, então, a quantidade de VDR.

3.5.2- O GENE PSA

O antígeno prostático específico (PSA) é uma glicoproteína presente no epitélio prostático, responsável pela lise do coágulo seminal, e é determinada no soro por meio de radioimunoensaio. Apesar do nome, o PSA não é específico da próstata, podendo estar elevado no câncer de mama e renal, sendo também detectado em tecido pancreático e nas glândulas salivares. Além do adenocarcinoma da próstata, o aumento do PSA pode ter várias outras causas como a HBP e prostatites, por exemplo. Cada grama de tecido com HBP produz até 0,3 ng/ml de PSA ao passo que no câncer esse valor chega a 3,5 ng/ml. Além disso, os níveis de PSA podem ser correlacionados com a extensão do tumor (FERREIRA & NARDI, 1999).

Ainda não são conhecidos os genes envolvidos na proliferação celular na próstata. Para XUE *et al.* (2000), um gene candidato pode ser o *PSA* (mapeado em 19q13-13.4), que é regulado pelos andrógenos, na próstata. Além disso, a região promotora desse gene tem uma ARE polimórfica (RAO & CRAMES, 1999). Acredita-se que variantes alélicas possam interagir diferentemente com o AR, e assim influenciar no risco de câncer de próstata. Em seu trabalho, XUE *et al.* (2000) estudaram o polimorfismo G/A na região promotora do gene *PSA*, e observaram que homens GG possuem um risco 3 vezes maior de câncer de próstata. Para esses autores, somente essas frequências alélicas não são suficientes para que se possa estimar o risco para a doença, entretanto quando o genótipo GG é combinado a alelos CAG "curtos" (<20 repetições), observa-se um risco até 5 vezes maior para a neoplasia.

3.5.3- O GENE *HPC2/ELAC2*

No gene *HPC2/ELAC2*, localizado em 17p, dois polimorfismos já foram identificados (Ser217Leu e Ala541Thr). Entretanto, tanto a função deste gene como os significados desses polimorfismos ainda são desconhecidos (REBBECK *et al.*, 2000; TAVTIGIAN *et al.*, 2000). Para TAVTIGIAN *et al.* (2000) a presença do alelo Thr541 tem um efeito deletério na função da proteína codificada por esse gene.

REBBECK *et al.* (2000) observaram que o genótipo Leu217/Thr541 era mais comum em pacientes com câncer de próstata do que em controles sem a doença. Esses resultados sugerem que este gene está associado a um risco aumentado para essa neoplasia. Esses autores afirmam que, devido a elevada frequência do genótipo Leu217/Thr541, este seria responsável por 5% dos cânceres de próstata na população estudada.

II- OBJETIVOS



- ✓ Tendo em vista a ausência de estudos populacionais em nosso meio relacionados a variações genéticas que possam vir a ter valor preditivo em relação ao câncer de próstata, esse trabalho teve como objetivo principal determinar as frequências dos polimorfismos dos genes do receptor de andrógenos (repetições CAG e GGN e S1/S2) e da enzima 5 α -redutase tipo II (V89L e A49T) em adultos do sexo masculino da população miscigenada do Estado de São Paulo;
- ✓ De modo complementar, estudou-se a distribuição desses polimorfismos em pacientes com câncer de próstata, para avaliar os genótipos que poderão ser considerados como fatores de risco para essa neoplasia, em nossa população.

III- MATERIAL E MÉTODOS



1- CASUÍSTICA

Foram coletadas amostras de sangue periférico (~10 ml) de 200 indivíduos adultos do sexo masculino, dentre candidatos à doação de sangue dos Hemocentros de Campinas (n=118) e São José do Rio Preto (n=82), que concordaram em participar voluntariamente do estudo, mediante a assinatura de termo de consentimento onde se esclarece o objetivo da pesquisa. Dentre os doadores de Campinas, as idades variaram entre 18 e 58 anos ($\bar{x}$ =36,6 e dp =9,7), enquanto que para São José do Rio Preto foram observadas idades de 23 a 61 anos ($\bar{x}$ =39 e dp =9,1).

No momento da coleta, foi indagada a origem étnica do doador, perguntando-se sobre seus ancestrais. Cerca de 61% (n=72) dos indivíduos de Campinas foram considerados caucasóides e 39% (n=46) negróides ou referiram ancestrais negróides. Em São José do Rio Preto cerca de 67,3% (n=56) foram considerados caucasóides e 31,7% (n=26) negróides ou possuíam ancestrais negróides.

Em relação aos indivíduos com câncer de próstata, estabelecemos uma colaboração com os Drs. José Carlos Mesquita e Andréa Borduchi Carvalho-Salles que nos enviaram amostras de DNA de pacientes (n=92) do Hospital de Base de São José do Rio Preto. Tratam-se de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de próstata, com idades que variam entre 43 e 96 anos ($\bar{x}$ =73,65, dp =8,87), avaliados no Serviço de Urologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Do ponto de vista étnico, apenas 8 desses foram identificados como negróides.

2- MÉTODOS

2.1- EXTRAÇÃO DE DNA

Foram coletados 10ml de sangue periférico, em tubo de centrífuga estéril de fundo cônico de 50ml contendo 8 gotas de EDTA 10% como agente anti-coagulante. Ao sangue coletado, adicionou-se 35ml da solução A (Triton-X 1%; $MgCl_2$ 5mM; Sacarose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 8,0). A mistura foi colocada em gelo por 30 minutos para que as hemácias fossem lisadas. Centrifugou-se a 2500 rpm por 10 minutos a 4°C e retirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* novamente em 20ml de solução A, agitando-se por inversão até o *pellet* se desprender fundo do tubo, centrifugou-se novamente por 15 minutos a 2500 rpm, o sobrenadante foi desprezado. As etapas de lise foram repetidas várias vezes até o *pellet* passar de rosa para incolor.

Continuando o procedimento, ressuspendeu-se o *pellet* em 1ml de solução B, 2X concentrada (Na_2EDTA 20 mM; NaCl 20 mM; Tris-HCl 20 mM pH 8,0) e adicionou-se 250µl de solução C preparada na hora (para 1 ml de solução C: 0,5 ml de solução B + 1 mg de Proteinase K - *Boehringer Mannheim, Germany* + 0,5 ml de SDS 10%). Incubou-se em banho-maria a 37°C durante a noite. Após a incubação, tratou-se a solução com 1,25ml de fenol saturado com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, agitou-se por inversão por 5 minutos e centrifugou-se a 2500 rpm por 10 minutos. Em seguida, retirou-se a camada aquosa e repetiu-se a extração. Retirou-se a fase superior que, após a segunda extração de fenol foi tratada com clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 (para 100ml: 96ml de clorofórmio e 4ml de álcool isoamílico).

O DNA foi precipitado adicionando-se 0,1 volumes de acetato de sódio 3M, pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto. O precipitado de DNA foi retirado da solução com auxílio de um bastão e, lavou-se com etanol 70% para eliminar o

excesso de sal. O DNA foi dissolvido em quantidade apropriada (200-500 μ l) de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) e a concentração foi determinada por leitura de absorção óptica a 260nm em espectrofotômetro.

2.2- ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO EXON 1 DO GENE AR

2.2.1- REPETIÇÕES CAG

Para o estudo do microsatélite CAG foram efetuadas reações de PCR ("Polymerase Chain Reaction"- SAIKI *et al.*, 1989), adicionando à reação 1 μ Ci de [α - 33 P] dCTP (10mCi/ml), cuja concentração é balanceada diminuindo a concentração de dCTP contida nos dNTPs. As seqüências dos *primers* utilizados (Tabela I) foram as descritas por YEE *et al.* (1994). A reação de PCR foi realizada em volume final de 50 μ l contendo de 200 a 500ng de DNA genômico, 20 μ mol de cada *primer*, 200 μ M de cada dNTPs (0,2mM dATP + 0,2mM dTTP + 0,2mM dGTP + 0,1mM dCTP + 1 μ Ci [α - 33 P] dCTP), 1,5% de MgCl₂, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase (Gibco-BRL®) e tampão de reação para a enzima. O ciclo utilizado é mostrado na Figura 8.

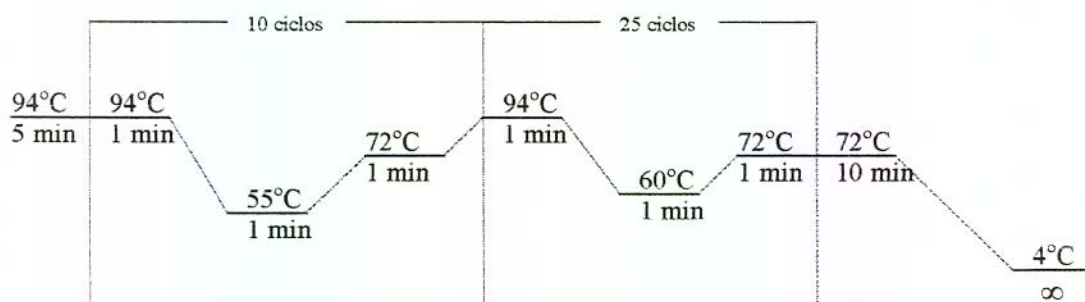


Figura 8- Ciclo utilizado para a amplificação das repetições CAG.

Após a reação as amostras foram misturadas a um tampão de carregamento na proporção de 1:1 (95% de formamida, 0,05% de azul de bromofenol e EDTA 20mM pH8,0), desnaturadas e aplicadas em gel de poliacrilamida 6% (7,5 ml de solução de acrilamida/bisacrilamida 40%, 2,5 ml de TBE 20X; 25,2g de uréia; água q.s.p. 60 ml). Para a polimerização acrescentou-se 500µl de persulfato de amônio (10%) e 50µl de TEMED (Pharmacia®). Os géis foram montados em placas de 42cm x 33,5cm e 39,5cm x 33,5cm. A placa maior foi tratada com *Repel Silane* (Pharmacia®) para que o gel ficasse aderido a placa menor. Entre as placas foram utilizados espaçadores com a espessura de 0,4 mm. O gel foi submetido a uma pré-corrida de 30 minutos. As amostras foram previamente desnaturadas a 95°C por 5 minutos e 4µl foram aplicados. Ao lado dos microsátélites foi aplicada uma reação de seqüenciamento a fim de que se possa estimar o número de repetições, além de dois indivíduos controles, com o número de repetições conhecidos. A corrida foi feita nas seguintes condições: 2000V; 50W; 50mA por 5 horas.

O gel aderido à placa menor é retirado com papel Whatmann 3MM e secado a vácuo por 1hora a 80°C, sendo posteriormente exposto usando filme sensível (Kodak Biomax®) por aproximadamente 24 horas.

Tabela I - Seqüência de *primers* utilizados nesse trabalho.

Gene	Seqüência dos <i>primers</i> (5' → 3')
AR	CAG1:GTGCGCGAAGTGATCCAGAA
	CAG2:TCTGGGAGCCAACCTCTCTC
	GGC1:TCCTGGCACACTCTCTTCAC
	GGC2:GCCAGGGTACCACACATCAGGT
	Stu I1:CACAGGCTACCTGGTCCTGG
	Stu I2:CTGCCTTACACAACCTCCTTGGC
SRD5A2	V89L1:GCAGCGGCCACCGGCGAGGAACA
	V89L2: TGGACGCCGGGAGCAGGGCAGT
	A49T1:GCAGCGGCCACCGGCG
	A49T2:GTGGAAGTAATGTACGCAGAA

Para a análise do número das repetições CAG, verificou-se, por seqüenciamento, que o produto da reação PCR de 307pb contém 20 repetições CAG (Figura 9). Desse modo, acréscimos ou decréscimos de múltiplos de 3, permitem facilmente determinar o número de repetições de CAG de cada indivíduo, pelo exame visual do filme de raio X.

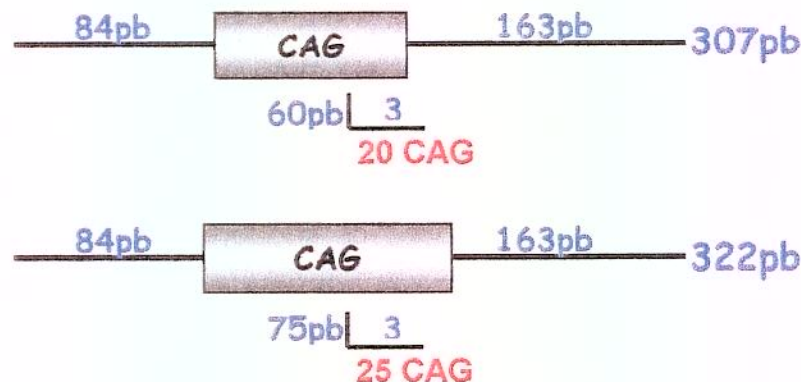


Figura 9 – Análise do número de repetições CAG

2.2.2- REPETIÇÕES GGN

Nos microsatélites GGN a reação de PCR foi realizada em volume final de 50µl contendo de 200 a 500ng de DNA genômico, 20pmol de cada *primer*, 200µM de cada dNTPs (0,2mM dATP + 0,2mM dTTP + 1mM da mistura de 7-deaza-dGTP:dGTP + 0,1mM dCTP + 1µCi [α - 33 P] dCTP), 1,5% de MgCl₂, 5% de DMSO, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase (Gibco-BRL®) e tampão de reação para a enzima. Foram utilizados os *primers* descritos por SLEDDENS *et al.* (1993), relacionados na Tabela I. O ciclo utilizado é mostrado na Figura 10. A eletroforese foi efetuada como descrito acima para as repetições CAG.

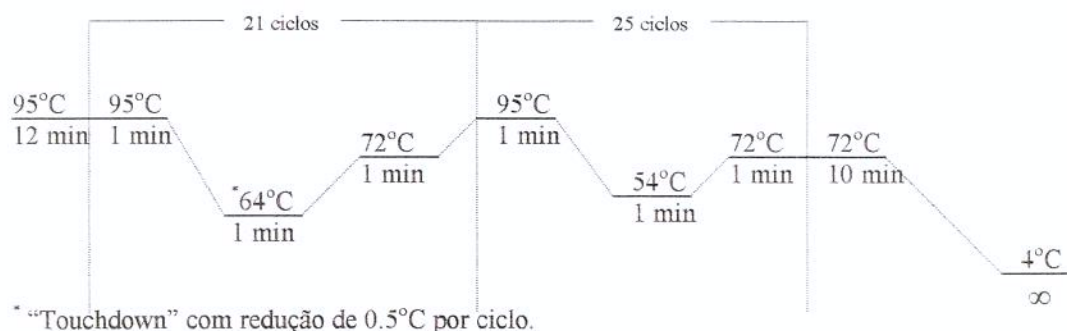


Figura 10- Ciclo utilizado para a amplificação das repetições GGC

2.2.3- POLIMORFISMO S1/S2

Para a análise do polimorfismo S1/S2 usamos a técnica de PCR-RFLP (**R**estriction **F**ragment **L**enght **P**olymorphism), com os *primers* utilizados por LU & DANIELSEN, (1996), descritos na Tabela I. A reação de PCR (Tabela II) foi realizada em volume final de 50µl contendo de 200 a 500ng de DNA genômico, 20pmol de cada *primer*, 200µM de cada dNTPs, 1,5% de MgCl₂, 5% de DMSO, 2% de BSA, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase (Gibco-BRL®) e tampão de reação para a enzima.

A substituição G1733A no códon 233 cria um sítio de restrição para enzima *Stu* I (alelo S2). O fragmento de 416pb foi digerido com a enzima *Stu* I por duas horas a 37°C, e os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Gibco-BRL®). Os produtos desta digestão foram de 416pb e de 329/87pb para os genótipos S1 e S2 respectivamente (Figura 11).

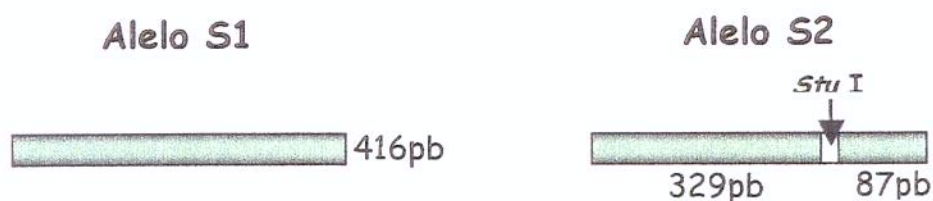


Figura 11 – Padrão de restrição da enzima *Stu* I para os alelos S1 e S2.

2.3- ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE *SRD5A2*

2.3.1- POLIMORFISMO VAL89LEU

O polimorfismo Val89Leu foi analisado por PCR-RFLP, com os *primers* descritos por KATZ *et al.* (1995), relacionados na Tabela I. A reação de PCR (Tabela II) foi realizada em volume final de 50µl contendo de 200 a 500ng de DNA genômico, 20µmol de cada *primer*, 200µM de cada dNTPs, 1,5% de MgCl₂, 2,5% de DMSO, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase (Gibco-BRL®) e tampão de reação para a enzima.

A presença de uma guanina (G) na base 296 (alelo Val89) cria um sítio de restrição para enzima *Rsa* I, que é abolido no alelo Leu89. O fragmento de 369pb foi digerido com a enzima *Rsa* I por duas horas a 37°C, e os produtos da digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose 1000 (Gibco-BRL®) 3%. Os produtos desta digestão foram de 169/106/73/21pb para o genótipo Val/Val; 169/106/94/ 73/21pb para Val/Leu e 169/106/94 pb para Leu/Leu (Figura 12).

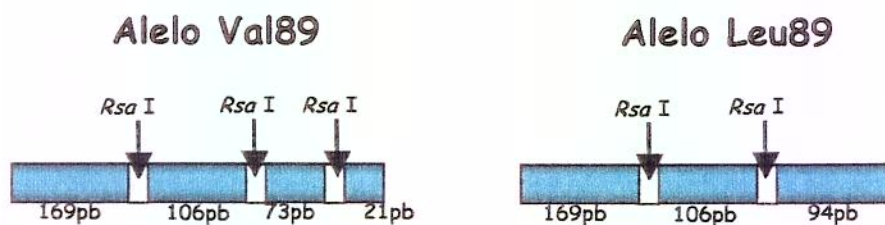


Figura 12 – Padrão de restrição da enzima *Rsa* I para os alelos Val89 e Leu89.

2.3.2- POLIMORFISMO ALA49THR

Para analisar a substituição Ala49Thr utilizou-se a técnica de ASOH (Allele Specific Oligonucleotide Hybridization). Primeiramente, amplificou-se o éxon 1 do gene *SRD5A2*, utilizando o par de *primers* descrito por MAKRIDAKIS *et al.* (1999),

apresentado na Tabela I. A reação de PCR (Tabela II) foi realizada em volume final de 50µl contendo de 200 a 500ng de DNA genômico, 20pmol de cada *primer*, 200µM de cada dNTPs, 1,5% de MgCl₂, 1,5% de DMSO, 2,5 unidades de enzima *Taq* DNA Polimerase (Gibco-BRL®) e tampão de reação para a enzima.

Tabela II - Tempos, temperaturas e números de ciclos nas reações de PCR para os polimorfismos de restrição.

<i>Primers</i>	Etapa Inicial		35 Ciclos						Etapa final	
	Desnaturação		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão	
	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)	Tempo (min)	Temp (°C)
S1/S2	5	95	1	95	1	62	1	72	10	72
Val89Leu						65				
Ala49Thr						55				

Aproximadamente 5µl do produto da PCR foram misturados com 800µl de uma solução desnaturante (NaOH 0,4N; EDTA 25mM). De cada amostra, foram aplicados 250µl em membrana de Nylon *Immobilon S* (Hybond-N®). Para essa técnica utilizamos os aparelhos de *Dot-blot* (BioRad®) e *Slot-Blot* (Gibco-BRL®), sendo todas as membranas feitas em duplicata.

As membranas foram pré-hibridizadas por pelo menos 4 horas em uma solução de pré-hibridização (4XSSC; 5X Denhart's; NaH₂PO₄ 10mM; ssDNA 3µg/µl; SDS 1%). Os oligonucleotídeos alelo-específicos empregados nessa investigação, foram desenhados com o auxílio do programa "GeneRunner" versão 3.0 (Hasting Software, Inc, 1994) :

ALA49 - 5' CTA CCC GCC TGC CAG CCC 3'

THR49 - 5' CTA CCC GCC TAC CAG CCC 3'

A marcação dos oligonucleotídeos foi feita segundo a reação:

- 1 μ l do oligonucleotídeo (10 μ mol/ μ l);
- 2 μ l tampão 10X (Tris-HCl 700mM pH 7,6; MgCl₂ 100mM; DTT 50mM);
- 16 μ l H₂O;
- 1 μ l enzima T₄ polinucleotídeoquinase 10U/ μ l;
- 1 μ l [δ ³²P]dATP 10mCi/ml.

Esses materiais foram incubados a 37°C por, pelo menos, 1 hora, sendo então adicionados às soluções de pré-hibridização. E, a fim de evitar a presença de falsos positivos adotou-se a estratégia de adicionar um excesso de 25X de sonda não marcada em relação à sonda marcada, permitindo a competição dos oligonucleotídeos frios com os marcados, que hibridizam nos locais com total homologia.

A lavagem das membranas foi feita da seguinte maneira:

1. Solução de 6XSSC por 20 minutos a temperatura ambiente;
2. Solução de 6XSSC/0.1% SDS por 10 minutos à 62°C;
3. Solução de 6XSSC por 1 minuto a temperatura ambiente.

As membranas foram secas e expostas em filme X-OMAT AR (Kodak[®] *diagnostic film*) na presença de placas intensificadoras (Quanta III – Sigma[®]) por, pelo menos 4 horas a -70°C.

Tendo em vista que o alelo Thr49 é raro, o oligonucleotídeo **THR49** foi usado como *primer* sense, para produzir fragmentos que contivessem a substituição G→A. Desse modo, foi produzido um controle positivo para esse alelo.

3- ANÁLISE DOS DADOS

As comparações envolvendo as distribuições do número de repetições CAG e GGN nas diferentes amostras e sub-amostras foram realizadas por meio dos testes t e z. Numa segunda etapa, as amostras foram divididas em duas classes, utilizando-se o número médio de repetições CAG e GGN, e comparadas por meio do teste Qui-quadrado (χ^2) com correção de Yates. Esse teste também foi aplicado para a comparação das freqüências alélicas do polimorfismo S1/S2 e dos dados genotípicos referentes ao polimorfismo Val89Leu do gene *SRD5A2*. Em todos esses casos utilizou-se o programa BIOESTAT (AYRES *et al.*, 1998), que também foi aplicado para o cálculo do risco relativo (RR).

As freqüências dos haplótipos para os polimorfismos do gene AR foram estimadas com o auxílio do programa ARLEQUIN (SCHNEIDER *et al.*, 1997), que permitiu também avaliar o desequilíbrio de ligação.

Para o polimorfismo Val89Leu, as freqüências genotípicas esperadas em equilíbrio de Hardy-Weinberg foram estimadas e comparadas com as freqüências observadas em todas as amostras.

IV- RESULTADOS



1- ANÁLISE DAS POPULAÇÕES DE DOADORES

1.1- POLIMORFISMOS DO GENE *AR*

1.1.1- REPETIÇÕES CAG

A Figura 13 ilustra a análise das repetições CAG.

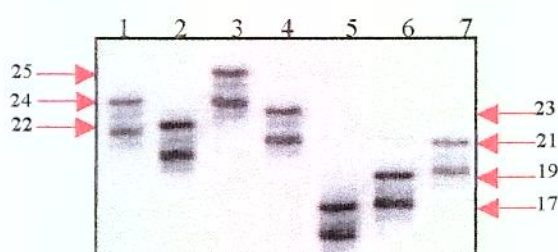


Figura 13- Gel de poliacrilamida 6%; as setas indicam o número de repetições CAG, observados nas colunas de 1-7

Na Tabela III acham-se resumidos os dados referentes à distribuição do número de repetições CAG na amostra de doadores de sangue de Campinas, divididos quanto à sua origem étnica em caucasóides e negróides.

Em relação a esta amostra, a análise feita pelo teste t não revelou diferenças significativas entre caucasóides e negróides ($t=0,46$, $p=0,65$). A amostra de negróides foi subdividida, quanto à origem de seus pais e/ou avós, em descendentes exclusivamente de negróides ($n=25$) e em descendentes de caucasóides ($n=21$). Não foram detectadas diferenças entre esses dois subgrupos ($t=1,03$, $p=0,31$). O mesmo não foi feito com os caucasóides, pois esse grupo é composto por indivíduos que não relataram quaisquer mistura de raças, no

momento da entrevista. Esses resultados indicam que, para fins de análise genotípica, esses doadores podem ser considerados como um único grupo.

Tabela III – Distribuição do número de repetições CAG em caucasóides e negróides de Campinas.

CAG	Campinas (n=118)		
	Caucasóides	Negróides	Total
11	-	1	1
12	1	-	1
15	1	1	2
16	-	5	5
17	2	1	3
18	3	2	5
19	9	2	11
20	6	5	11
21	25	9	34
22	11	5	16
23	5	8	13
24	7	3	10
25	1	3	4
26	-	1	1
27	1	-	1
Média	20,94	20,72	20,85

Na amostra de doadores de sangue de São José do Rio Preto (Tabela IV), nenhuma diferença foi detectada entre caucasóides e negróides ($t=1,01$, $p=0,31$), bem como entre os subgrupos de negróides descendentes exclusivamente de negróides ($n=7$) e em descendentes de caucasóides ($n=19$) ($t=0,65$, $p=0,52$). Desse modo, assim como em Campinas, essa população não será subdividida nas comparações posteriores.

Quando as populações de doadores de Campinas e de São José do Rio Preto foram comparadas, pelo teste t , nenhuma diferença entre ambas foi detectada ($t=1,28$, $p=0,20$). Portanto, optou-se por considerar esses 200 indivíduos como uma única população para as repetições CAG.

Tabela IV - Distribuição do número de repetições CAG em caucasóides e negróides de São José do Rio Preto.

CAG	São José do Rio Preto (n=82)		
	Caucasóides	Negróides	Total
13	1	-	1
16	2	2	4
17	5	1	6
18	5	8	13
19	6	3	9
20	11	4	15
21	7	1	8
22	4	3	7
23	7	-	7
24	4	3	7
25	1	-	1
27	3	-	3
28	-	1	1
Média	20,57	19,88	20,35

1.1.2- REPETIÇÕES GGN

A Figura 14 ilustra a análise das repetições GGN.

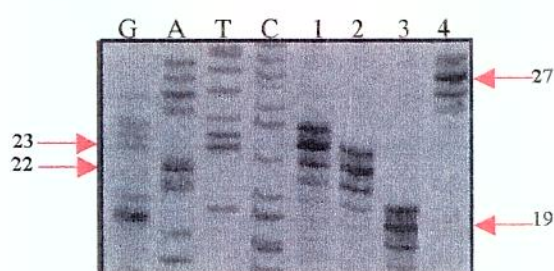


Figura 14- Gel de poliacrilamida 6%; as setas indicam o número de repetições GGN, observados nas colunas 1,2,3 e 4. As letras G, A, T, C correspondem ao sequenciamento de DNA utilizado para estimar o número de repetições.

Na Tabela V acham-se resumidos os dados referentes à distribuição do número de repetições GGN na amostra de doadores de sangue de Campinas, divididos quanto à sua origem étnica em caucasóides e negróides.

Não foram constatadas diferenças na distribuição do número de repetições entre esses grupos étnicos e nos subgrupos de negróides ($t=1,46$, $p=0,14$ e $t=1,68$, $p=0,10$, respectivamente).

Tabela V - Distribuição do número de repetições GGN em caucasóides e negróides de Campinas.

GGN	Campinas (n=118)		
	Caucasóides	Negróides	Total
16	-	1	1
18	-	1	1
19	1	2	3
21	1	3	4
22	34	13	47
23	24	20	44
24	8	4	12
25	3	2	5
27	1	-	1
Média	22,69	22,33	22,55

Em relação aos doadores de sangue de São José do Rio Preto (Tabela VI), nenhuma diferença foi detectada entre caucasóides e negróides ($t=0,07$, $p=0,94$), e entre os subgrupos de negróides ($t=0,04$, $p=0,97$).

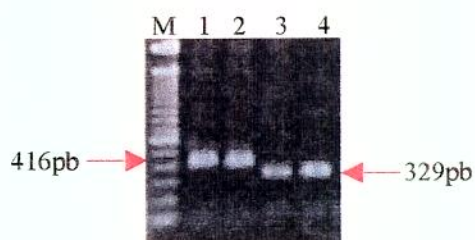
As análises feitas nas amostras de Campinas e de São José do Rio Preto não mostraram nenhuma diferença significativa entre ambas ($t=1,48$, $p=0,14$). Desse modo, assim como nas repetições CAG, considerou-se esses 200 indivíduos como uma única população para as repetições GGN.

Tabela VI - Distribuição do número de repetições GGN em caucasóides e negróides de São José do Rio Preto.

GGN	São José do Rio Preto (n=82)		
	Caucasóides	Negróides	Total
10	1	-	1
13	1	-	1
17	1	2	3
18	2		2
19	2	2	4
22	16	8	24
23	23	10	33
24	8	3	11
25	-	1	1
27	2	-	2
Média	22,16	22,11	22,15

1.1.3- POLIMORFISMO S1/S2

Na Figura 15 podemos observar os padrões de restrição da enzima *Stu* I.

**Figura 15-** Gel de agarose 1.5%; M- marcador de peso molecular, 1 e 2- alelo S1, 3 e 4- alelo S2.

Em relação a este polimorfismo (Tabela VII), não foram observadas diferenças na distribuição dos alelos S1 e S2 entre as amostras de caucasóides e negróides oriundos de Campinas ($\chi^2_{(1)}=0,007$, $p=0,93$), bem como entre subgrupos de negróides descendentes exclusivamente de negróides e em descendentes de caucasóides ($\chi^2_{(1)}=3,06$, $p=0,08$).

Tabela VII - Distribuição dos genótipos S1 e S2 em caucasóides e negróides de Campinas.

S1/S2	Campinas (n=118)		
	Caucasóides	Negróides	Total
S1	18	11	29
S2	54	35	89
Total	72	46	118

Na amostra de doadores de sangue de São José do Rio Preto (Tabela VIII), nenhuma diferença foi detectada entre caucasóides e negróides ($\chi^2_{(1)}=0,49$, $p=0,48$), bem como entre os subgrupos de negróides ($\chi^2_{(1)}=1,67$, $p=0,19$).

Tabela VIII - Distribuição dos genótipos S1 e S2 em caucasóides e negróides de São José do Rio Preto.

S1/S2	São José do Rio Preto (n=82)		
	Caucasóides	Negróides	Total
S1	6	5	11
S2	50	21	71
Total	56	26	82

Quando as amostras de doadores de Campinas e de São José do Rio Preto foram comparadas nenhuma diferença entre ambas foi detectada ($\chi^2_{(1)}=3,10$, $p=0,08$). Portanto, optou-se por considerar esses 200 indivíduos como uma única população para o polimorfismo S1/S2.

1.1.4- ANÁLISE DOS HAPLÓTIPOS MAIS FREQUENTES

Com o auxílio do programa Arlequin (SCHNEIDER *et al.*, 1997) foi possível detectar a presença de 76 haplótipos, sendo que os de frequência maior ou igual a 4% estão dispostos na Tabela IX. Além disso, foi feita análise de ligação entre os

polimorfismos do gene *AR*, por meio da qual pode-se constatar que há um desequilíbrio de ligação entre as repetições GGN e o polimorfismo S1/S2 ($p=0,01$), que não foi observado para CAG e GGN e CAG e S1/S2 ($p=0,14$ e $p=0,27$, respectivamente).

Tabela IX - Distribuição dos haplótipos mais frequentes para as repetições CAG e GGC e S1/S2.

Haplótipos			Frequências
CAG	GGN	S1/S2	
21	22	S2	0,085
20	23	S2	0,065
22	23	S2	0,045
21	23	S2	0,040
23	22	S2	0,040
24	22	S2	0,040
19	22	S2	0,040

1.2- POLIMORFISMOS DO GENE *SRD5A2*

1.2.1- POLIMORFISMO VAL89LEU

Na figura 16 podemos observar os padrões de restrição da enzima *Rsa* I, que permitem definir os genótipos Val/Val, Val/Leu e Leu/Leu.

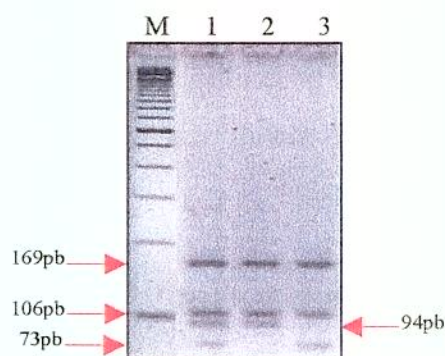


Figura 16- Gel de agarose 1000 3%; M- marcador de peso molecular, 1- Val/Leu, 2- Leu/Leu e 3- Val/Val.

Para este polimorfismo, foram observadas diferenças significativas na distribuição dos genótipos entre os dois grupos étnicos de doadores de Campinas ($\chi^2_{(2)}=6,54$, $p=0,04$), provavelmente devido a um excesso de homozigotos Val/Val, na amostra de negróides (Tabela XI). Em relação aos subgrupos de negróides descendentes exclusivamente de negróides e de descendentes de caucasóides, no entanto, não foram observadas diferenças na distribuição desses genótipos ($\chi^2_{(2)}=0,22$, $p=0,89$).

Tabela XI - Distribuição dos genótipos Val/Val, Val/Leu e Leu/Leu em caucasóides e negróides de Campinas.

Val89Leu	Campinas (n=118)		
	Caucasóides	Negróides	Total
Val/Val	33	28	61
Val/Leu	24	16	40
Leu/Leu	15	2	17
Total	72	46	118

Na amostra de São José do Rio Preto, nenhuma diferença foi detectada entre caucasóides e negróides (Tabela XII) bem como entre os subgrupos de negróides ($\chi^2_{(2)}=1,38$, $p=0,50$ e $\chi^2_{(2)}=3,93$, $p=0,14$, respectivamente).

Tabela XII - Distribuição dos genótipos Val/Val, Val/Leu e Leu/Leu em caucasóides e negróides de SJ do Rio Preto.

Val89Leu	São José do Rio Preto (n=82)		
	Caucasóides	Negróides	Total
Val/Val	20	7	27
Val/Leu	30	14	44
Leu/Leu	6	5	11
Total	56	26	82

Quando comparamos as amostras de Campinas e São José do Rio Preto, observamos diferenças significativas na distribuição dos genótipos ($\chi^2_{(2)} = 8,41$; $p = 0,015$). Por outro lado, ambas as populações acham-se em equilíbrio de Hardy & Weinberg (Campinas $\chi^2_{(2)} = 5,32$; $0,05 < p < 0,10$ e São José do Rio Preto $\chi^2_{(2)} = 1,16$; $0,50 < p < 0,70$) e não diferem em relação às frequências alélicas ($\chi^2_{(1)} = 1,84$; $p = 0,17$). O teste de homogeneidade confirma esses resultados ($\chi^2_{(1)} = 3,34$; $0,05 < p < 0,10$). Portanto, optou-se por considerar esses 200 indivíduos como uma única população para o polimorfismo Val89Leu.

1.2.2- POLIMORFISMO ALA49THR

A Figura 17 ilustra a análise do polimorfismo Ala49Thr.

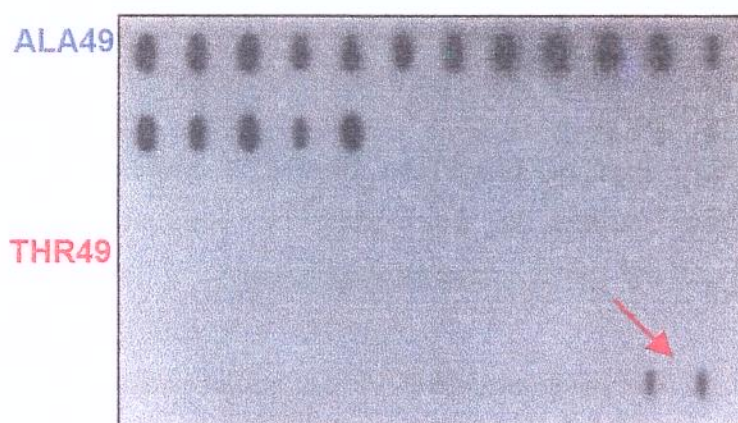


Figura 17- Membranas hibridizadas com as sondas ALA49 e THR49; a seta indica os controles positivos para essa substituição.

Em relação a este polimorfismo, nenhum alelo Thr49 foi detectado em nossa amostra.

2- O RISCO DE CÂNCER DE PRÓSTATA

2.1- GENE AR

2.1.1- POLIGLUTAMINAS

A distribuição do número de repetições CAG dos pacientes com câncer de próstata e dos doadores de sangue (Tabela XIII) foi analisada pelo teste z. Em relação a esses dados, a análise não revelou diferenças significativas entre ambos ($z=1,49$, $p=0,14$).

Tabela XIII - Distribuição do número de repetições CAG em pacientes com câncer de próstata e em doadores.

CAG	Pacientes (%) (n=92)	Doadores (%) (n=200)
11	-	1 (0,5)
12	2 (2,17)	1 (0,5)
13	-	1 (0,5)
14	2 (2,17)	-
15	2 (2,17)	2 (1)
16	3 (3,26)	9 (4,5)
17	3 (3,26)	9 (4,5)
18	2 (2,17)	18 (9)
19	13 (14,1)	20 (10)
20	10 (10,9)	26 (13)
21	15 (16,3)	42 (21)
22	10 (10,9)	23 (11,5)
23	7 (7,6)	20 (10)
24	5 (5,4)	17 (8,5)
25	8 (8,7)	5 (2,5)
26	6 (6,5)	1 (0,5)
27	2 (2,17)	4 (2)
28	-	1 (0,5)
29	1 (1,1)	-
33	1 (1,1)	-
Média	21,22	20,65

O Gráfico 1 ilustra a distribuição do número de repetições CAG em indivíduos com câncer de próstata e em doadores de sangue.

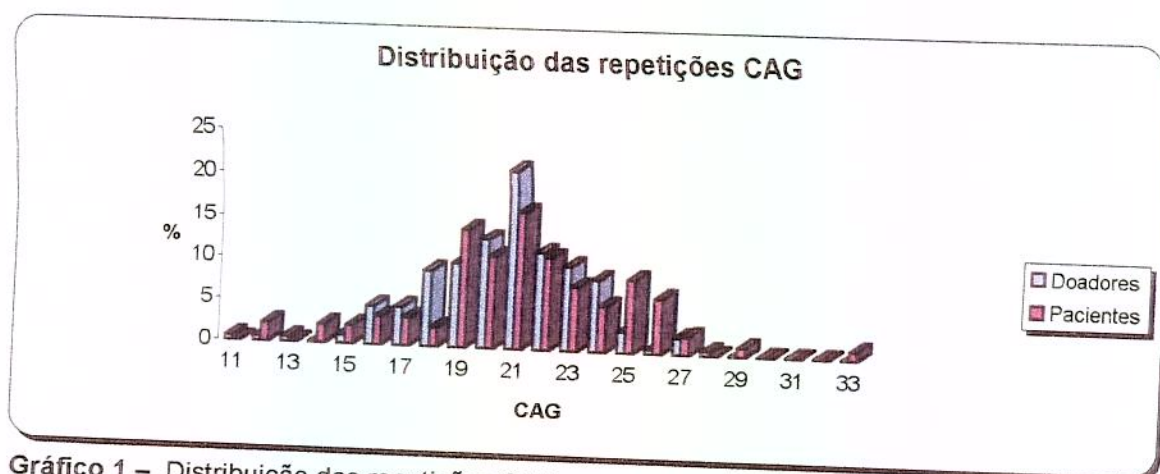


Gráfico 1 – Distribuição das repetições CAG em doadores e pacientes.

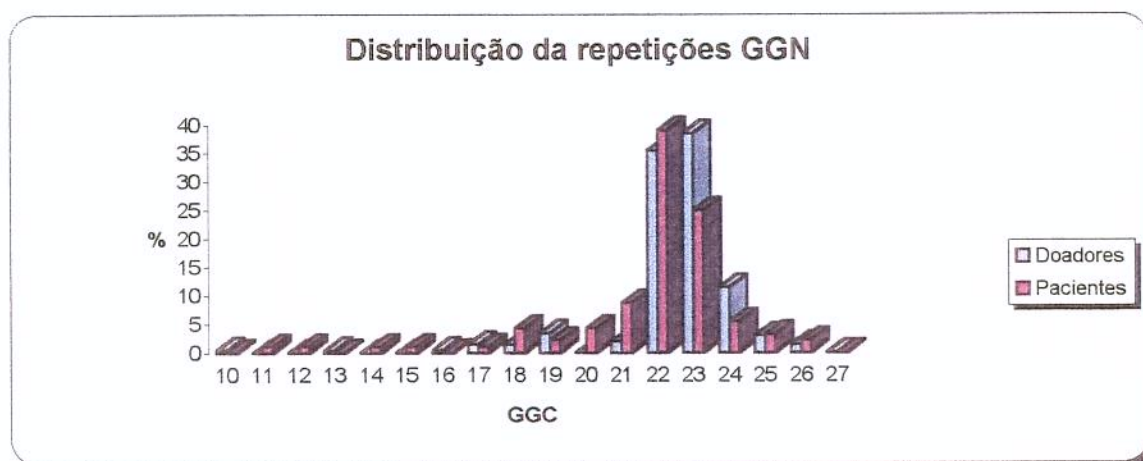
Apesar de não ter sido detectada diferença na distribuição dessas repetições, estas foram subdivididas em duas classes ($<20\text{CAG}$ e $\geq 20\text{CAG}$), para testar a hipótese de que “alelos curtos” confeririam um risco aumentado para o câncer de próstata. Desse modo estimou-se o risco relativo (RR), cujos resultados, apontados na Tabela XVI, indicam que o número de repetições CAG parece não interferir no risco para a doença.

2.1.2- POLIGLICINAS

A distribuição do número de repetições GGN dos pacientes com câncer de próstata e dos doadores (Tabela XIV) foi analisada pelo teste z, que evidenciou a existência de diferença significativa entre ambos ($z=2,65$, $p=0,008$). O Gráfico 2 ilustra a distribuição do número de repetições GGN em indivíduos com câncer de próstata ($\bar{x}=21,68$) e em doadores normais ($\bar{x}=22,38$).

Tabela XIV - Distribuição do número de repetições GGN em pacientes com câncer de próstata e em doadores.

GGN	Pacientes (%) (n=92)	Doadores (%) (n=200)
10	-	1 (0,5)
11	1 (1,1)	-
12	1 (1,1)	-
13	-	1 (0,5)
14	1 (1,1)	-
15	1 (1,1)	-
16	-	1 (0,5)
17	1 (1,1)	3 (1,5)
18	4 (4,3)	3 (1,5)
19	2 (2,17)	7 (3,5)
20	4 (4,3)	-
21	8 (8,7)	4 (2)
22	36 (39,1)	71 (35,5)
23	23 (25)	77 (38,5)
24	5 (5,4)	23 (11,5)
25	3 (3,26)	6 (3)
26	2 (2,17)	3 (1,5)
Média	21,68	22,38

**Gráfico 2** – Distribuição das repetições GGN em doadores de sangue e pacientes com câncer de próstata.

Em relação às repetições GGN, estas foram divididas em duas classes (<22GGN e ≥ 22 GGN), estimando-se o RR para cada uma delas. Os resultados apresentados na Tabela XVI permitem concluir que indivíduos com alelos <22 teriam um risco maior de câncer de próstata, enquanto portadores de alelos ≥ 22 seriam beneficiados por um provável “efeito protetor”.

2.1.3- POLIMORFISMO S1/S2

Em relação a este polimorfismo (Tabela XV), observou-se diferença significativa na distribuição dos alelos S1 e S2 entre pacientes com câncer de próstata e doadores ($\chi^2_{(1)}=4,83$, $p=0,03$).

Tabela XV - Distribuição dos genótipos S1 e S2 em pacientes com câncer de próstata e em doadores.

S1/S2	Pacientes (%) (n=92)	Doadores (%) (n=200)
S1	30 (32,61)	40 (20)
S2	62 (67,39)	160 (80)

Subseqüentemente, a análise do RR revelou que o alelo S1 poderia ser responsável por um aumento no risco para a doença, enquanto o S2 teria um “efeito protetor” (Tabela XVI).

Tabela XVI – Análise do risco relativo para cada polimorfismo.

CAG	GGC	S1/S2	Pacientes	Doadores	Risco Relativo	p	95% IC
≥ 20	-	-	65	139	1,04	0,47	0,71-1,51
<20	-	-	27	61	0,96		0,66-1,40
-	≥ 22	-	69	180	0,52	0,0007	0,37-0,73
-	<22	-	23	20	1,93		1,37-2,72
-	-	S1	30	40	1,53	0,014	1,09-2,16
-	-	S2	62	160	0,65		0,46-0,92

2.1.4- ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA

Com o auxílio do programa Arlequin (SCHNEIDER *et al.*, 1997) foram detectados 65 haplótipos, sendo que os de frequência maior ou igual a 4% estão dispostos na Tabela XVII. Além disso, foi feita a análise de ligação entre os polimorfismos do gene *AR*, constatando-se um desequilíbrio de ligação entre as repetições GGN e o polimorfismo S1/S2 ($p=0,02$), o que não foi observado para CAG e GGN e CAG e S1/S2 ($p=0,23$ e $p=0,75$, respectivamente).

Tabela XVII - Distribuição dos haplótipos mais frequentes para as repetições CAG e GGC e S1/S2.

Haplótipos			Frequências
CAG	GGN	S1/S2	
21	22	S2	0,054
21	23	S2	0,043
22	22	S2	0,043
19	22	S2	0,043

2.1.5- ANÁLISE DO RISCO RELATIVO PARA OS TRÊS POLIMORFISMOS

Tendo em vista as frequências relativamente baixas estimadas para os haplótipos individuais, esses foram agrupados em classes (Tabela XVIII) para avaliar o risco relativo das várias combinações.

Tabela XVIII – Análise do risco relativo para diferentes combinações dos polimorfismos do gene AR.

CAG	GGC	S1/S2	Pacientes	Doadores	Risco Relativo	p	95% IC
≥20	≥22	-	45	129	0,65	0,008	0,46-0,91
≥20	<22	-	20	10	2,43	0	1,76-3,34
<20	≥22	-	24	51	1,02	0,48	0,69-1,49
<20	<22	-	3	10	0,72	0,36	0,26-1,98
≥20	-	S1	17	23	1,43	0,076	0,95-2,15
≥20	-	S2	48	116	0,85	0,21	0,61-1,20
<20	-	S1	13	17	1,44	0,10	0,92-2,25
<20	-	S2	14	44	0,72	0,12	0,44-1,18
-	≥22	S1	25	34	1,47	0,03	1,03-2,11
-	≥22	S2	44	146	0,54	0,0003	0,39-0,77
-	<22	S1	5	6	1,47	0,25	0,75-2,87
-	<22	S2	18	14	1,98	0,001	1,37-2,84
≥20	≥22	S2	32	107	0,64	0,02	0,42-0,97
≥20	<22	S2	16	9	2,74	0	1,86-4,04

2.2- GENE SRD5A2

Em relação ao polimorfismo Val89Leu, não foram detectadas diferenças na distribuição dos genótipos entre pacientes e doadores de sangue ($\chi^2_{(2)}=1,43$, $p=0,49$). Além disso, como se pode observar na Tabela XIX, parece não haver qualquer ligação entre os genótipos em questão e o risco de câncer de próstata.

Tabela XIX - Distribuição dos genótipos Val/Val, Val/Leu e Leu/Leu em pacientes e doadores e análise de RR.

Val89Leu	Pacientes (%)	Doadores (%)	RR	p	95% IC
Val/Val	34 (36,96)	88 (44)	0,82	0,16	0,57-1,16
Val/Leu	45 (48,91)	84 (42)	1,21		0,86-1,70
Leu/Leu	13 (14,13)	28 (14)	1		0,62-1,64
Val	0,61	0,65	0,90	0,23	0,70-1,15
Leu	0,39	0,35	1,11		0,87-1,42

Quanto à substituição Ala49Thr, todos os alelos foram identificados como Ala49.

V- DISCUSSÃO



1- ASPECTOS ÉTNICOS E POPULACIONAIS

Embora o IBGE ainda use o termo “raça”, esta denominação é predominantemente decorrente de aspectos sociais e culturais. Para TEMPLETON (1999), do ponto de vista genético não existem raças humanas. O homem moderno desenvolveu características físicas, incluindo cor da pele, por adaptação ao ambiente de cada nicho geográfico. Geneticamente, no entanto, não houve diversificação suficiente para caracterizar “raças” em um sentido biológico. Uma nomenclatura que vem sendo utilizada é a de **etnia**, definida de modo muito amplo como um grupo populacional que tem características físicas ou culturais em comum.

Tendo em vista os resultados obtidos, é importante discutir alguns aspectos sobre a definição da origem étnica dos indivíduos estudados. No decorrer do presente trabalho, sugeriu-se que os indivíduos de ancestralidade negra fossem classificados de acordo com os critérios de KRIEGER *et al.* (1965) e POLLITZER *et al.* (1982). Entretanto, para fazê-lo seria necessário um treinamento prévio no reconhecimento de características antropológicas específicas de cada grupo “racial”, o que ainda pode ser feito em localidades onde houve pouca miscigenação, com tipos muito bem definidos de negros.

Em relação à região sudeste, Azevêdo (1987), após comentar que o Brasil é “mulato no litoral, branco e mestiço no interior... mais índio ao norte, menos branco no nordeste, mais índio e mais branco no centro-oeste, menos preto no sul”, afirma que há de “tudo no sudeste”. Dessa forma, a extrema miscigenação observada nessa região inviabiliza a classificação da população quanto à etnia, principalmente se os únicos critérios forem cor da pele e textura do cabelo. Mesmo indagando sobre os ancestrais, como realizado no presente trabalho, é questionável classificar um indivíduo como negróide, por ter, por exemplo, um pai

descendente de negros e uma mãe descendente de brancos, pois qual seria o componente de maior “peso” nessa definição : o negróide, ou o caucasóide ?

Além disso é digna de nota a constatação feita por ALVES-SILVA *et al.* (1999) de que, ao se adotar a classificação utilizada pelo IBGE, pela qual os 245 indivíduos estudados puderam descrever a si mesmos como brancos, pretos, pardos, amarelos e indígenas, todos optaram pela categoria “branco”. Como salientado pelos autores, a maioria desses indivíduos era originária do Estado de Minas Gerais, que, de acordo com o IBGE é composto por 51,4% de brancos, 6,7% de pretos e 41,6% de pardos. Estes autores destacam, por meio da análise do DNA mitocondrial, a significativa contribuição matrilineal de ameríndios e de africanos ($\geq 60\%$) na constituição da assim denominada população branca do Brasil.

Em trabalho recentemente publicado, o mesmo grupo de autores analisou os polimorfismos de DNA da porção não-recombinante do cromossomo Y em 200 homens não aparentados, de 4 regiões geográficas brasileiras (CARVALHO-SILVA *et al.*, 2001). Esse estudo revelou que a grande maioria dos cromossomos Y é de origem européia, que apenas 2.5% dos cromossomos são oriundos da África, não se detectando nenhuma linhagem ameríndia. Esses dados contrastam com os relativos a análise do DNA mitocondrial acima mencionada, refletindo a história da colonização do país, período durante o qual os homens europeus tiveram seus filhos com mulheres ameríndias ou africanas.

Ao nosso ver, esses fatos conduzem à necessidade de se avaliar a população do estado de São Paulo como uma unidade, ou seja, um grupo cuja identidade é a heterogeneidade étnica, opinião essa anteriormente manifestada por GOLDBERG *et al.* (1998).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que, nessa amostra de doadores da população miscigenada do Estado de São Paulo, foram detectados

valores muito próximos aos observados em outras populações para as repetições CAG, notando-se uma média mais elevada na população chinesa (HSING *et al.*, 2000). Quanto às repetições GGN, os presentes resultados (Tabela XX) são muito semelhantes aos descritos por PLATZ *et al.* (1998) e HSING *et al.* (2000), em populações norte-americana e chinesa, respectivamente. Curiosamente, os valores médios relatados por STANFORD *et al.* (1997) e EDWARDS *et al.* (1999), em norte-americanos e britânicos, respectivamente, são nitidamente inferiores.

Em relação ao polimorfismo S1/S2, as frequências alélicas detectadas nos doadores (S1=0,2 e S2=0,8) não diferem significativamente das descritas por LU & DANIELSEN (1996) para uma amostra de indivíduos caucasóides norte americanos (S1=0,13 e S2=0,87; $\chi^2=1,63$, $p=0,2$). Por outro lado, frequências muito diferentes foram relatadas em negros norte americanos (n=204) por ROSS *et al.* (1999), correspondentes a 0,58 para o alelo S1 e 0,42 para S2. É possível que tais diferenças estejam relacionadas a grupos étnicos específicos da população norte-americana. Os resultados da comparação das frequências alélicas entre os subgrupos caucasóides e negróides da nossa amostra total de doadores não suportam a hipótese de variação étnica para este polimorfismo ($\chi^2=0,16$; $p=0,68$), em nossa população.

Tabela XX - Distribuição do número de repetições CAG e GGN em diferentes populações.

nº. Repetições	Mínimo	Máximo	Média	n*	Autores	População
CAG	6	39	21	588	GIOVANNUCCI <i>et al.</i> (1997)	Norte-Americana
	11	32	21,98	266	STANFORD <i>et al.</i> (1997)	Norte-Americana
	12	30	21,7	186	BRATT <i>et al.</i> (1999)	Europeia (Sueca)
	13	30	21	390	EDWARDS <i>et al.</i> (1999)	Europeia (Inglaterra)
	8	37	22	882	KRITHIVAS <i>et al.</i> (1999)	Norte-Americana
	10	33	23	300	HSING <i>et al.</i> (2000)	Chinesa
	11	32	21,9	305	LANGE <i>et al.</i> (2000)	Norte-Americana
	11	28	20,65	200	Presente trabalho	Brasileira
	3	18	15,71	250	STANFORD <i>et al.</i> (1997)	Norte-Americana
	10	29	23	794	PLATZ <i>et al.</i> (1998)	Norte-Americana
GGN	9	21	16	284	EDWARDS <i>et al.</i> (1999)	Europeia (Inglaterra)
	14	27	23	295	HSING <i>et al.</i> (2000)	Chinesa
	10	26	22,38	200	Presente trabalho	Brasileira

n* - número de cromossomos.

Tabela XXI - Distribuição dos genótipos Val/Val, Val/Leu e Leu/Leu em diferentes populações

	Val/Val	Val/Leu	Leu/Leu	Leu89	n	Autores	População
Val89Leu	0,46	0,42	0,12	0,32	286	MAKRIDAKIS <i>et al.</i> (1997)	Norte-Americana
	0,47	0,43	0,10	0,31	386	FEBBO <i>et al.</i> (1999)	Norte-Americana
	0,43	0,49	0,08	0,32	108	LUNN <i>et al.</i> (1999)	Norte-Americana
	0,50	0,40	0,10	0,3	245	JAFFE <i>et al.</i> (2000)	Norte-Americana
	0,52	0,40	0,08	0,28	611	ALLEN <i>et al.</i> (2001)	Europeia (Inglaterra)
	0,44	0,42	0,14	0,35	200	Presente trabalho	Brasileira

n - número de indivíduos.

Quanto ao gene *SRD5A2*, as frequências alélicas do polimorfismo Val89Leu são praticamente idênticas às descritas para populações norte-americanas e européias (Tabela XXI).

O alelo Thr49 não foi detectado no presente trabalho, provavelmente em virtude de sua baixa frequência e do número de amostras analisadas. MAKRIDAKIS *et al.* (1999) identificaram esse alelo em 1,5% da população estudada em seu trabalho (14/922), e JAFFE *et al.* (2000) em 3,5% de sua amostra (n=242).

Nossos dados indicam que as frequências dos quatro marcadores estudados (CAG, GGN, S1/S2 e Val89Leu) assemelham-se aos resultados observados em populações Norte-Americanas (descendentes de europeus, africanos e de latinos) e Européias. Dessa forma, conclui-se que os fatores genéticos relacionados ao risco de câncer de próstata, considerados relevantes na maioria das populações, também podem ser aplicados a essas populações urbanas brasileiras, onde contribuições significativas de “pools” gênicos de europeus e de africanos podem ser encontradas. Por outro lado, o papel da contribuição de ameríndios/asiáticos em relação a esses polimorfismos em nossa população ainda precisa ser estudado.

2- POLIMORFISMOS GENÉTICOS

2.1- O RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

No presente trabalho, não houve associação entre o número de repetições CAG e o risco de câncer de próstata, de modo semelhante ao descrito por outros autores, em outras populações (BRATT *et al.*, 1999; EDWARDS *et al.*, 1999; LANGE *et al.*, 2000).

Alguns autores detectaram um aumento do risco de câncer de próstata em indivíduos com <22 repetições CAG (IRVINE *et al.*, 1995; STANFORD *et al.*, 1997). HARDY *et al.* (1996) e HSING *et al.* (2000) observaram um maior risco em homens com <23 CAG, enquanto que para GIOVANNUCCI *et al.* (1997), indivíduos com ≤ 18 CAG teriam um maior risco para a doença. Para INGLES *et al.* (1997) e KANTOFF *et al.* (1998) um risco aumentado de câncer de próstata foi associado a alelos com <20 repetições.

A falta de modelos uniformes de análise dificulta a interpretação desses dados. Como visto acima, GIOVANNUCCI *et al.* (1997) detectaram um risco aumentado quando compararam homens com ≤ 18 e ≥ 26 repetições CAG. Esse risco desaparece quando homens com ≤ 18 repetições são comparados com o restante da amostra. Portanto, os critérios para a divisão em classes nem sempre são muito claros nos trabalhos publicados. IRVINE *et al.* (1995); STANFORD *et al.* (1997) e HSING *et al.* (2000) usaram o número médio de repetições para dividir suas populações para fins de análise de risco, sendo este o critério adotado no presente trabalho.

As repetições GGN são menos polimórficas do que as repetições CAG. Apesar disso, a variação no número de repetições GGN tem sido amplamente

estudada em relação ao risco de câncer de próstata (EDWARDS *et al.*, 1999), também gerando resultados controversos.

Para IRVINE *et al.* (1995) e EDWARDS *et al.* (1999) longos alelos GGN (>16) estão associados a um risco aumentado para a doença, enquanto que HAKIMI *et al.* (1997) e STANFORD *et al.* (1997) detectaram um maior risco em homens com “alelos curtos” GGN (≤ 14 e ≤ 16 repetições, respectivamente).

HSING *et al.* (2000) detectaram um risco aumentado em indivíduos com menos de 23 repetições GGN. Assim como no trabalho de HSING *et al.* (2000), utilizamos o número médio de repetições para separar a amostra em duas classes (≥ 22 e < 22). Nossos dados indicam que “alelos curtos” (< 22) conferem um risco maior de câncer de próstata, enquanto que portadores de alelos ≥ 22 repetições seria beneficiados por um provável “efeito protetor”.

Segundo PLATZ *et al.* (1998) 23 repetições confeririam uma atividade e conformação ótima à proteína AR, não havendo uma relação linear entre o número de repetições GGN e o risco de câncer de próstata, mas o risco poderia diminuir com o desvio, para qualquer direção, do número médio de repetições (23), em consequência da diminuição na atividade do AR. Sob esse aspecto, o risco máximo para a doença deveria ser atribuído ao alelo com 23 repetições, o que não foi observado no presente trabalho.

Assim, a maior dos estudos indica que há uma relação inversa entre o número de repetições GGN e o risco para câncer de próstata, o que é suportado por observações *in vitro* de que a deleção da região de poliglicinas reduz a atividade transcricional do AR (GAO, MARCELLI, MCPAUL 1996).

Embora o número de repetições CAG pareça não influenciar no risco de câncer de próstata, alguns estudos tentaram relacionar esse polimorfismo com o número de repetições GGN na modulação do risco. Apenas STANFORD *et al.*

(1997) detectaram um risco aumentado para a doença em indivíduos com <22 repetições CAG e <16 repetições GGC. No presente trabalho, nenhuma associação entre o risco de câncer de próstata e o número de repetições CAG e GGN foi observada, de modo semelhante ao relatado por outros autores (CORREA-CERRO *et al.*, 1999; EDWARDS *et al.*, 1999).

Dados conflitantes também foram encontrados em relação à análise de ligação entre esses dois microsatélites. Tal como relatado por MACKE *et al.* (1993), não foi observado desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos CAG e GGN no presente trabalho. Entretanto, IRVINE *et al.* (1995) constataram uma associação preferencial entre esses dois polimorfismos em pacientes com câncer de próstata. Posteriormente, PLATZ *et al.* (1998) relataram a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre esses dois microsatélites, tanto em controles como em pacientes.

Para o polimorfismo S1/S2, somente ROSS *et al.* (1999) detectaram um risco aumentado para a doença em homens portadores do alelo S1. Resultados da análise do RR, no presente trabalho, revelaram que o alelo S1 poderia ser responsável por um aumento no risco para a doença (RR=1,53), enquanto o S2 teria um “efeito protetor” (RR=0,65).

Em relação à análise de ligação, não observamos associação preferencial entre os polimorfismos CAG e S1/S2. Quando as repetições CAG foram divididas em classes e combinadas com S1/S2, não se detectou qualquer relação com o risco de câncer de próstata.

Entretanto, observou-se desequilíbrio de ligação entre as repetições GGN e S1/S2, tanto em doadores como em pacientes. Nesta situação foi possível detectar um maior risco para a doença associado às combinações <22 e S2 (RR=1,98) e ≥22 e S1 (RR = 1,41), e um “efeito protetor” para a combinação ≥ 22 e S2 (RR=0,54). Ao que parece, no primeiro caso (<22 GGN e S2), o componente

principal do risco é representado pelos alelos com menos de 22 repetições e no segundo (≥ 22 GGN e S1), pelo alelo S1.

Seria esperado então, que a combinação <22 GGN e S1 conferisse o maior risco. De fato, nesse caso o risco relativo acha-se aumentado ($RR=1,47$), porém de modo não significativo, provavelmente em função do pequeno número de indivíduos nessa categoria. Por outro lado, o efeito do polimorfismo S1/S2 pode estar indiretamente associado ao desequilíbrio de ligação com as repetições GGN, que teriam uma influência direta no risco de câncer de próstata.

Quando os três polimorfismos foram analisados em conjunto, foi possível detectar um maior risco para a combinação ≥ 20 CAG <22 GGN S2 ($RR=2,74$) e um efeito protetor para a combinação $\geq 20 \geq 22$ S2 ($RR=0,64$). Ao nosso ver, esses resultados reforçam a hipótese de que o componente principal, se não único, para o risco de câncer de próstata, é o número de repetições GGN.

2.2- A 5 α -REDUTASE TIPO II

No presente trabalho, não houve associação entre o polimorfismo Val89Leu e o risco de câncer de próstata, de modo semelhante ao descrito por outros autores. Quando os genótipos Val/Leu e Leu/Leu foram comparados ao suposto genótipo de “maior risco” Val/Val (MAKRIDAKIS *et al.*, 1997), nenhuma relação deste com o aumento de risco da doença foi detectada (FEBBO *et al.*, 1999; LUNN *et al.*, 1999; JAFFE *et al.*, 2000).

Quanto à hipótese de que o alelo Leu89 teria um “efeito protetor” para a neoplasia da próstata (MAKRIDAKIS *et al.*, 1997), nossos dados não fornecem evidências de que esse alelo possa conferir tal efeito. JAFFE *et al.* (2000) obtiveram resultados semelhantes, e ainda detectaram um maior, porém não significativo, risco associado a este alelo.

Os trabalhos que suportam a hipótese de que o polimorfismo Val89Leu possa ser um fator de risco para o câncer de próstata utilizam para tal a medida dos níveis séricos de AAG (MAKRIDAKIS *et al.*, 1997), que seriam mais baixos no genótipo Leu/Leu. Entretanto, sabe-se que grande parte do AAG sérico é derivado de fontes não-prostáticas, não sendo, pois, um bom indicador da atividade da 5 α -redutase na próstata (HORTON, 1982; MOGHISSI, ABLAN, HORTON, 1984; HORTON, HAWKS, LOBO, 1992). Para ALLEN, FORREST, KEY (2001), as concentrações de AAG não estão significativamente associadas ao genótipo Leu/Leu, não sendo este polimorfismo um bom indicador de atividade sérica da 5 α -redutase.

Em relação à substituição Ala49Thr, no presente trabalho, nenhum alelo Thr49 foi detectado tanto em doadores como em pacientes. A baixa frequência deste alelo torna questionável qualquer tipo de associação desta substituição com o risco de câncer de próstata. Apesar disso, MAKRIDAKIS *et al.* (1999) e JAFFE *et al.* (2000) sugerem que esse polimorfismo possa influenciar as características patológicas da doença e ainda afetar o prognóstico, pois o alelo Thr49 foi relacionado às formas mais invasivas da doença.

VI- CONCLUSÕES



- ✓ As frequências de quatro marcadores moleculares estudados (CAG, GGN, S1/S2 do gene *AR* e Val89Leu do gene *SRD5A2*) assemelham-se às descritas em populações norte-americanas e européias;
- ✓ O alelo Thr49 do gene *SRD5A2* não foi detectado entre os doadores de sangue nem entre pacientes, sendo provavelmente uma variante muito rara em nossa população;
- ✓ Não se observou qualquer associação entre o número de repetições CAG e o risco de câncer de próstata;
- ✓ Alelos “curtos” GGN (<22) parecem conferir um risco maior de câncer de próstata, enquanto portadores de alelos ≥ 22 repetições seriam beneficiados por um provável “efeito protetor”;
- ✓ Nenhuma associação entre o número de repetições CAG/GGN e o risco de câncer de próstata foi detectada;
- ✓ Observou-se um risco aumentado para a doença em indivíduos portadores do alelo S1;
- ✓ Quando os três polimorfismos do gene *AR* são analisados em conjunto, os resultados obtidos reforçam a hipótese de que o componente principal para o risco de câncer de próstata é o número de repetições GGN;
- ✓ Não houve associação entre o polimorfismo Val89Leu e o risco de câncer de próstata;

- ✓ Os fatores genéticos relacionados ao risco de câncer de próstata, considerados relevantes na maioria das populações, também podem ser aplicados a populações urbanas brasileiras, onde contribuições significativas de “pools” gênicos de europeus e de africanos podem ser encontradas.

VII- SUMMARY



There is evidence to support the hypothesis of hormonal etiology of prostate cancer involving androgen action. Testosterone is synthesized from cholesterol by a series of reactions involving cytochrome P450 enzymes and is converted to dihydrotestosterone (DHT), a more potent androgen, by 5 α -reductase type 2 (*SRD5A2*) in many androgen-dependent target tissues. DHT binds to androgen receptor (*AR*), and the DHT-*AR* complex transactivates a number of genes with *AR*-responsive elements.

The aim of this study was to evaluate the distribution of polymorphisms for the *AR* (CAG, S1/S2, GGN), and *SRD5A2* (Ala49Thr, Val89Leu) genes that are considered of relevance for prostate cancer risk, among 200 individuals from two cities of the Sao Paulo state, and in 92 prostate cancer patients by PCR, PCR-RFLP and ASOH techniques.

Our data shows that the allelic frequencies of these markers are very similar to those described in North American and European populations. Thus, the prostate cancer genetic risk factors that are considered of relevance in most populations can also be taken into account in Brazilian urban populations, where significant contributions from European and African gene pools can be found. Concerning the prostate cancer patients, our results suggest that the number of GGN repeats seems to be the most reliable marker for prostate cancer risk.

VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- ALLEN, N.E.; FORREST, M.S.; KEY, T.J. The association between polymorphisms in the *CYP17* and 5alpha-reductase (*SRD5A2*) genes and serum androgen concentrations in men. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **10**:185-189,2001.
- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M.S.; PENA, S.D.J.; PRADO, V.F. Multiple geographic sources of region V 9-bp deletion haplotypes in brazilians. **Hum. Biol.**, **71**: 245-259,1999.
- AIRES, M.; AYRES, M.J.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **Biostat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá, 1998, 193p.
- AZEVEDO, E. **Raça Conceito e Preconceito**. São Paulo: Ed. Ática, 1987, 63p.
- BARRET-CONNOR, E.; GARLAND C., McPHILIPS, J.B.; KHAW, K.T.; WINGARD, D.L. A prospective, population-based study of androstenedione, estrogens, and prostatic cancer. **Cancer Res.**, **50**: 169-173,1990.
- BEECHER, G.R. Nutrient content of tomatoes and tomato products. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **218**:98-100,1998.
- BERRY, R.; SCHAID, D.; SMITH, J.R.; FRENCH, A.; SCHROEDER, J.; McDONNELL, S.; PETERSON, B.J.; WANG, Z.Y.; CARPTEN, J.D.; ROBERTS, S.G.; TESTER, D.J.; BLUTE, M.; TRENT, J.; THIBODEAU, S. Linkage analyses at the chromosome 1 loci 1q24-25 (HPC1), 1q42.2-43 (PCAP), and 1p36 (CAPB) in families with hereditary prostate cancer. **Am. J. Hum. Genet.**, **66**: 539-546,2000.

- BERTON, P.; VALERI, A.; COHEN-AKENINE, A.; DRELON, E.; PAISS, T.; WOHR, G.; LATIL, A. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. **Am. J. Hum. Genet.**, **62**: 1416-1424, 1998.
- BLANDY, J.P. & LYTTON, B. – What is the prostate and what for? In: _____ - **The Prostate**. London, Butterworth & Co., 1986. p.1-22.
- BOSLAND, M.C. The etiopathogenesis of prostatic cancer with special reference to environmental factors. **Adv. Cancer Res.**, **50**: 1-106, 1988.
- BOSLAND, M.C. Possible enhancement of prostate carcinogenesis by some chemopreventive agents. **J. Cell Biochem.**, (suppl 16H): 135-137, 1992.
- BOSLAND, M.C. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr.**, **27**: 39-66, 2000.
- BOSLAND, M.C.; OAKLEY-GIRVAN, I.; WHITTEMORE, A.S. Dietary fat, calories, and prostate cancer risk. **J. Natl. Cancer Inst.**, **91**: 489-491, 1999.
- BOUSEMA, J.T.; BUSSEMAKERS, M.J.; VAN HOUWELINGEN, K.P.; DEBRUYNE, F.M.; VERBEEK, A.L.; de LA ROSETTE, J.J.; KIEMENEY, L.A. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and the androgen receptor gene and the risk of benign prostatic hyperplasia. **Eur Urol.**, **37**: 234-238, 2000.

- BRATT, O.; BORG, A.; KRISTOFFERSSON, U.; LUNDGREN, R.; ZHANG Q.X.; OLSSON, H. CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. **Br. J. Cancer**, **81**: 672-676,1999.
- CANARY, P.C.V. & SOUHAMI, F.L. Câncer de Próstata – Revisão. **Rev. Bras. Cir.**, **79**: 13-20,1989.
- CAREY, A.H.; WATERWORTH, D.; PATEL, K.; WHITE, D.; LITTLE, J.; NOVELLI, P.; FRANKS, S.; WILLIAMSON, R. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. **Hum. Mol. Genet.**, **3**:1873-1876,1994.
- CARTER, B.S.; BEATY, T.H.; STEINBERG, G.D.; CHILDS, B.; WALSH, P.C. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. **Proc. Natl. Acad Sci. USA**, **89**: 3367-3371,1992.
- CARVALHO-SILVA, D.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, J.; PENA, S.D.J. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **Am. J. Hum. Genet.**, **68**: 281-286,2001.
- CHAMBERLAIN, N.L.; DRIVER, E.D.; MIESFIELD, R.L. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. **Nucleic Acids Res.**, **22**: 3181-3186,1994.
- COETZEE, G.A. & ROSS, R.K. Prostate cancer and androgen receptor. **J. Natl. Cancer Inst.**, **86**: 872-873,1994.

- COFFEY, D.S. The molecular biology of the prostate. *In*: H. Lerpör & R.K. Lawson (eds.), **Prostate Diseases**, pp. 28-56. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993.
- COMSTOCK, G.W.; GORDON, G.B.; HISING, A.W. The relationship of serum dehydroepiandrosterone and its sulfate to subsequent cancer of the prostate. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **2**: 219-221, 1993.
- CORREA-CERRO, L.; WOHR, G.; HAUSSLER, J.; BERTHON, P.; DRELON, E.; MANGIN, P.; FOURNIER, G.; CUSSENOT, O.; KRAUS, P.; JUST, W.; PAISS, T.; CANTU, J.M.; VOGEL, W. (CAG)_nCAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with prostate cancer in a French-German population. **Eur. J. Hum. Genet.**, **7**: 357-362, 1999.
- DAI, W.S.; GUTAI, J.P.; KULLER, L.H.; CAULEY, J.A. Cigarette smoking and serum sex hormones in men. **Am. J. Epidemiol.**, **128**: 796-805, 1988.
- DAVID, D.L. & RUSSEL, R.W. Unusual length polymorphism in human steroid 5 α -reductase type 2 gene (SRD5A2). **Hum. Mol. Genet.**, **2**: 820, 1993.
- DE JONG, F.H.; OISHI, K.; HAYES, R.B.; BOGDANOWICZ, J.F.; RAATGEVER, J.W.; van der MAAS, P.J.; YOSHIDA, O.; SCHROEDER, F.H. Peripheral hormone levels in controls and patients with prostatic cancer or benign prostatic hyperplasia: results from the Dutch-Japanese case-control study. **Cancer Res.**, **51**: 3445-3450, 1991.

- DEMARK-WAHNEFRIED, W.; LESKO, S.M.; CONAWAY, M.R.; ROBERTSON, C.N.; CLARK, R.V.; LOBAUGH, B.; MATHIAS, B.J.; STRIGO, T.S.; PAULSON, D.F. Serum androgens: associations with prostate cancer risk and hair patterning. **J. Adrol.**, **18**: 495-500,1997
- DEVGAN, S.A.; HENDERSON, B.E.; YU, M.C.; SHI, C.Y.; PIKE, M.C.; ROSS, R.K.; REICHARDT, J.K. Genetic variation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II in three racial/ethnic groups: implications for prostate cancer risk. **Prostate**, **33**: 9-12,1997.
- DI MASCO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.**, **274**:532-538,1989.
- DOLL, R.; PETO, R.; WHEATLEY, K.; GREY, R.; SUTHERLAND, I. Mortality in relation to smoking 40 years' observations on male British doctors. **BMJ.**, **309**: 901-911,1994.
- DORGAN, J.F.; ALBANES, D.; VIRTAMO, J.; HEINONEN, O.P.; CHANDLER, D.W.; GALMARINI, M.; MCSHANE, L.M.; BARRETT, M.J.; TANGREA, J.; TAYLOR, P.R. Relationships of serum androgens and estrogens to prostate cancer risk: results from a prospective study in Finland. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **7**:1069-1074,1998.
- DORGAN, J.F.; JUDD, J.T.; LONGCOPE, C.; BROWN, C.; SCHATZKIN, A.; CLEVIDENCE, B.A.; CAMPBELL, W.S.; NAIR, P.P.; FRANZ, C.; KAHLE, L.; TAYLOR, P.R. Effects of dietary fat and fiber on plasma and urine androgens and estrogens in men: a controlled feeding study. **Am. J. Clin. Nutr.**, **64**: 850-855,1996.

- EDWARDS S.M.; BADZIOCH, M.D.; MINTER, R.; HAMOUDI, R.; COLLINS, N.; ARDERN-JONES, A.; DOWE, A.; OSBORNE, S.; KELLY, J.; SHEARER R.; EASTON, D.F.; SAUNDERS, G.F.; DEARNALEY, D.P.; EELES, R.A. Androgen receptor polymorphisms: Association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. **Int. J. Cancer**, **84**: 458-465,1999.
- EDWARDS, A.; HAMMOND, H.A.; JIN, L.; CASKEY, C.T.; CHAKRABORTY, R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, **12**: 241-253,1992.
- FEBBO, P.G.; KANTOFF, P.W.; PLATZ, E.A.; CASEY, D.; BATTER, S.; GIOVANNUCCI, E.; HENNEKENS, C.H.; STAMPFER, M.J. The V89L polymorphism in the 5alpha-reductase type 2 gene and risk of prostate cancer. **Cancer Res.**,**59**:5878-5881,1999.
- FEIGELSON, H.S.; COETZEE, G.A.; KOLONEL, L.N.; ROSS, R.K.; HENDERSON, B.E. A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer. **Cancer Res.**, **57**:1063-1065,1997.
- FELDMAN, D. Androgen and vitamin D receptor gene polymorphisms: The long and short of prostate cancer risk. **J. Natl. Cancer Inst.**, **89**: 109-111,1997.
- FERREIRA, U. & NARDI, C.A. – Câncer de Próstata. In: NETTO, N.R - **Urologia Prática**. 4ed. São Paulo, Atheneu,1999. p.237-248.
- FINCHAM, S.M.; HILL, G.B.; HANSON, J.; WIJAYASINGHE, C. Epidemiology of prostatic cancer: a case-control study. **Prostate**, **17**: 189-206,1990.

- GALBRAITH, S.M. & DUCHENSE, G.M. Androgens and prostate cancers: biology, pathology and hormonal therapy. **Eur. J. Cancer**, **33**: 545-554,1997.
- GANN, P.H.; HENNEKENS, C.H.; MA, J.; LONGCOPE, C.; STAMPFER, M.J. Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. **J. Natl Cancer Inst.**, **88**:1118-1126,1996.
- GANN, P.H.; MA, J.; GIOVANNUCCI, E.; WILLETT, W.; SACKS, F.M.; HENNEKENS, C.H.; STAMPFER, M.J. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. **Cancer Res.**, **59**:1225-1230,1999.
- GAO, T.; MARCELLI, M.; MCPAUL, M.J. Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, **59**: 9-20,1996.
- GIBBS, M.; STANFORD, J.L.; McINDOE, R.A.; JARVIK, G.P.; KOLB, S.; GOODE, E.L.; CHAKRABARTI, L.; SCHUSTER, E.F.; BUCKLEY, V.A.; MILLER, E.L.; BRANDZEL, S.; LI, S.; HOOD, L.; OSTRANDER, E.A. Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. **Am. J. Hum. Genet.**, **64**: 776-787,1999.
- GIOVANNUCCI, E.; STAMPFER, M.J.; KRITHIVAS, K.; BROWN, M.; DAHL, D.; BRUFISKY, A.; TALCOTT, J.; HENNEKENS, C.H.; KANTOFF, P.W. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**: 3320-3323,1997.

- GIOVANNUCCI, E.; LEITZMANN, M.; SPIEGELMAN, D.; RIMM, E.B.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C. A prospective study of physical activity and prostate cancer in male health professionals. **Cancer Res.**, **58**: 5117-5122,1998.
- GIOVANNUCCI, E.; STAMPFER, M.J.; CHAN, A.; KRITHIVAS, K.; GANN, P.H.; HENNEKENS C.H.; KANTOFF, P. CAG repeat within the androgen receptor gene and incidence of surgery for benign prostatic hyperplasia in the U.S. physicians. **Prostate**, **39**: 130-134,1999.
- GIOVANNUCCI E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and prostate cancer: review of the epidemiologic literature. **J. Natl. Cancer Inst.**, **91**:317-331,1999.
- GREENLEE, R.T.; MURRAY, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P.A. Cancer statistics, 2000. **C.A. Cancer J. Clin.**, **50**:7-33, 2000.
- GRIFFITS, K.; MORTON, M.S.; NICHOLSON, R.I. Androgens, androgens receptors, antiandrogens and treatment of prostate cancer. **Eur. Urol.**, **32**: 24-40,1997.
- GRÖNENBERG, H.; XU, J.; SMITH, J.R.; CARPTEN, J.D.; ISAACS, S.D.; FREIJE, D.; BOVA, G.S.; WALSH, P.C.; COLLINS, F.S.; TRENT, J.M.; MEYERS, D.A.; ISAACS, W.B. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. **Cancer Res.**, **57**: 4707-4709,1997.

- GRÖNENBERG, H.; SMITH, J.R.; EMANUELSSON, M.; JONSSON, B.A.; BERGH, A.; CARPTEN, J.D.; ISAACS, W.B.; XU, J.; MEYERS, D.A.; TRENT, J.M.; DAMBER, J.E. In Swedish families with hereditary prostate cancer, linkage to the HPC1 locus on chromosome 1q24-25 is restricted to families with early onset prostate cancer. **Am. J. Hum. Genet.**, **65**: 134-140,1999.
- GSUR, A.; BERNHOFER, G.; HINTEREGGER, S.; HAIDINGER, G.; SCHATZL, G.; MADERSDACHER, S.; MARBERGER, M.; VUTUC, C.; MICKSCHE, M. A polymorphism in the CYP17 gene is associated with prostate cancer risk. **Int. J. Cancer**, **87**: 434-437,2000.
- GUTTENPLAN, J.B.; CHEN, M.; KOSINSKA, W.; THOMPSON, S.; ZHAO, Z.; COHEN, L.A. Effects of a lycopene-rich diet on spontaneous and benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in prostate, colon and lungs of the lacZ mouse. **Cancer Lett.**, **164**:1-6,2001.
- HABEL, L.A.; VAN DEN EEDEN S.K.; FRIEDMAN, G.D. Body size, age at shaving initiation, and prostate cancer in a large, multiracial cohort. **Prostate**, **43**: 136-143,2000.
- HABUCHI, T.; LIQING, Z.; SUZUKI, T.; SASAKI, R.; TSUCHIYA, N.; TACHIKI, H.; SHIMODA, N.; SATOH, S.; SATO, K.; KAKEHI, Y.; KAMOTO, T.; OGAWA, O.; KATO, T. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with a CYP17 gene polymorphism with a gene dosage effect. **Cancer Res.**, **60**: 5710-5713, 2000.

- HABUCHI, T.; SUZUKI, T.; SASAKI, R.; WANG, L.; SATO, K.; SATOH, S.; AKAO, T.; TSUCHIYA, N.; SHIMODA, N.; WADA, Y.; KOIZUMI, A.; CHIHARA, J.; OGAWA, O.; KATO, T. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population. **Cancer Res.**, **60**: 305-308,2000.
- HAKIMI, J.M.; SCHOENBERG, M.P.; RONDINELLI, R.H.; PIANTADOSI, S.; BARRACK, E.R. Androgen receptor variants with short glutamine or glycine repeats may identify unique subpopulations of men with prostate cancer. **Clin. Cancer Res.**, **3**: 1599-1608, 1997.
- HAMAJIMA, N.; IWATA, H.; OBATA, Y.; MATSUO, K.; MIZUTANI, M.; IWASE, T.; MIURA, S.; OKUMA, K.; OHASHI, K.; TAJIMA, K. No association of the 5' promoter region polymorphism of CYP17 with breast cancer risk in Japan. **Jpn. J. Cancer Res.**, **91**: 880-885,2000
- HANKIN, J.H.; ZHAO, L.P.; WILKENS, L.R.; KOLONEL, L.N. Attributable risk of breast, prostate, and lung cancer in Hawaii due to saturated fat. **Cancer Causes Control**, **3**: 17-23,1992.
- HARDY, D.O.; SCHER, H.I.; BOGENREIDER, T.; SABBATINI, P.; ZANG, Z.F.; NANUS, D.M.; CATTERALL, J.F. Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **81**: 4400 – 4405,1996.
- HAYES, R.B.; POTTERN, L.M.; SWANSON, G.M.; LIFF, J.M.; SCHOENBERG, J.B.; GREENBERG, R.S.; SCHWARTZ, A.G.; BROWN, L.M.; SILVERMAN, D.T.; HOOVER, R.N. Tobacco use and prostate cancer in blacks and whites in the united states. **Cancer Caus. Contr.**, **5**: 221-226,1994.

- HAYES, R.B. Are dietary fat and vasectomy risk factors for prostate cancer? **J. Natl. Cancer Inst.**, **87**: 629-631, 1995.
- HAYES, R.B.; BROWN, L.M.; SCHOENBERG, J.B.; GREENBERG, R.S.; SILVERMAN, D.T.; SCHWATZ, A.G.; SWANSON, G.M.; BENICHOU, J.; LIFF, J.M.; HOOVER, R.N.; POTTEN, L.M. Alcohol use and prostate cancer risk in US blacks and whites. **Am. J. Epidemiol.**, **143**: 692-697, 1996.
- HAYES, R.B.; ZIEGLER, R.G.; GRIDLEY, G.; SWANSON, C.; GREENBERG, R.S.; SWANSON, G.M.; SCHOENBERG, J.B.; SILVERMAN, D.T.; BROWN, L.M.; POTTERN, L.M.; LIFF, J.; SCHWARTZ, A.G.; FRAUMENI, J.F.; HOOVER, R.N. Dietary factors and risks for prostate cancer among blacks and whites in the United States. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **8**: 25-34, 1999.
- HEDERSON, B.E.; ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; CASAGRANDE, J.T. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. **Cancer Res.**, **42**: 3232-3239, 1982.
- HONDA, G.D.; BERNSTEIN, L.; ROSS, R.K.; GREENLAND, S.; GERKINS, V.; HENDERSON, B.E. Vasectomy, cigarette smoking, and age at first sexual intercourse as risk factors for prostate cancer in middle-aged men. **Br. J. Cancer**, **57**: 326-331, 1988.
- HORTON, R. Dihydrotestosterone is a peripheral paracrine hormone. **J. Androl.**, **13**: 23-27, 1982.
- HORTON, R.; HAWKS, D.; LOBO, R. $3\alpha,17\beta$ -androstenediol glucoronide in plasma. **J. Clin. Invest.**, **69**: 1203-1206, 1992.

- HSING, A.W.; COMSTOCK, G.W.; ABBEY, H.; POLK, B.F. Serologic precursors of cancer. Retinol, carotenoids, and tocopherol and risk of prostate cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, **82**:941-946, 1990a.
- HSING, A.W.; McLAUGHLIN, J.K.; SCHUMAN, L.M.; BJELKE, E.; GRIDLEY, G.; WACHOLDER, S.; CoCHIEN, H.T.; BLOT, W.J. Diet, tobacco use, and fatal prostate cancer: results from the lutheran brotherhood cohort study. **Cancer Res.**, **50**: 6836-6840, 1990b.
- HSING, A.W.; McLAUGHLIN, J.K.; HRUBEC, Z.; BLOT, W.J.; FRAUMENI J.F. Tobacco use and prostate cancer: 26- year follow-up of US Veterans. **Am. J. Epidemiol.**, **133**: 437-441, 1991.
- HISING, A.W. & COMSTOCK, G.W. Serological precursors of cancer: serum hormones and risk of subsequent prostate cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **2**: 27-32, 1993.
- HSING, A.W.; GAO, Y.T.; WU, G.; WANG, X.; DENG, J.; CHEN, Y.L.; SESTERHENN, A.; MOSTOFI, F.K.; BENICHO, J.; CHANG, C. Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. **Cancer Res.**, **60**: 5111-5116, 2000.
- IMPERATO-McGINLEY, J.; GAUTIER, T.; ZIRINSKY, K.; HOM, T.; PALOMO, O.; STEIN, E.; VAUGHAN, E.D.; MARKISZ, J.A.; RAMOREZ, A.E.; KAZAM, E. Prostate visualization studies in males homozygous and heterozygous for 5 alpha-reductase deficiency. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **75**: 1022-1026, 1992.

- INCA: Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**,2000.
- INGLES, S.A.; ROSS, R.K.; YU, M.C.; IRVINE, R.A.; LA PERA, G.; HAILE, R.W.; COETZEE, G.A. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. **J. Natl. Cancer Inst.**, **89**: 166-170,1997.
- IRVINE, R.A.; YU, M.C.; ROSS, R.K.; COETZEE, G.A. The CAG and GGC microsatellites of androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. **Cancer Res.**, **55**: 1937-1940,1995.
- JAFFE, J.M.; MALKOWICZ, S.B.; WALKER, A.H.; MACBRIDE, S.; PESCHEL, R.; TOMASZEWSKI, J.; ARADALEM, K.V.; WEIN, A.J.; REBBECK, T.R. Association of *SRD5A2* genotype and pathological characteristics of prostate tumors. **Cancer Res.**,**60**: 1626-1630,2000.
- JOHN, E.M.; WHITTEMORE, A.S.; WU, A.H.; KOLONEL, L.N.; HISLOP, T.G.; HOWE, G.R.; WEST, D.W.; HANKIN, J.; DREON, D.M.; TEH, C.Z. Vasectomy and prostate cancer: results from a multiethnic case-control study. . **J. Natl. Cancer Inst.**,**87**:662–669,1995.
- KAZEMI-ESFARJANI, P.; TRIFIRO, M.A.; PINSKY, L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: Possible pathogenic relevance for the (CAG)_n-expanded neuropathies. **Hum. Molec. Genet.**, **4**: 523-527,1995.
- KIRBY, R. & CHRISTMAS, T. – **Benign Prostatic Hyperplasia**. Hong Kong, Wolfe,1993. 107p.

- KOLONEL, L.N.; NOMURA, A.M.; COONEY, R.V. Dietary fat and prostate cancer: current status. **J. Natl. Cancer Inst.**, **91**: 414-428,1999.
- KOLONEL, L.N. Nutrition and prostate cancer. **Cancer Causes Control**, **7**: 83-94,1996.
- KATZ, M.D.; CAI, L.Q.; ZHU, Y.; HERRERA, C.; DEFILLORICART, M.; SHACKELETON, H.L.; IMPERATO-MCGINLEY, J. The biochemical and phenotypic characterization of females homozygous for 5 α -reductase deficiency. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **80**: 3160-3167,1995.
- KRIEG, M.; NASS, R.; TUNN, S. Effect of aging on endogenous level of 5 α -dihydrotestosterone, testosterone, estradiol, and estrone in epithelium and stroma of normal and hyperplastic human prostate. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **77**: 375-381,1993.
- KRIEGER, H.; MORTON, N.E.; MI, M.P.; AZEVEDO, E.; FREIRE-MAIA, A.; YASUDA, N. Racial admixture in north-eastern Brazil. **Ann. Hum. Genet.**, **29**:113-125,1965.
- KRISTENSEN, V.N.; HARALDSEN, E.K.; ANDERSON, K.B.; LONNING, P.E.; ERIKSTEIN, B.; KARESEN, R.; GABRIELSEN, S.O.; BORRESEN-DALE, A.L. CYP17 and breast cancer risk: the polymorphism in the 5' flanking area of the gene does not influence binding to Sp-1. **Cancer Res.**, **59**: 2825-2828,1999.
- KRITHIVAS, K.; YURGALEVITCH, S.M.; MOHR, B.A.; WILCOX, C.J.; BATTER, S.J.; BROWN, M.; LONGCOPE, C.; MCKINLAY, J.B.; KANTOFF, P.W. Evidence that CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. **J. Endocrinol.**, **162**: 137-142,1999.

- KRSTEV, S.; BARIS, D.; STEWART, P.; DOSEMICI, M.; SWANSON, G.M.; GREENBERG, R.S. SCHOENBERG, J.B.; SCHWARTZ, A.G.; LIFF, J.M.; HAYES, R.B. Occupational risk factors and prostate cancer in U.S. blacks and whites. **Am. J. Ind. Med.**, **34**: 421-430, 1998.
- LANDRY, G.L. & PRIMOS, W.A. Anabolic steroids abuse. **Adv. Pediatr.**, **37**: 185-205, 1990.
- LANGE, E.M.; CHEN, H.; BRIERLEY, K.; LIVERMORE, H.; WOJNO, K.J.; LANGEFELD, C.D.; LANGE, K.; COONEY, K.A. The polymorphic exon 1 androgen receptor CAG repeat in men with a potential inherited predisposition to prostate cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **9**: 439-442, 2000.
- LOOKINGBILL, P.D.; DEMERS, L.M.; WANG, C.; LEUNG, A.; RITTMASER, R.S.; SANTEN, R.J. Clinical and biochemical parameters of androgen action in normal healthy Caucasian versus Chinese subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **72**: 1242-1248, 1991.
- LÓPEZ-OTÍN, C. & DIAMANDIS, E.P. Breast and prostate cancer: an analysis of common epidemiological, genetic, and biochemical features. **Endocr. Rev.**, **19**: 365-396, 1998.
- LU, J. & DANIELSEN, M. A *Stu I* polymorphism in the human androgen receptor gene (AR). **Clin. Genet.**, **49**: 323-324, 1996.
- LUBAHN, D.B.; BROWN, T.R.; SIMENTAL, J.A.; HIGGS, H.N.; MIGEON, C.J.; WILSON, E.M.; FRENCH, F.S. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **86**: 9534-9538, 1989.

- LUMEY, L.H.; PITTMAN, B.; ZANG, E.A.; WYNDER, E.L.; Cigarette smoking and prostate cancer: No relation with six measures of lifetime smoking habits in a large case-control study among U.S. whites. **Prostate**, **33**: 195-200,1997.
- LUMEY, L.H.; PITTMAN, B.; WYNDER, E.L. Alcohol use and prostate cancer in U.S. whites: No association in a confirmatory study. **Prostate**, **36**: 250-255,1998.
- LUNN, R.M.; BELL, D.A.; MOHLER, J.L.; TAYLOR J.A. Prostate cancer risk and polymorphism in 17 α hydroxylase (*CYP17*) and steroid reductase (*SRD5A2*). **Carcinogenesis**, **20**:1727-1731,1999.
- MACKE, J.P.; HU, N.; HU, S.; BAILEY, M.; KING, V.L.; BROWN, T.; HAMER, D.; NATHANS, J. Sequence variation in the androgen receptor gene is not a common determinant of male sexual orientation. **Am. J. Hum. Genet.**, **53**: 844-852,1993.
- MacMAHON, B.; TRICHOPOULOUS, D.; COLE, P.; BROWN, J. Cigarette smoking and urinary estrogens. **N. Engl. J. Med.**, **307**: 1062-1065,1982.
- MAKRIDAKIS, N.; ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; CHANG, L.; STANCZYK, F.Z.; KOLONEL, L.N.; SHI, C.Y.; YU, M.C.; HENDERSON, B.E.; REICHARDT, J.K.V. A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase. **Cancer Res.**, **57**:1020-1022,1997.
- MAKRIDAKIS, N.M. & REICHARDT, J.K.V. Kinetic and biochemical characterization of naturally occurring variants of the steroid 5 α -reductase type II (*SRD5A2*) gene. **Am. J. Hum. Genet.**, **63**: Supl, 2158,1998.

- MAKRIDAKIS, N.M.; ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; CROCITTO, L.E.; KOLONEL, L.N.; PEARCE, C.L.; HENDERSON, B.E.; REICHARDT, J.K.V. Association of mis-sense substitution in *SRD5A2* gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. **Lancet**, **354**: 975-978,1999
- MAKRIDAKIS, N.M.; DI SALLE, E.; REICHARDT, J.K. Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 α -reductase type II. **Pharmacogenetics**, **10**:407-413,2000.
- MOGHISSI, E.; ABLAN, F.; HORTON, R. Origin of plasma androstenediol glucoronide in men. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **59**: 417-421,1984.
- MORISSETTE, J.; DUROCHER, F.; LEBLANC, J.F.; NORMAND, T.; LABRIE, F.; SIMARD, J. Genetic linkage mapping of the human steroid 5 α -reductase type 2 gene (*SRD5A2*) close to D2S352 on chromosome region 2p23→p22. **Cytogen. Cell Genet.**, **73**: 304-307,1996.
- MORRISON, N.A.; QI, J.C.; TOKITA, A.; KELLY, P.J.; CROFTS, L.; NGUYEN, T.V.; SAMBROOK, P.N.; EISMAN, J.A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. **Nature**, **367**: 284-287,1994.
- NAM, R.K.; TOI, A.; VESPRINI, D.; HO, M.; CHU, W.; HARVIE, S.; SWEET, J.; TRACHTENBERG, J.; JEWETT, M.A.; NAROD, S.A. V89L polymorphism of type-2, 5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. **Urology**,**57**:199-204,2001.
- NETTO, N.R. – Hiperplasia Benigna Prostatática. In :
_____ - **Urologia Prática**. 4ed. São Paulo, Atheneu,1999. p.81-98.

- NOMURA, A.; HEILBRUN, L.K.; STEMMERMANN, G.N.; JUDD, H.L.
Prediagnostic serum hormones and the risk of prostate cancer. **Cancer Res.**, **48**: 3515-3517,1988.
- NOMURA, A.M.; STEMMERMANN, G.N.; CHYOU, P.H.; HENDERSON, B.E.; STANCZYK, F.Z. Serum androgens and prostate cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **5**: 621-625,1996.
- NOMURA, A.M.; ZIEGLER, R.G.; STEMMERMANN, G.N.; CHYOU, P.H.; CRAFT, N.E. Serum micronutrients and upper aerodigestive tract cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**,**6**:407-412,1997.
- PARIS, P.L.; WITTE, J.S.; KUPELIAN, P.A.; LEVIN, H.; KLEIN, E.A.; CATALONA, W.J.; CASEY, G. Identification and fine mapping of a region showing a high frequency of allelic imbalance on chromosome 16q23.2 that corresponds to a prostate cancer susceptibility locus. **Cancer Res.**, **60**, 3645-3649,2000.
- PEELING, W.B. & GRIFFITHS, K. – Endocrine treatment of prostatic diseases. In : **The Prostate**. London, Butterworth & Co.,1986. p.188-207.
- PICADO-LEONARD, J. & MILLER, W. L. Cloning and Sequence of the human gene for P450c17 (steroid 17 –hidroxylase/17,20 lyase): similarity with the gene for P450c21. **DNA**, **6**:439-448,1987.
- PLATZ, E.A.; GIOVANNUCCI, E.; DAHL, D.M.; KRITHIVAS, K.; HENNEKENS, C.H.; BROWN, M.; STAMPFER, M.J.; KANTOFF, P.W. The androgen receptor gene GGN microsatellite and prostate cancer risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **7**: 379-384,1998.

- PLATZ, E.A.; RIMM, E.B.; WILLETT, W.C.; KANTOFF, P.W.; GIOVANNUCCI, E. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. **J. Natl. Cancer Inst.**, **92**:2009-2017, 2000.
- POLLITZER, W.S.; AZEVEDO, E.S.; BAREFOOT, J.; LIMA, A.M.; CARVALHO, R.D.; SANTOS, M.I.; EULALIO, M.C. Characteristics of a population sample of Jacobina, Bahia, Brazil. **Hum. Biol.**, **54**: 697-707, 1982.
- POUR, P. Prostatic cancer induced in MCR rats by N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine and N-nitrosobis (2-hydroxypropyl)amine. **Carcinogenesis**, **4**: 49-55, 1983.
- RAO, A. & CRAMES, S.D. Identification of a polymorphism in the ARE I region of PSA promoter. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **40**: 65, 1999.
- REBBECK, T.R.; WALKER, A.H.; ZEIGLER-JOHNSON, C.; WEISBURG, S.; MARTIN, A.M.; NATHANSON, K.L.; WEIN, A.J.; MALKOWICZ, S.B. Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. **Am. J. Hum. Genet.**, **67**:1014-1019, 2000.
- REICHARDT, J.K.; MAKRIDAKIS, N.; HENDERSON, B.E.; YU, M.C.; PIKE, M.C.; ROSS, R.K. Genetic variability of the human *SRD5A2* gene: implications for prostate cancer risk. **Cancer Res.**, **55**:3973-3975, 1995.
- REICHARDT, J.K.V. GEN GEN: the genomic genetic analysis of androgen-metabolic genes and prostate cancer as a paradigm for the dissection of complex phenotypes. **Front Biosci.**, **4**: 596-600, 1999.

- RHEAUME, E.; SIMARD, J.; MOREL, Y.; MEBARKI, F.; ZACHMANN, M.; FOREST, M.G.; NEW, M.I.; LABRIE, F. Congenital adrenal hyperplasia due to point mutations in the type II 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene. **Nat. Genet.**, **1**:239-345,1992.
- ROSS, R.K.; BERNSTEIN, L.; LOBO, R.A.; SHIMIZU, H.; STANCZYK, F.Z.; PIKE, M.C.; HENDERSON, B.E. 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. **Lancet**, **339**: 887-889,1992.
- ROSS, R.K.; BERNSTEIN, L.; JUDD, H.; HANISCH, R.; PIKE, M.; HENDERSON, B. Serum testosterone levels in healthy young black and white men. **J Natl. Cancer Inst.**, **76**: 45-48,1986.
- ROSS, R.K.; COETZEE, G.A.; REICHARDT, J.; SKINNER, E.; HENDERSON, B.E. Does the racial-ethnic variation in prostate cancer risk have a hormonal basis? **Cancer (Phila.)**, **75**: 1778-1782,1995.
- ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; COETZEE, G.A.; REICHARDT, J.K.V.; YU, M.C.; FEIGELSON, H.; STANCZYK, F.Z.; KOLONEL, L.N.; HENDERSON, B.E. Androgen metabolism and prostate cancer: Establishing a model of genetic susceptibility. **Cancer Res.**, **58**: 4497-4504,1998.
- ROSS, R.K.; COETZEE, G.A.; PEARCE, C.L.; REICHARDT, J.K.V.; BRETSKY, P.; KOLONEL, L.N.; HENDERSON, B.E.; LANDER, E.; ALTSHULER, D.; DALEY, G. Androgen metabolism and prostate cancer: Establishing a model of genetic susceptibility. **Eur. Urol.**, **35**: 355-361, 1999.
- RUSSEL, D.W. & WILSON, J.D. Steroid 5 α -reductase: two genes/ two enzymes. **Annu. Rev. Biochem.**, **63**: 25-61,1994.

- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, **239**: 487-491,1989.
- SANTNER, S.J.; ALBERTSON, B.; ZHANG, G.Y.; ZHANG, G.H.; SANTULLI, M.; WANG, C.; DEMERS, L.M.; SHACKLETON, C.; SANTEN, R.J. Comparative rates of androgen production and metabolism in Caucasian and Chinese subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, **83**: 2104-2109,1998.
- SARTOR, O.; ZHENG, Q.; EASTHAM, J. Androgen receptor gene CAG repeat length varies in a race-specific fashion in men without prostate cancer. **Urology**, **53**: 378-380,1999.
- SCHAID, D.J.; McDONNEL, S.K.; BLUTE, M.L.; THIBIDEAU, S.N. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. **Am. J. Hum. Genet.**, **62**: 1425-1438,1998.
- SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J.M.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L: **Software ARLEQUIN ver.1.1**: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, 1997.
- SCHWARZ, G.G. & HULKAB.S Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer ? (Hypothesis). **Anticancer Res.**, **10**: 1307-1311,1990.
- SEVERSON, R.K.; GROVE, J.S.; OMURA, A.M.; STEMMERMAN, G.N. Body mass and prostatic cancer: a prospective study. **BJM.**, **297**: 713-715,1988.

- SHIMIZU, H.; ROSS, R.K.; BERNSTEIN, L. Underestimation of the incidence rate of prostate cancer in Japan. **Jpn. J. Cancer Res.**, **82**: 483-485,1991.
- SHIMIZU, Y.; KATO, H.; SCHULL, W.J. Risk of prostate cancer among atomic bomb survivors. **J. Radiat. Res.**, **2**: 54-63,1991.
- SIEMIATYCKI, J.; KREWSKI, D.; FRANCO, D.; KAISERMAN, M. Associations between cigarette smoking and each of 21 types of cancer: a multi-site case-control study. **Int. J. Epidemiol.**, **24**: 504-514,1995.
- SLEDDENS, H.F.B.M.; OOSTRA, B.A.; BRINKMANN, A.O.; TRAPMAN, J. Trinucleotide (GGN) repeat polymorphism in the androgen receptor gene. **Hum. Mol. Genet.**, **2**: 493,1993.
- SMITH, J.R.; FREIJE, D.; CARPTEN, J.D.; GRONBERG, H.; XU, J.; ISAACS, S.D.; BROWNSTEIN, M.J. Major susceptibility locus for prostate cancer chromosome 1 suggested by genome-wide search. **Science**, **274**: 1371-1374,1996.
- STANFORD, J.L.; JUST, J.J.; GIBBS, M.; WICKLUND, K.G.; LEAL, C.L.; BLUMENSTEIN, B.A.; OSTRANDER, E.A. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: Molecular markers of prostate cancer risk. **Cancer Res.**, **57**: 1194-1198,1997.
- SUAREZ, B.K.; LIN, J.; BURMEISTER, J.K.; BROMAM, K.W.; WEBER, J.L.; BANARJEE, T.K.; GODDART, K.A.B.; WITTE, J.S.; ELSTON, R.C.; CATALONA, W.J. A genome screen of multiplex prostate cancer sibships. **Am. J. Hum. Genet.**, **66**: 933-944,2000.

- TAVTIGIAN, S.V.; SIMARD, J.; LABRIE, F.; SKOLNICK, M.H.; NEUHAUSEN, S.L.; ROMMENS, J.; CANNON, L.A. A strong candidate prostate cancer predisposition gene at chromossome 17p. **Am. J. Hum. Genet.**, (suppl 67): 7,2000.
- TAYLOR, J.A.; HIRVONEN, A.; WATSON, M.; PITTMAN, G.; MOHLER, J.L.; BELL, D.A. Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. **Cancer Res.**, **56**: 4108-4110,1996.
- TEMPLETON, A.R. Human races: a genetic and evolucinary perspective. **American Anthropologist**, **100**: 632-650, 1998.
- TSITOURAS, P.D.; MARTIN, C.E.; HARMANS.M. Relationship of serum testosterone to sexual activity in healthy elderly men. **J. Gerontol.**, **37**: 288-293,1982.
- WADELIUS., M.A.; ANDERSSON, S.O.; JOHANSSON, J.E.; WADELIUS, C.; RANE, A. Prostate cancer associated with *CYP17* genotype. **Pharmacogenetics**, **9**: 635-639,1999.
- WHITTEMORE, A.S.; KOLONEL, L.N.; WU, A.H.; JOHN, E.M.; GALLAGHER, R.P.; HOWE, G.R.; BURCH, J.D.; HANKIN, J.; DREON, D.M.; WEST, D.W. Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. **J. Natl. Cancer Inst.**, **87**: 652-661,1995.
- WHITTEMORE, A.S.; LIN, I.G.; OAKLEY-GIRVAN, I.; GALLAGHER, R.P.; HALPERN, J.; KOLONEL, L.N.; WU, A.H.; HSIEH, C.L. No evidence of linkage for chromossome 1q42.2-43 in prostate cancer. **Am. J. Hum. Genet.**, **65**: 1416-1424,1999.

- WILSON, J.D.; GRIFFIN, J.E.; RUSSEL, D.W. Steroid 5 α -reductase deficiency. **Endocr. Rev.**, **14**: 577-593,1993.
- WOODALL, A.A.; LEE, S.W.; WEESIE, R.J.; JACKSON, M.J.; BRITTON, G. Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. **Biochim. Biophys. Acta**, **1336**:33-42,1997.
- WU, A.H.; WHITTEMORE, A.S.; KOLONEL, L.N.; JOHN, E.M.; GALLAGHER, R.P.; WEST, D.W.; HANKIN, J.; TEH, C.Z.; DREON, D.M.; PAFFENBARGER, R.S. Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **4**:735-741,1995.
- XU, J.; MEYERS, D.A.; FREIJE, D.; ISAACS, S.D.; WILEY, K.; NUSSKERN, D.; EWING, C.; WILKENS, E.; BUJNOVSZKY, P.; BOVA, G.S.; WALSH, P.C.; ISAACS, W.B.; SCHLEUTKER, J.; MATIKAINEN, M.; TAMMELA, T.; VISAKORPI, T.; KALLIONIEMI, O.P.; BERRY, R.; SCHAID, D.; FRENCH, A.; McDONNELL, S.; SCHROEDER, J.; BLUTE, M.; THIBODEAU, S.; GRÖNENBERG, H.; EMANUELSSON, M.; DAMBER, J.E.; BERGH, A.; JONSSON, B.A.; SMITH, J.R.; WILSON, J.B.; CARPTEN, J.D.; STEPHAN, E.; GILLANDERS, E.; AMUNDSON, I.; KAINU, T.; LUTZ, D.F.; BONNIE, A.B.; AUCKEN, A.V.; SOOD, R.; COLLINS, F.; BROWSTEIN, M.; TRENT, J. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on X chromosome. **Nat. Genet.**, **20**: 175-179,1998.
- XUE, W.; IRVINE, R.A.; YU, M.C.; ROSS, R.K.; COETZEE, G.A.; INGLES, S.A. Susceptibility to prostate cancer: interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci. **Cancer Res.**, **60**: 839-841,2000.

- YEE, C.J.; ROODI, N.; VERRIER, C.S.; PARL, F.F. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. **Cancer Res.**, **54**: 1641,1994.
- YU, H.; HARRIS, R.E.; WYNDER, E.L. Case-control study of prostate cancer and socioeconomic factors. **Prostate**, **13**: 317-325,1988.
- YU, H.; BHARAJ, B.; VASSILIKOS, E.J.K.; GIAI, M.; DIAMANDIS, E.P. Shorter CAG repeat length in androgen receptor gene is associated with more aggressive forms of breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, **59**: 153-161,2000.

IX- ANEXOS



Parecer do Comitê de Ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.

☎ 0 _ 19 7888936

fax 0 _ 19 7888925

✉ cep@fmeda.fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: Nº 47/99

I- IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: POLIMORFISMOS DOS GENES DO RECEPTOR DE ANDRÓGENO E DA 5 ALFA REDUTASE TIPO II EM INDIVÍDUOS DO SEXO MASCULINO.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof.a Dr.a Christine Hackel

INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica FCM UNICAMP

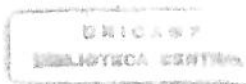
APRESENTAÇÃO AO CEP : 18-05-99

II- OBJETIVOS

Determinar as freqüências dos polimorfismos dos genes do receptor de andrógenos e da enzima 5 alfa redutase tipo II em adultos de sexo masculino da população miscigenada do Estado de São Paulo.

III- SUMÁRIO DO PROJETO

Serão coletadas amostras de sangue de pelo menos 200 indivíduos adultos do sexo masculino, com idade inferior a 45 anos, dentre candidatos a doação de sangue, que concordem em participar do estudo. Será realizada a extração de DNA dessas amostras e será feito o estudo de microsatélites CAG e GGC do exon A do gene AR pela Reação em Cadeia da Polimerase quente.



IV- COMENTÁRIOS DOS RELATORES

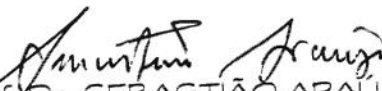
A metodologia é adequada e bem elaborada, assim como as condições de realização do estudo. O projeto apresenta boa estrutura de protocolo e tem justificativa adequada. O estudo segue os princípios éticos e apresenta o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

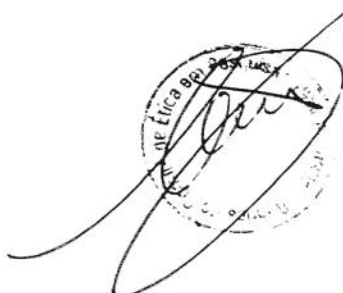
V- PARECER CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membro-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI- HOMOLOGAÇÃO

A ser homologado na I Reunião Extraordinária de 18 de abril de 2.000.


Prof. Dr. SEBASTIÃO ARAÚJO
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



**Artigo submetido ao *Brazilian Journal of
Medical and Biological Research.***

Allelic frequencies of six polymorphic markers for prostate cancer risk.

Marcelo L. Ribeiro¹, Andrey dos Santos¹, Andréa B. Carvalho-Salles³, Christine Hackel^{1,2}

¹Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, ²Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111 Universidade Estadual de Campinas, 13081-970, Campinas, SP, Brasil, ³Hemocentro de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Research supported by FAPESP [99/4512-7 (MLR) and 00/04251-8 (AS)]

Send Correspondence to:

CHRISTINE HACKEL

Departamento de Genética Médica, CP 6111

FCM/UNICAMP

13081-970 Campinas, SP, BRAZIL

Phone: 55-19-3788-1145 Fax 55-19-3788-1089

e-mail: hackel@unicamp.br

Running title: Allelic frequencies of markers for prostate cancer

Key words: Prostate cancer, Polymorphisms, *AR*, *SRD5A2*, *CYP17*

Abstract

There is evidence to support the hypothesis of hormonal etiology of prostate cancer involving androgen action. Testosterone is synthesized from cholesterol by a series of reactions involving cytochrome P450 enzymes and is converted to dihydrotestosterone (DHT), a more potent androgen, by 5 α -reductase type 2 (*SRD5A2*) in many androgen-dependent target tissues. DHT binds to androgen receptor (*AR*), and the DHT-AR complex transactivates a number of genes with AR-responsive elements. In the steroid metabolic pathway, the enzyme coded by the *CYP17* gene is the rate-limiting step in androgen biosynthesis. The aim of this study was to evaluate the distribution of polymorphisms for the *AR* (CAG, *Stu* I, GGN), *SRD5A2* (Ala49Thr, Val89Leu) and *CYP17* (*Msp*A1) genes that are considered of relevance for prostate cancer risk, among 200 individuals from two cities of the Sao Paulo state, by PCR, PCR-RFLP and ASOH techniques. Our data shows that the allelic frequencies of these markers are very similar to those described in North American and European populations. Thus, the prostate cancer genetic risk factors that are considered of relevance in most populations can also be taken into account in Brazilian urban populations, where significant contributions from European and African gene pools can be found.

Introduction

In Brazil some 20.820 men will be diagnosed with prostate cancer this year alone and 7.320 men will die of the disease (1). In fact, prostate cancer is the third most common cancer in incidence among men in this country. Studies of risk factors such as occupation, diet, smoking, alcohol and sexual activity are still inconclusive (2-5). However, age, ethnicity and family history clearly affect the risk of prostate cancer (6).

There is evidence to support the hypothesis of hormonal etiology of prostate cancer involving androgen action (7-9). Androgen is required for differentiation and growth of the prostate *in utero* and at puberty (9). Testosterone is synthesized from cholesterol by a series of reactions involving cytochrome P450 enzymes. Testosterone is converted to dihydrotestosterone (DHT), a more potent androgen, by 5 α -reductase type 2 with NADPH as the cofactor in many androgen-dependent target tissues. DHT binds to androgen receptor (AR), and the DHT-AR complex transactivates a number of genes with AR-responsive elements. These events ultimately result in cell division in the prostate (10).

In the steroid metabolic pathway, the cytochrome P450c17 α (*CYP17*) gene is the rate-limiting step in androgen biosynthesis. The *CYP17* gene maps to chromosome 10q24.3 (12) and encodes the cytochrome P450c17 α enzyme which catalyses steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase activities. A T $\rightarrow$ C transition polymorphism creates an additional Sp1-type (CCACC box) promoter site,

suggesting that this variant (A2 allele) may have an increased rate of transcription (13).

The *AR* gene, located at chromosome Xq11-12, encodes the androgen receptor, a ligand-activated transcription factor that mediates the androgenic response and stimulates the expression of genes associated with the differentiated phenotype of the prostate, such as prostate-specific antigen (PSA) (14). The large exon 1, that encodes the transactivation domain, contains a highly polymorphic CAG microsatellite, a *Stu* I single nucleotide polymorphism at codon 211 (G1733A) and a less polymorphic GGN repeat (15,16).

In transfection experiments, the CAG repeat length correlates inversely and linearly with transcriptional transactivation activity, suggesting that a long polyglutamin chain interferes with AR function (17,18). It has been shown that shorter *AR* gene repeat lengths are related to a higher risk of prostate cancer development or progression (19-22). The effect of the length of the second *AR* gene microsatellite, consisting of GGN repeats encoding polyglycine, is unknown. However, Platz *et al.* (23) speculated that 23 repeats might represent the coding sequence for optimal AR protein conformation and activity. A deviation in repeat number in either direction away from the mean may represent slightly diminished AR activity. The *Stu* I polymorphism allows the identification of two alleles (S1/S2), for which an association with increased risk of prostate cancer has been investigated (7).

The cloning and characterization of the 5 α -reductase type II gene (*SRD5A2*, mapped at 2p23) allowed the description of extensive genetic polymorphisms in

this gene (24,25). A valine to leucine polymorphism at codon 89 (Val89Leu) has been reported, with the leucine allele (Leu) associated with lower steroid 5 α -reductase activity. Since the leucine allele would lead to lower levels of intraprostatic DHT, a protective effect towards prostate cancer has been suggested (25). Another variant that changes an alanine to a threonine at amino acid 49 (Ala49Thr) was correlated with an increase in 5 α -reductase activity (26) and an association of the threonine allele (Thr) with prostate cancer risk has been reported (27).

In the present study, we have determined the frequencies of aforementioned polymorphisms among 200 individuals from two cities of the Sao Paulo state, in order to evaluate the genotypic distribution of these prostate cancer markers.

Material and methods

Polymorphisms of the *AR*, *SRD5A2* and *CYP17* genes were analyzed in DNA samples of 200 blood donors from Hematology-Hemotherapy Center of the State University of Campinas (n=118; x=36.67 and sd=9.76) and Hematology-Hemotherapy Center of the State University of Sao Jose do Rio Preto (n=82; x=39 and sd=9.10). All individuals were included in this study after given informed written consent.

Information about the ancestors of all individuals investigated was obtained in order to characterize the ethnic composition of both samples. Among the blood donors from Campinas, 61% (n=72) considered themselves White and 39% (n=46)

were Black or referred parents or grandparents of Black ancestry. In the Sao Jose do Rio Preto sample, 67.3% (n=56) were considered White and 31.7% (n=26) were Black or reported Black ancestry. Neither the Sao Jose do Rio Preto individuals nor those from Campinas reported Amerindian or Asian ancestry in the last two generations.

Genomic DNA from leukocytes was used as template in polymerase chain reaction (PCR). The fragment of the *AR* gene comprising the polymorphic CAG repeat was amplified with sense and antisense primers according to Yee *et al.* (28). The reaction was performed in 25µl total volume containing 50ng DNA, 20mM Tris-HCl (pH8.4), 50mM KCl; 1.5mM MgCl₂; 10mM of dNTP mixture (0.2mM dATP+0.2mM dTTP+0.2mM dGTP+0.1mM dCTP); 20µmol each primer; 2.5 units Taq DNA polymerase (Gibco-BRL) and 1µCi of [α -³³P]dCTP (10mCi/ml). The amplification consisted in an initial 5 minutes denaturation step followed by 10 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C and of 25 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C and 1 min at 72°C. The PCR product was electrophoresed on a 6% denaturing polyacrilamide DNA sequencing gel, and the length was determined after comparison to standards derived from previously sequenced CAG repeats. Gels were transferred to filter paper (Whatman 3MM), dried and exposed to X-ray film for 16-20 hours.

The GGN amplification was conducted with the sense and antisense primers described by Sleddens *et al.* (16). Reaction conditions were as described above with following modifications: 10mM of dNTP mixture (0.2mM dATP+0.2mM dTTP+0.1mM dCTP+1mM total with 3:1 mixture of 7-deaza-dGTP:dGTP) and 5%

of DMSO. Thermocycling consisted of 12 minutes at 95°C, 21 cycles of 1 min at 96°C, 1 min at 64°C and 1 min at 72°C, followed by a touchdown reduction of annealing temperature 0.5°C by cycle until 54°C and 25 cycles with annealing temperature at 54°C. After electrophoresis and exposition to X-ray film, the length was determined by comparison with previously sequenced GGN repeats

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) analysis was used to identify the S1/S2 alleles of the *Stu* I polymorphism. A 416bp DNA fragment was amplified with the primers reported by Lu and Danielsen (29). The PCR consisted of an initial 5 minutes denaturation step followed by 35 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 62°C and 1 minute at 72°C. The presence of an A at base 1733 (S2 allele) results in a *Stu* I site, which is abolished on the S1 allele. The PCR fragments were digested with *Stu* I for 2 hours at 37°C and the digestion products were separated on 1.5% agarose gel electrophoresis. Specific digestion products consisted of 416bp and 329/87bp for the S1 and S2 genotypes respectively.

The *CYP17* A1/A2 alleles were detected by RFLP analysis of 629bp DNA fragments amplified by PCR (35 cycles, annealing temperature of 58°C) with the primers described by Lunn *et al.* (30). The A2 allele can be identified by the presence of a second *Msp*A1 site created by the T→C substitution. The PCR fragments were digested with *Msp*A1 for 2 hours at 37°C and the digestion products were separated on 3.0% Agarose 1000 (Gibco-BRL) gel electrophoresis. Specific digestion products consisted of 577; 577/ 305 and 272; 305/ 272bp fragments for the A1/A1, A1/A2 and A2/A2 genotypes respectively. A 52 bp

fragment was present in all samples due to an invariant *MspA1* site that served as an internal control for complete digestion.

PCR-RFLP was also used to identify the Val89Leu alleles of the *SRD5A2* gene. A pair of primers was used to produce a 369bp DNA fragment (31) after 35 cycles of PCR with an annealing temperature of 65°C. The presence of a G at base 296 (Val allele) creates a *Rsa I* site, which is absent on the Leu allele. The PCR fragments were digested with *Rsa I* for 2 hours at 37°C and the digestion products were separated on 3.0% Agarose 1000 (Gibco-BRL) gel electrophoresis. Specific digestion products consisted of 169/ 106/ 73 and 21; 169/ 106/ 94/ 73 and 21; 169/ 106 and 94bp fragments for the Val/Val, Val/Leu and Leu/Leu genotypes respectively.

The *SRD5A2* Ala49Thr alleles were analyzed by PCR-ASOH (Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization). A 309bp DNA fragment was amplified with a pair of primers described by Makridakis *et al.* (27), after 35 cycles of PCR with an annealing temperature of 55°C. The selected probes (ALA49-CTACCCGCCTGCCAGCCC and THR49-CTACCCGCCTACCAGCCC) were labeled with γ [³²PdATP] and used to identify the Ala49Thr alleles. The THR49 oligonucleotide was used as a sense primer to produce PCR fragments containing the G→A substitution, in order to provide a positive control for this rare allele.

Statistical Analysis

The allelic frequencies of polymorphisms involving the autosomal genes were calculated by gene counting. The goodness of fit to the Hardy-Weinberg equilibrium as well as statistical analysis of differences between populations samples were performed using the χ^2 test. For the androgen receptor gene, the distribution of the number of CAG and GGN repeats in both samples was compared using the independent t test and haplotype frequencies were estimated using the program ARLEQUIN (32).

Preliminary comparative analysis showed no differences concerning ancestor's origin, in both samples. Since Brazilian population is known to be highly miscigenated, further comparisons were not adjusted by ethnic background

Results

The number of *AR* gene CAG repeats varied from 11 to 27 among blood donors from Campinas and from 13 to 28 in the individuals from Sao Jose do Rio Preto (Figure 1), with average numbers of 20.85 (sd= $\pm$ 2.61); 20.35 (sd= $\pm$ 2.85) respectively. The distribution of CAG repeats was not significantly different ($t=1.28$; $p=0.20$). The GGN repeat length varied from 16 to 27 ($x=22.55$ and $sd=\pm$ 1.33) in the Campinas sample and from 10 to 27 ($x=22.15$ and $sd=\pm$ 2.47) among blood donors from Sao Jose do Rio Preto (Figure 2), with no differences between these two samples ($t=1.48$; $p=0.14$). The results concerning *Stu* I polymorphism

analyses are shown in Table 1. No significant differences were found when S1/S2 allelic frequencies from both samples were compared ($\chi^2=3.10$; $p=0.08$). Since there were no differences for the androgen receptor gene markers in both samples, these data were pooled together for haplotype analysis. Seventy-six haplotypes were estimated and the most frequent ones ($\geq 4\%$) are shown on Table 2. When we tested a possible association (linkage disequilibrium), the results were negative for CAG and GGN repeats ($p=0.14$) as well as for CAG repeats and *Stu I* polymorphism ($p=0.27$). Linkage disequilibrium was found between GGN repeats and *Stu I* polymorphism ($p=0.01$),

In relation to the *SRD5A2* gene, the G→A mutation that leads to the Ala49Thr substitution has not been detected in the present study. The genotype frequencies of *SRD5A2* Val89Leu and *CYP17* A1/A2 polymorphisms were estimated in both population samples (Table 1). The distributions of *SRD5A2* and *CYP17* genotypes were found in Hardy-Weinberg equilibrium for each sample. However, the *SRD5A2* Val89Leu genotypic frequencies were different between both samples ($\chi^2=8.41$; $p=0.015$), with a less than expected frequency of the Val/Leu genotype in the Campinas sample. Although no differences were detected when the allelic frequencies were compared ($\chi^2 = 1.84$, $p= 0.17$), the Val allele was more frequent the Campinas sample (0.68) than in São Jose do Rio Preto (0.60).

No differences were observed in relation to the genotypic distribution of the *CYP17* A1/A2 polymorphism ($\chi^2= 0.38$, $p=0.82$) and identical allelic frequencies were estimated (A1=0.66).

Discussion

The “ethnic/racial” classification has been used by many authors to denote origin by birth or descent rather than nationality. This is a difficult task, since Brazilian population in general and especially that of the southeastern region has a high degree of admixture, even in the so-called “white” individuals where a significant contribution of Amerindian and African matrilineages has been demonstrated (33).

According to Templeton (34) human races do not exist under the traditional concept of a subspecies as being a geographically circumscribed population showing sharp genetic differentiation. However, many traits and their underlying polymorphic genes show independent patterns of geographical variation. As a result some combination of characters will distinguish virtually every population from all others. Thus, it is important to define the polymorphic spectrum of genes that may be involved in cancer diseases in each population, to evaluate its usefulness in the prediction of risk.

The six polymorphic markers evaluated in the present work showed a very similar distribution in these two samples of Brazilian population. Hence, for further comparisons these data were pooled together.

In relation to *AR* markers, the mean of CAG repeats ($x=20.6$) in the present study is the lowest one among different populations, with a narrow range of distribution (11 to 28 repeats), while the highest value ($x=23$) was reported in a Chinese population sample (Table 3)(35-39). The GGN mean number of 22.4

repeats in the Brazilian population is also lower than those found in North American and Chinese populations (Table 3)(23,38). The allelic frequencies of *Stu* I polymorphism (S1=0.2 and S2=0.8) were close to those reported by Lu and Danielsen (28) (S1=0.13 and S2=0.87), in white North Americans.

Linkage disequilibrium between CAG and GGN repeats has been reported by Platz *et al.* (24), but has not been detected by other authors (40,41) in male base populations, as well as in the present data. The relevance of linkage disequilibrium between GGN repeats and *Stu* I polymorphism, as observed in the present work, has to be further evaluated in prostate cancer patients.

Concerning the *SRD5A2* Val89Leu polymorphism, the observed allelic frequencies do not differ from North American data (Table 4)(25,30,42,43). The absence of the Thr49 allele of the same gene in our base population may be related to the size sample, since allelic frequencies lower than 2.5% have been previously reported in the so-called African and Latino North Americans (27). It is noteworthy to mention that a frequency of 3.5% for the Thr49 allele has been reported only in a sample of white North Americans prostate cancer patients (43), suggesting that this allele may be of relevance for this disease.

The *CYP17* A1/A2 allelic frequencies (Table 4)(30,44-46) are similar to those described for a mixed North American population (30) and do not differ from an European sample (44). On the other hand, striking differences are observed concerning the reported frequencies from Swedish ($\chi^2 = 7.73$, $p = 0.02$) and Japanese populations ($\chi^2 = 18.93$, $p = 0.0001$).

To our knowledge, this is the first report concerning the frequencies of these six polymorphic markers in South America, showing that the distributions of these markers are very similar to those described in North American and European populations, with a few exceptions. However, it should be noted that at least for some these polymorphisms the Japanese/Chinese backgrounds can not be ignored, and that there is still a lack of information regarding Amerindian contribution. Thus, the prostate cancer genetic risk factors that are considered of relevance in most populations can also be taken into account in Brazilian urban populations, where significant contributions from European and African gene pools can be found.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the Hematology-Hemotherapy Center of the State University of Campinas for allowing the access to the blood donors. *MLR* and *AS* are supported by fellowships from Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo (FAPESP), Brazil.

References

1. INCA (Instituto Nacional do Câncer) (2001) Ministério da Saúde. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro.
2. Van der Gulden JW, Kolk JJ & Verbeek AL (1992). Prostate cancer and work environment. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 34: 402-409.
3. Daviglus ML, Dyer AR, Persky V, Chavez N, Drum M, Goldberg J, Liu K, Morris DK, Shekelle RB & Stamler J (1996). Dietary betacarotene, vitamin C, and risk of prostate cancer: results from the Western Electric Study. *Epidemiology*, 7: 472-477.
4. Ilic M, Vlaisinac H & Marinkovic J (1996). Case-control study of risk factors for prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 74: 1682-1686.
5. Lumey, LH (1996). Prostate cancer and smoking: a review of case-control and cohort studies. *Prostate* 29: 249-260.
6. Parkin DM, Pisani P & Ferlay J (1993). Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *International Journal of Cancer*, 54: 594-606.
7. Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, Reichardt JKV, Yu MC, Feigelson H, Stanczyk FZ, Kolonel LN & Henderson BE (1998). Androgen metabolism and prostate cancer: Establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Research*, 58: 4497-4504.
8. Nomura AMY & Kolonel LN (1991). Prostate cancer: a current perspective. *American Journal of Epidemiology*, 133: 200-227.
9. Wilding G (1992). The importance of steroid hormones in prostate cancer. *Cancer Surveys*, 14: 113-130.
10. Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS & Wilson EM (1988). The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Molecular Endocrinology*, 2: 1265-1275.
11. Wilson JD, Griffin JE & Russell DW (1993). Steroid 5 α -reductase deficiency. *Endocrine Reviews*, 14: 577-593.
12. Picado-Leonard J, & Miller WL (1987). Cloning and Sequence of the human gene for P450c17 (steroid 17 β -hydroxylase/17,20 lyase): similarity with the gene for P450c21. *DNA*, 6: 439-448.
13. Carey AH, Waterworth D, Patel K, White D, Little J, Novelli P, Franks S & Williamson R (1994). Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Human Molecular Genetics*, 3: 1873-1876.
14. Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput JA, Brinkmann AO & Trapman J (1991). The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element. *Molecular Endocrinology*, 5: 1921-1930.

15. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT & Chakraborty R (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12: 241-253.
16. Sleddens HFBM, Oostra BA, Brinkmann AO & Trapman J (1993). Trinucleotide (GGN) repeat polymorphism in the androgen receptor gene. *Human Molecular Genetics*, 2: 493.
17. Chamberlain NL, Driver ED & Miesfield RL (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Research*, 22: 3181-3186.
18. Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA & Pinsky L (1995). Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: Possible pathogenic relevance for the (CAG)_n-expanded neuropathies. *Human Molecular Genetics*, 4: 523-527.
19. Coetzee GA & Ross RK (1994) Prostate cancer and androgen receptor. *Journal of the National Cancer Institute*, 86: 872-873.
20. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH & Kantoff PW (1997). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 94: 3320-3323.
21. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW & Coetzee GA (1997). Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *Journal of the National Cancer Institute*, 89: 166-170.
22. Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Leal CL, Blumenstein BA & Ostrander EA (1997). Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: Molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Research*, 57: 1194-1198.
23. Platz EA, Giovannucci E, Dahl DM, Krithivas K, Hennekens CH, Brown M, Stampfer MJ & Kantoff PW (1998). The androgen receptor gene GGN microsatellite and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 7: 379-384.
24. Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-Mc Ginley J, Griffin JE, Francke A, Wilson JD & Russell DW (1992). Molecular genetics of steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *Journal of Clinical Investigation*, 90: 799-809.
25. Makridakis N, Ross RK, Pike MC, Chang L, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Shi CY, Yu MC, Henderson BE & Reichardt JK (1997). A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase. *Cancer Research*, 57: 1020-1022.
26. Makridakis NM, di Salle E & Reichardt JK (2000). Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 α -reductase type II. *Pharmacogenetics*, 10: 407-413.
27. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Crocitto LE, Kolonel LN, Pearce CL, Henderson BE & Reichardt JKV (1999). Association of missense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet*, 354: 975-978.

28. Yee CJ, Roodi N, Verrier CS & Parl FF (1996). Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Research*, 54: 1641.
29. Lu J & Danielsen M (1996). A Stu I polymorphism in the human androgen receptor gene (AR). *Clinical Genetics*, 49: 323-324.
30. Lunn RM, Bell DA, Mohler JL & Taylor JA (1999). Prostate cancer risk and polymorphisms in 17 hydroxylase (CYP17) and steroid reductase (SRD5A2). *Carcinogenesis*, 20: 1727-1731.
31. Katz MD, Cai LQ, Zhu Y, Herrera C, DeFilloRicart M, Shackleton HL & Imperato-McGinley J (1995). The biochemical and phenotypic characterization of females homozygous for 5 α -reductase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80: 3160-3167.
32. Schneider S, Kueffer JM, Roessli D & Excoffier L (1997). Software ARLEQUIN ver.1.1: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
33. Alves-Silva J, Santos MS, Pena SDJ & Prado VF (1999). Multiple geographic sources of region V 9-bp deletion haplotypes in Brazilians. *Human Biology*, 71: 245-259.
34. Templeton AR (1998). Human races: a genetic and evolutionary perspective. *American Anthropologist*, 100: 632-650.
35. Bratt O, Borg A, Kristoffersson U, Lundgren R, Zhang QX & Olsson H (1999). CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *British Journal of Cancer*, 81: 672-676.
36. Edwards SM, Badzioch MD, Minter R, Hamoudi R, Collins N, Arden-Jones A, Dowe A, Osborne S, Kelly J, Shearer R, Easton DF, Saunders GF, Dearnaley DP & Eeles RA (1999). Androgen receptor polymorphisms: Association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. *International Journal of Cancer*, 84: 458-465.
37. Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, Wilcox CJ, Batter SJ, Brown M, Longcope C, McKinlay JB & Kantoff PW (1999). Evidence that CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. *Journal of Endocrinology*, 162: 137-142.
38. Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, Sesterhenn A, Mostofi FK, Benichou J & Chang C (2000). Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. *Cancer Research*, 60: 5111-5116.
39. Lange EM, Chen H, Brierley K, Livermore H, Wojno KJ, Langefeld CD, Lange K & Cooney KA (2000). The polymorphic exon 1 androgen receptor CAG repeat in men with a potential inherited predisposition to prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9: 439-442.

40. Macke JP, Hu N, Hu S, Bailey M, King VL, Brown T, Hamer D & Nathans J (1993). Sequence variation in the androgen receptor gene is not a common determinant of male sexual orientation. *American Journal of Human Genetics*, 53: 844-852.
41. Irvine RA, Yu MC, Ross RK & Coetzee GA (1995) The CAG and GGC microsatellites of androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Research*, 55: 1937-1940.
42. Febbo PG, Kantoff PW, Platz EA, Cassey D, Batter S, Giovannucci E, Hennekens CH & Stampfer MJ (1999). The V89L polymorphism in the 5alpha-reductase type 2 gene and risk of prostate cancer. *Cancer Research*, 59: 5878-5881.
43. Jaffe JM, Malkowicz SB, Walker AH, MacBride S, Peschel R, Tomaszewski J, Aradalem KV, Wein AJ & Rebbeck TR (2000). Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors. *Cancer Research*, 60: 1626-1630.
44. Gsur A, Bernhofer G, Hinteregger S, Haidinger G, Schatzl G, Madersdacher S, Marberger M, Vutuc C & Micksche M (2000). A polymorphism in the CYP17 gene is associated with prostate cancer risk. *International Journal of Cancer*, 87: 434-437.
45. Wadelius MA, Andersson SO, Johansson JE, Wadelius C & Rane A (1999). Prostate cancer associated with CYP17 genotype. *Pharmacogenetics*, 9: 635-639.
46. Habuchi T, Liqing Z, Suzuki T, Sasaki R, Tsuchiya N, Tachiki H, Shimoda N, Satoh S, Sato K, Kakehi Y, Kamoto T, Ogawa O & Kato T (2000). Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with a CYP17 gene polymorphism with a gene dosage effect. *Cancer Research*, 60: 5710-5713.

Tables

Table 1 – Genotype distribution of *AR*, *SRD5A2* and *CYP17* polymorphisms.

<i>Gene</i>		<i>Campinas (%)</i>	<i>SJ Rio Preto (%)</i>
<i>Genotypes</i>			
(Polymorphism)		(n=118)	(n=82)
<i>AR</i> (Stu I)	S1	29 (24.57)	11 (13.41)
	S2	89 (75.43)	71 (86.59)
<i>SRD5A2</i> (Val89Leu)	Val/Val	61 (51.69)	27 (32.93)
	Val/Leu	40 (33.9)	44 (53.66)
	Leu/Leu	17 (14.41)	11 (13.41)
<i>CYP17</i> (A1/A2)	A1/A1	51 (43.22)	34 (41.46)
	A1/A2	53 (44.92)	40 (48.78)
	A2/A2	14 (11.86)	8 (9.76)

Table 2 – Estimated haplotype frequencies for the *AR* gene

Haplotypes			Frequencies
<i>CAG</i>	<i>GGN</i>	<i>Stu I</i>	
21	22	S2	0.085
20	23	S2	0.065
22	23	S2	0.045
21	23	S2	0.040
23	22	S2	0.040
24	22	S2	0.040
19	22	S2	0.040

Table 3 – CAG and GGN repeats in different populations.

Repeat	Min	Max	Mean	n*	Study Group
CAG	6	39	21	588	North American ²⁰
	11	32	21.98	266	North American ²²
	12	30	21.7	186	European (Sweden) ³⁵
	13	30	21	390	European (UK) ³⁶
	8	37	22	882	North American ³⁷
	10	33	23	300	Chinese ³⁸
	11	32	21.9	305	North American ³⁹
	11	28	20.65	200	Brazilian
	10	29	23	794	North American ²³
GGN	14	27	23	295	Chinese ³⁸
	10	26	22.38	200	Brazilian

n* - Number of chromosomes.

Table 4 – Distribution of *SRD5A2* and *CYP17* genotypes in different populations.

Gene	Val/Val	Val/Leu	Leu/Leu	Leu89	n	Study Group
(Polymorphism)						
SRD5A2 (Val89Leu)	0.46	0.42	0.12	0.32	286	North American ²⁵
	0.47	0.43	0.10	0.31	386	North American ⁴²
	0.43	0.49	0.08	0.32	108	North American ³⁰
	0.50	0.40	0.10	0.3	245	North American ⁴³
	0.44	0.42	0.14	0.35	200	Brazilian
CYP17 (A1/A2)	A1/A1	A1/A2	A2/A2	A2		
	0.43	0.46	0.11	0.35	167	North American ³⁰
	0.37	0.53	0.10	0.36	252	European (Austria) ⁴⁴
	0.29	0.55	0.16	0.43	160	European (Sweden) ⁴⁵
	0.25	0.47	0.28	0.51	262	Japanese ⁴⁶
n - Number of individuals.						
	0.42	0.47	0.11	0.34	200	Brazilian

Figure

Figure 1 – Distribution of CAG repeats among individuals from Campinas and Sao Jose do Rio Preto.

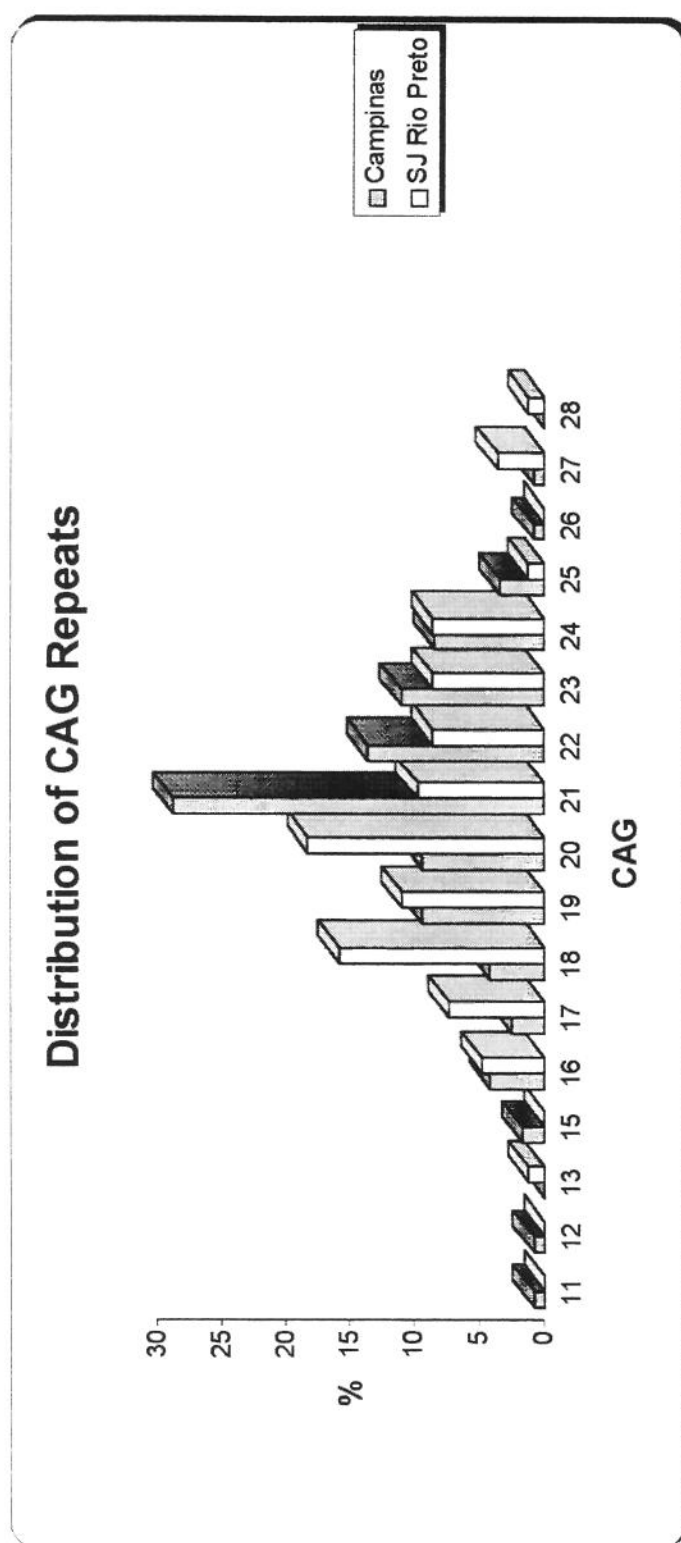


Figure 2 - Distribution of GGN repeats among individuals from Campinas and Sao Jose do Rio Preto.

