

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Polimorfismo V89L do Gene 5  $\alpha$ -redutase Tipo II (SRD5A2) e a Associação com o Risco de Câncer de Próstata - Análise de uma Amostra da População do Rio Grande do Sul**

Aluna

BRUNA AMORIN

Orientador: Dr. Walter José Koff

Porto Alegre

2010

**A524p** Amorin, Bruna

Polimorfismo V89L do gene 5  $\alpha$ -redutase tipo II (SRD5A2) e a associação com o risco de câncer de próstata : análise de uma amostra da população do Rio Grande do Sul / Bruna Amorin ; orient. Walter José Koff. – 2010.  
68 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Neoplasias da próstata 2. Fatores de risco 3. Polimorfismo genético 4. Testosterona 5-alfa-redutase 5. Rio Grande do Sul I. Koff, Walter José II. Título.

NLM: WJ 762

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**Polimorfismo V89L do Gene 5  $\alpha$ -redutase Tipo II (SRD5A2) e a Associação com o Risco de Câncer de Próstata - Análise de uma Amostra da População do Rio Grande do Sul.**

Aluna

BRUNA AMORIN

Orientador: Dr. Walter José Koff

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

Porto Alegre

2010

*“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido.  
Não na vitória propriamente dita”.*

*Mahtma Gandhi*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Nadir e Vera, pelo amor, incentivo, educação e por não medirem esforços para eu chegar até aqui.

Ao meu namorado Gustavo, pelo carinho e por tornar tranquilos meus momentos de apreensão.

Ao meu orientador Dr. Walter José Koff, pela oportunidade de fazer este projeto e pela confiança depositada em mim.

À colaboração da Dra Ilma Simoni Brum da Silva, por ter aceitado realizar este projeto em seu laboratório, pelo exemplo de pesquisadora e pelo incentivo constante durante todas as etapas do mestrado.

Ao colega Vanderlei Biolchi pela atenção, paciência e pelos ensinamentos dos procedimentos do laboratório.

Ao amigo Tiago Oselame Fontanive pela companhia, amizade e estudo durante toda a execução deste projeto.

Ao Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas por permitir acesso aos pacientes para realização deste projeto.

Ao laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral do Departamento de Fisiologia da UFRGS e a todos seus integrantes pela amizade e convívio durante a realização deste projeto.

## RESUMO

**Introdução:** A pesquisa por marcadores genéticos de susceptibilidade a doenças geralmente focam um gene baseado nas propriedades e vias metabólicas de seus produtos protéicos, assim, genes envolvidos na biossíntese de andrógenos podem identificar possíveis alterações na carcinogênese prostática. Diferenças étnicas em polimorfismos apresentam um papel no metabolismo de hormônios e podem acometer diferentes raças no risco de desenvolver câncer de próstata. A 5 alfa-redutase (SRD5A2) é a enzima responsável por catalisar irreversivelmente a conversão da testosterona no principal androgênio prostático, dihidrotestosterona (DHT). Vários polimorfismos associados ao gene SRD5A2 tem sido estudados e relatados quanto à possível associação com o aumento do risco/susceptibilidade do CaP, entre eles, o polimorfismo V89L.

**Objetivos:** Avaliação da associação do polimorfismo V89L do gene SRD5A2 com o risco de câncer de próstata em uma amostra da população do Rio Grande do Sul; avaliação da frequência deste polimorfismo em uma amostra de indivíduos com câncer de próstata e em um grupo controle e correlação da frequência do polimorfismo com os níveis séricos de testosterona total e livre, bem como o PSA.

**Métodos:** Foram coletadas amostras de sangue de 169 casos com câncer de próstata e 177 controles. Os genótipos do polimorfismo V/V, V/L e L/L foram comparados entre casos e controles.

**Resultados:** O genótipo V/V foi significativamente mais frequente nos controles em comparação com os casos, entretanto não encontramos associação entre os genótipos do polimorfismo V89L e o risco de desenvolver o câncer de próstata, porém ao analisarmos somente os indivíduos com idade inferior a 65 anos,

verificamos que o genótipo V/V quando comparado com o genótipo V/L e quando comprado com o genótipo (L/L+V/L) apresenta um fator protetor (OR: 0,338; IC: 0,134-0,858;  $p=0,022$  e OR:0,046; IC: 0,166-0,990;  $p=0,047$ , respectivamente). Verificamos também que o genótipo V/L quando comparado com o genótipo (V/V+L/L) proporciona um risco para o desenvolvimento de câncer de próstata (OR:1,651; IC: 1,043-2,613;  $p=0,032$ ).

**Conclusões:** Nosso estudo sugere que entre indivíduos com menos de 65 anos de idade, o genótipo V/L do polimorfismo V89L pode desempenhar um significativo risco de desenvolver CaP e que o genótipo V/V está associado com um fator protetor para o câncer de próstata.

## ABSTRACT

**Background:** The search for genetic markers of susceptibility to diseases often focus on a gene based on the properties of metabolic pathways and their protein products, thus, genes involved in biosynthesis of androgens can identify possible changes in prostate carcinogenesis. Ethnic differences in polymorphisms have a role in hormone metabolism and may affect different races in the risk of developing prostate cancer. The 5 alpha-reductase (SRD5A2) is the enzyme responsible for irreversibly catalyzing the conversion of testosterone into the main prostatic androgen, DHT. Several polymorphisms associated with the SRD5A2 gene has been studied and reported on the possible association with increased risk or susceptibility of PCa among them, the V89L polymorphism.

**Objectives:** Assessment of association of the V89L polymorphism of SRD5A2 gene with prostate cancer risk in a population sample from Rio Grande do Sul, evaluate the frequency of this polymorphism in a sample of individuals with prostate cancer and a control group and the frequency correlation polymorphism on serum levels of total and free testosterone and PSA.

**Methods:** Blood samples were collected for 169 prostate cancer cases and 177 controls. The genotypes (V/V, V/L and L/L) were compared among cases and controls.

**Results:** The genotype V/V was significantly more frequent in controls compared with cases, however we found no association between the V89L polymorphism genotypes and the risk of developing prostate cancer, but when we analyzed only those individuals under the age of 65 years, we found that the genotype V/V compared with V/L and when purchased with genotype (L/L+V/L) has a protective factor (OR: 0.338 CI:0.134-0.858, p = 0.022 and OR: 0.046; CI: 0.166-0.990,p=0,047,

respectively). We also found that genotype V/L compared with genotype (V/V+L/L) gives a risk for developing prostate cancer (OR:1.651; CI:1.043-2.613, p=0.032).

**Conclusion:** Our study suggests that among people under 65 years of age, the genotype V/L may play a significant risk of developing CaP and genotype V/V is associated with a protective factor for prostate cancer.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

C – citosina

CaP – Câncer de Próstata

DHT – dihidrotestosterona

EUA – Estados Unidos da América

G – Guanina

GH - hormônio do crescimento

LH-RH - hormônio liberador de gonadotrofinas

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

IGF-1 – fator de crescimento análogo à insulina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LaBiMET – Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral

LH – hormônio luteinizante

L/L – leucina/leucina

NADPH – Nicotinamida Adenina dinucleotídeo-P

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – odds ratio

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

PSA – Antígeno prostático específico

RA – receptor de androgênio

SRD5A1 – 5 alfa-redutase tipo 1 (steroid-5-alpha-reductase type 1)

SRD5A2 – 5 alfa-redutase tipo 2 (steroid-5-alpha-reductase type 2)

SHBG - globulina transportadora de hormônios sexuais

TCLE – termo de consentimento livre esclarecido

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

V89L – Substituição de valina por uma leucina no códon 89

V/V – valina/valina

V/L – valina/leucina

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.....16**

**Figura 2.....17**

**Figura 3.....24**

**Figura 4.....26**

**Figura 5.....27**

## ANEXOS

<b>Anexo I.....</b>	<b>64</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo III.....</b>	<b>68</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 A próstata</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2 Câncer de Próstata</b> .....	<b>15</b>
<b>1.2.1 Epidemiologia</b> .....	<b>15</b>
<i>1.2.2 Etiologia</i> .....	<b>18</b>
<i>1.2.3 Diagnóstico</i> .....	<b>19</b>
<b>1.3 Androgênios</b> .....	<b>21</b>
<b>1.4 Mecanismo de ação dos hormônios esteróides</b> .....	<b>22</b>
<b>1.5 5 <math>\alpha</math>-redutase</b> .....	<b>24</b>
<b>1.5 Polimorfismo V89L</b> .....	<b>26</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>31</b>
<b>4 Pacientes e Método</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 População em Estudo</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão</b> .....	<b>33</b>
<i>4.2.1 Casos</i> .....	<b>33</b>
<i>4.2.2 Controles</i> .....	<b>33</b>
<b>4.3 Delineamento da Pesquisa</b> .....	<b>33</b>
<b>4.4 Variáveis em Estudo</b> .....	<b>33</b>
<b>4.5 Análise laboratorial</b> .....	<b>33</b>
<b>4.6 Análise molecular</b> .....	<b>34</b>
<i>4.6.1 Extração de DNA</i> .....	<b>34</b>

4.6.2 <i>Real Time PCR</i> .....	35
4.7 Locais de coleta de dados e de amostra .....	35
4.8 Cálculo do tamanho amostral.....	36
4.9 Análise estatística.....	36
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38
ARTIGO.....	45
CONCLUSÕES .....	60

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 A próstata**

A próstata é uma glândula exócrina derivada de ácinos glandulares cuja origem embrionária origina o segmento uretral do seio urogenital. Sua função é facilitar a fertilização por neutralizar o pH do sêmen e por participar na liquefação seminal, entre outras funções pouco esclarecidas (1).

Diversas doenças podem estar relacionadas com a próstata, entre elas destacam-se os processos inflamatórios, infecciosos ou não, denominados prostatites; o aumento benigno da zona de transição da glândula, chamado de hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP) (2).

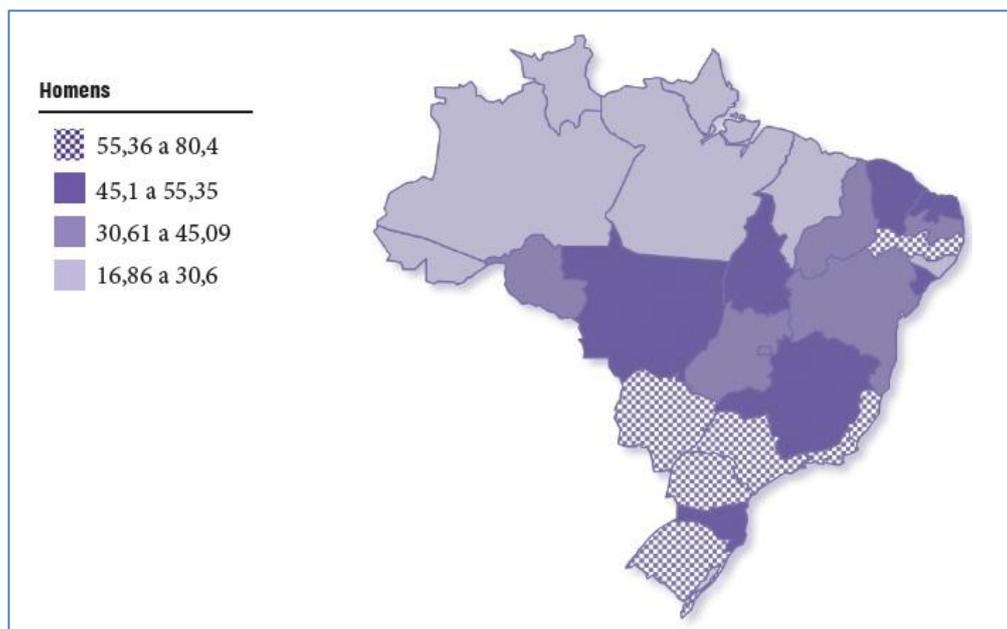
### **1.2 Câncer de Próstata**

#### *1.2.1 Epidemiologia*

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

próstata e de pulmão no sexo masculino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (3).

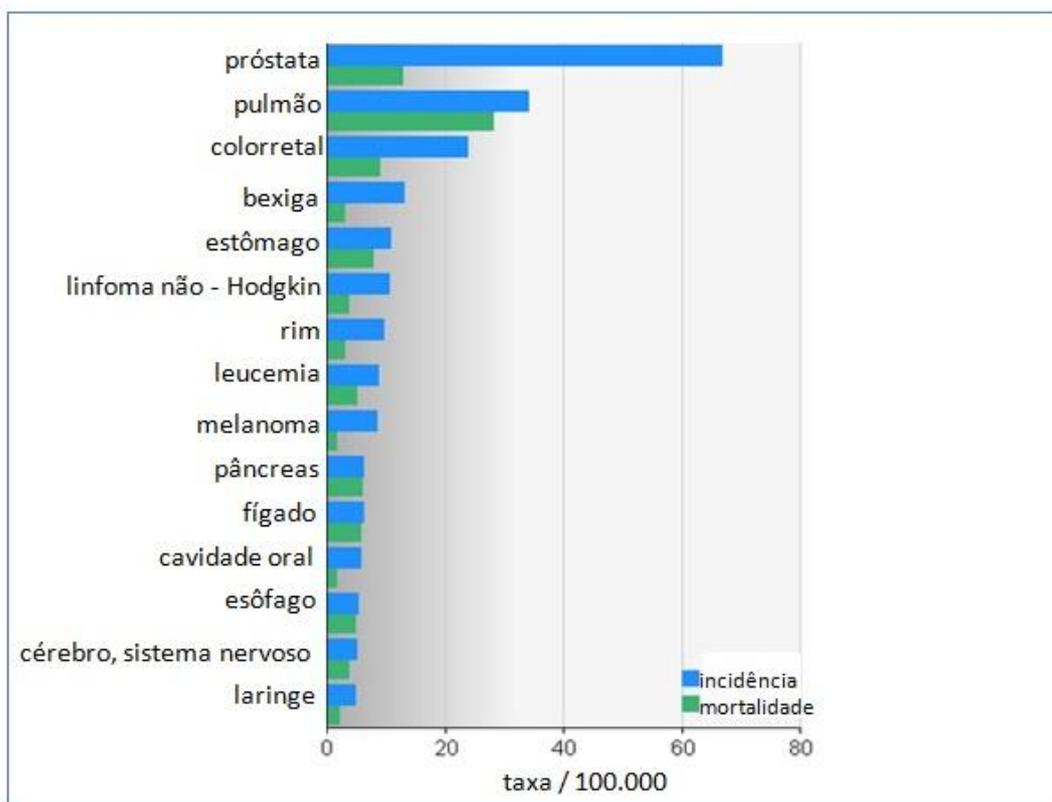
O CaP no Brasil tem um risco estimado de 69/100.000 na região Sul, 69/100.000 na região Sudeste, 62/100.000 na região Centro-Oeste, 48/100.000 na região Nordeste, e 24/100.000 na região Norte (risco estimado a cada 100 mil homens), sendo que a estimativa para o Rio Grande do Sul é de 4.510/100.000 e em Porto Alegre é de 690/100.000 novos casos no ano de 2010 (3). O mapa abaixo (figura 1) mostra uma representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia de próstata a cada 100 mil homens, estimadas para o ano de 2010, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA):



**FIGURA 1** Estimativa de CaP / 100.000 homens de acordo com cada estado brasileiro. Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>

O CaP tem se tornado um problema de saúde pública desde 1985, correspondendo à sexta causa mais comum de câncer no mundo, sendo o câncer mais comum em homens nos Estados Unidos da América (EUA) e na Europa (4).

Nos EUA, em torno de 218.890 novos casos de CaP foram detectados em 2005, sendo considerado o câncer com maior número de casos. O CaP é o câncer visceral que mais ocorre no ocidente, sendo menor prevalência na Ásia. Em países em desenvolvimento, como na Índia, 80% dos pacientes já estão em um estágio incurável da doença quando esta é detectada. (5). A estimativa para o CaP neste ano nos EUA é de 217.730 novos casos de acordo com os dados do *American Cancer Society* (6). O gráfico abaixo (figura 2) demonstra a incidência e mortalidade de câncer entre homens na região das Américas, apontando o CaP com maior incidência.



**FIGURA 2** Incidência e mortalidade de câncer entre homens na região das Américas de acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=992>

### *1.2.2 Etiologia*

O aumento da prevalência do CaP deve-se principalmente à melhoria das técnicas diagnósticas, principalmente com o advento do antígeno prostático específico (PSA) (7).

Apesar de uma alta mortalidade e morbidade associada à neoplasia, sua etiologia ainda é obscura (8, 9). É estimado que 42% do CaP pode ser causado por influências genéticas (5), além disso, estudos epidemiológicos demonstram que estão relacionados com o risco de desenvolver o CaP uma série de fatores, tais como ambientais (estilo de vida, poluentes, tabagismo, alto consumo de gordura animal, metabolismo hormonal) e etnia (10, 11).

O consumo de frutas, vegetais ricos em carotenóides como tomates e cenouras, e leguminosas como feijão, ervilha e soja; vitaminas do tipo A e D diminuem o risco de desenvolvimento do CaP. Um alto consumo energético total e ingestão de grande quantidade de carne vermelha, gorduras e derivados do leite tem sido relacionado a aumento da probabilidade de desenvolvimento do CaP. Aminas heterocíclicas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fator de crescimento análogo à insulina (IGF-1), consumo excessivo de álcool e tabagismo também são tidos como responsáveis pelo aumento do risco (12).

A hereditariedade é um dos fatores envolvidos na etiologia do câncer de próstata visto que homens que apresentam um familiar de primeiro grau acometido com esta doença têm um risco duas vezes mais de desenvolver a doença quando comparado com homens que não tem. Esta chance aumenta em até onze vezes se houver dois ou três membros da família acometidos. Homens que apresentam um

irmão com CaP tem maior probabilidade de ter a neoplasia em relação aqueles cujo somente o pai teve a doença (13).

A incidência do câncer de próstata varia muito entre diferentes populações étnicas e países. As taxas mais baixas estão entre os países asiáticos e as taxas mais altas na América do Norte e Escandinávia. Nos EUA, os afro-americanos apresentam uma incidência 1,5 vezes maior que os caucasianos e quase três vezes maior que homens de origem asiática (14, 15). O risco de CaP aumenta entre os asiáticos quando eles imigram para a América do Norte, reforçando a concepção de que os fatores ambientais atuam conjuntamente com fatores genéticos na carcinogênese prostática (16).

Foi demonstrado que a incidência de CaP em homens afro-americanos é 60 % maior que o observado em homens caucasianos e a mortalidade desta doença é aproximadamente 2 - 4 vezes mais alta em afro-americanos (17), demonstrando assim, a influência da etnia sobre a carcinogênese do CaP.

### *1.2.3 Diagnóstico*

O tumor da próstata é composto de um parênquima de células epiteliais em proliferação, de um estroma de tecido conjuntivo e de vasos sanguíneos. Sua progressão é muito variada, havendo tumores benignos, que não se desenvolvem e não trazem consequências secundárias ao indivíduo, outros que se desenvolvem lentamente e ainda uma terceira classe de tumores graves que se desenvolvem rapidamente, tornam-se malignos e levam o paciente à morte em pouco tempo (18).

Atualmente não há nenhum teste que permita a diferenciação entre estas diferentes formas de evolução dos tumores. Dessa forma, é importante que o

diagnóstico do câncer seja precoce na tentativa de se obter sucesso no tratamento das formas graves. Quando o tumor é detectado precocemente é mais provável que este tenha uma localização regional e, conseqüentemente, um maior potencial de cura, através de terapia local (19, 20).

O PSA é uma protease presente em altas concentrações no líquido seminal, cuja função é liquefazer o sêmen e permitir a fertilização masculina (21). Com desenvolvimento do tumor, existe uma maior permeabilidade das células, permitindo passagem do PSA para os vasos sanguíneos mais facilmente (22).

A dosagem sérica do PSA tem sido utilizada há mais de vinte e cinco anos no auxílio do diagnóstico e segmento do CaP. Embora altamente sensível, apresenta baixa especificidade, pois seus níveis séricos apresentam-se elevados em outras condições, tais como, prostatite e hiperplasia prostática benigna (HPB) (23). Desta forma, a detecção precoce do CaP se dá principalmente através da determinação sérica do PSA, associado ao exame do toque retal e biópsia prostática (24).

Em 1989, Catalona e seus colaboradores iniciaram um estudo em larga escala populacional analisando o uso PSA e toque retal. Este estudo demonstrou que a dosagem sérica de PSA juntamente com o exame do toque retal reforçam a detecção e o diagnóstico do CaP (25). Outro estudo similar feito por Cooner e colaboradores, também reportou um melhor diagnóstico em pacientes com a associação destes dois exames (26).

A classificação e o estadiamento do tumor são utilizados em uma técnica amplamente utilizada para predizer o prognóstico e facilitar a escolha da terapia. A graduação pela escala de Gleason é a mais aceita na atualidade, baseando-se na

análise morfológica das células tumorais e sua disposição acinar para determinar a extensão da doença (27).

A escala de Gleason é baseada no padrão glandular do tumor, verificando em pequena magnificação. Ambos os padrões (mais comum) e secundário (segundo mais comum) são identificados e para eles é determinada graduação que varia de um a cinco, sendo um o mais diferenciado e o cinco o mais indiferenciado. Como os dois padrões são importantes para a determinação do prognóstico, deu-se origem à soma dos graus de Gleason, denominada score de Gleason que, portanto, varia de dois a dez (27, 28).

Na maioria dos casos, os tumores da próstata apresentam uma forte correlação entre sua aparência histológica e expressão clínica. Portanto, a classificação histológica do tumor, juntamente com a avaliação clínica do paciente é de fundamental importância no tratamento que será ministrado. Geralmente, tumores de baixo grau de diferenciação histológica progridem rapidamente, enquanto que tumores de alto grau de diferenciação apresentam uma progressão lenta. Entretanto deve-se ressaltar que, apenas o conhecimento do estágio histológico do tumor, não permite traçar o prognóstico clínico do paciente, uma vez que é variável em cada indivíduo (28).

### **1.3 Androgênios**

Os androgênios são hormônios esteróides que induzem a diferenciação e maturação dos órgãos reprodutivos masculinos e desenvolvimento das características sexuais secundárias. No homem, os androgênios são produzidos nos testículos, córtex adrenal e em menor extensão em tecidos periféricos (8).

Hormônios sexuais podem desempenhar um importante papel na carcinogênese prostática (29, 30) por alterar o balanço entre a proliferação celular e apoptose. Embora os androgênios sejam essenciais para o desenvolvimento normal e crescimento da próstata, administrações prolongadas de testosterona tem sido reportado gerar tumor prostático em roedores (31), além de aumentarem as linhagens celulares tumorais prostáticas (32).

A testosterona e a dihidrotestosterona (DHT) são os dois androgênios mais importantes de um homem adulto, sendo que o primeiro é o principal androgênio em circulação, enquanto o segundo é o principal androgênio tecidual (33).

Evidências epidemiológicas e bioquímicas sugerem que variações nos níveis de androgênios podem estar relacionadas com a carcinogênese prostática. Podendo desempenhar um importante papel na expressão de genes que regulam os níveis hormonais e o crescimento do CaP. Os androgênios são essenciais para a estimulação do desenvolvimento normal, crescimento, e atividade secretora da próstata, enquanto estrogênios são geralmente considerados como moduladores destes efeitos (5).

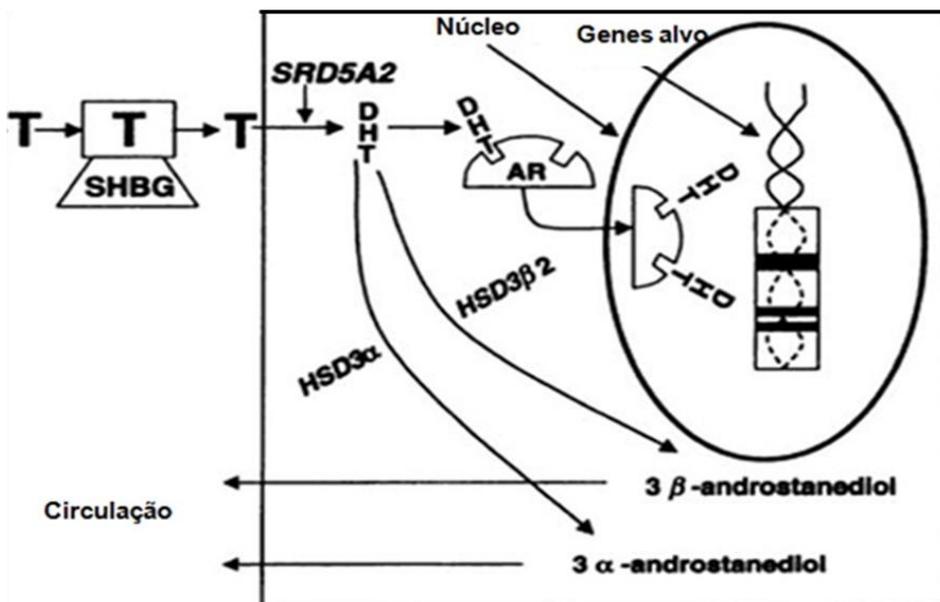
#### **1.4 Mecanismo de ação dos hormônios esteróides**

A ação dos hormônios esteróides inicia quando estes migram da corrente sanguínea para a célula através da membrana celular por meio de um mecanismo de difusão. Uma vez dentro da célula, os esteróides formam complexos através de ligações com proteínas, chamadas de receptores, que são específicas deste tecido (34).

Em torno de 95% dos androgênios 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 (LH-RH) do hipotálamo. Os outros 5% são liberados principalmente na forma de androstenediona, e são sintetizados nas adrenais sob ação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise, que é regulado pelo LH-RH. A prolactina e o hormônio do crescimento (GH) também estimulam a produção de androgênios tanto nos testículos como nas adrenais, tendo um efeito mitogênico sobre as células epiteliais da próstata (35).

No plasma, 98% da testosterona 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 5% da testosterona 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% de testosterona livre é irreversivelmente convertida na próstata, sob ação da enzima 5  $\alpha$ -redutase tipo II (SRD5A2) com o NADPH como cofator, ao mais ativo metabólito intracelular, a dihidrotestosterona (36) .

A DHT liga-se ao então ao RA e forma um complexo que ativa o receptor. Uma vez ativado, o receptor dirige-se ao núcleo, dimeriza-se e liga-se a sequencias específicas em regiões regulatórias de genes alvo, podendo estimular a proliferação celular. (37). A figura 3 mostra de forma esquemática o mecanismo de ação dos androgênios.



**FIGURA 3** Esquema de eventos da ação androgênica. Adaptado de Ross *et al* [39].

Devido o CaP ser um tumor androgênio-dependente, é provável que os marcadores genéticos estejam envolvidos na biossíntese de androgênios e metabolismo na doença da próstata. Isso é suportado pela evidência de genes envolvidos em vias androgênicas (38, 39).

### 1.5 5 α-redutase

Existem duas isoformas da enzima 5 α-redutase: tipo I, codificada pelo gene SRD5A1, composta por 260 aminoácidos, é expressa principalmente em couro cabeludo e pele de recém-nascidos e no fígado. O tipo II, codificado pelo gene SRD5A2, composta por 254 aminoácidos, é principalmente expresso na pele genital e na próstata. Essas duas isoformas apresentam 47% da sequência idêntica e com propriedades bioquímicas distintas.

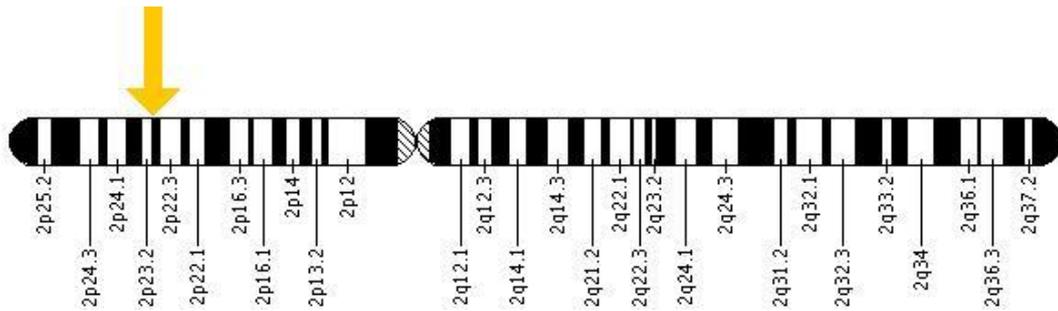
Esses dados sugerem que a isoforma I é primeiramente responsável pelo desenvolvimento genital masculino e calvice, enquanto a isoforma tipo II está envolvida no desenvolvimento e crescimento prostático (40, 41).

Alguns estudos dão suporte à hipótese de que a atividade da SRD5A2 seja importante na determinação do risco de CaP. O aumento dos níveis de DHT pode, por meio da atividade enzimática da SRD5A2, aumentar o risco de CaP, ao passo que uma menor atividade enzimática pode conduzir a menores níveis de DHT intraprostático, reduzindo o risco para tal doença (42).

Em um estudo realizado por Ross *et al* (43), foi demonstrado que jovens japoneses apresentam uma atividade de 5  $\alpha$ -redutase menor do que jovens caucasianos americanos e homens afro-americanos. Similarmente, Wu *et al.* (44), reportou que a relação entre DHT e testosterona foi maior em afro-americanos, intermediário em caucasianos e baixo em asiáticos, correspondendo com o respectivo risco de desenvolver o CaP nesses grupos.

Como mencionado anteriormente, a SRD5A2 é a enzima responsável por catalisar irreversivelmente a conversão da testosterona no principal androgênio prostático, DHT, sendo que a afinidade do DHT com o receptor androgênico prostático é cinco vezes maior do que o da testosterona (45).

O gene do SRD5A2 (figura 4) está localizado no cromossomo 2 (2p23), e apresenta 5 exons e 4 íntrons codificando a enzima esteróide redutase tipo II (46-48).



**Figura 4** Representação do cromossomo 2 e localização do gene SRD5A2. Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6716>

### 1.5 Polimorfismo V89L

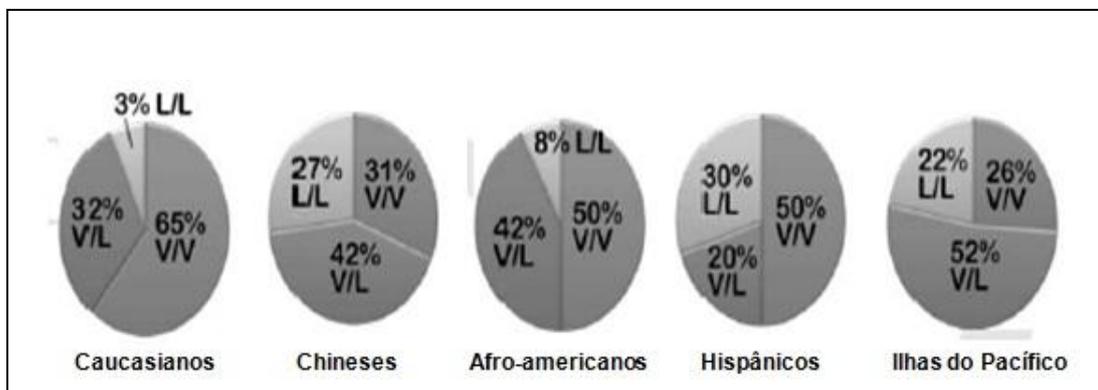
Fatores genéticos são apontados como influentes na regulação dos hormônios sexuais e estima-se que a herdabilidade seja em torno de 12%-76% para a maioria destes hormônios (49, 50), aumentando desta forma, o interesse em estudos relacionados a polimorfismos, os quais podem alterar a regulação ou o metabolismo hormonal (31).

Polimorfismos são variantes genéticas que ocorrem em pelo menos 1 % da população. Variantes polimórficas significam diferenças alélicas no gene e, conseqüentemente, diferenças na função das proteínas (51).

A pesquisa por marcadores genéticos de susceptibilidade a doenças geralmente focam um gene, baseado nas propriedades e vias metabólicas de seus produtos protéicos, assim, genes envolvidos na biossíntese de androgênios e na cascata do metabolismo podem identificar possíveis alterações na carcinogênese prostática. Diferenças étnicas em polimorfismos genéticos apresentam um papel no metabolismo da testosterona e outros androgênios podem acometer diferentes raças no risco de CaP (45).

Os polimorfismos relacionados ao gene SRD5A2 podem codificar a enzima 5  $\alpha$ -redutase modificada, levando a diferentes atividades, provavelmente devido a uma estabilidade alterada do mRNA. Makridakis *et. al.* (52), reportou uma substituição do tipo *missense* (troca de um nucleotídeo) no gene SRD5A2, o qual ocorre uma troca de um nucleotídeo guanina (G) por uma citosina (C) (53-56), resultando na substituição de uma valina por uma leucina no códon 89 (57-59). Essa substituição resulta em uma redução de quase 30% na atividade da enzima 5  $\alpha$ -redutase tanto *in vivo* como *in vitro* quando comparado com o gene selvagem. Sendo assim, esse polimorfismo pode alterar os níveis e a atividade da DHT e conseqüentemente estar relacionado com o risco de CaP (45, 60).

Na figura 5 pode ser observado a frequência fenotípica deste polimorfismo em diferentes grupos étnicos (61):



**Figura 5** Frequência fenotípica do polimorfismo V89L em diferentes populações. Adaptado de Scariano *et al* [61].

Vários polimorfismos associados ao gene SRD5A2 tem sido estudados e relatados quanto a possível associação com o aumento do risco/susceptibilidade do CaP. Em estudos realizados recentemente com o polimorfismo V89L em diferentes populações, demonstrou um aumento deste polimorfismo em pacientes com CaP

quando comparado com o grupo caso-controle, além disso, os autores demonstram associação com a hiperplasia prostática benigna (47, 57).

Em outro estudo, realizado por Li *et. al.* (56), foi demonstrado que o polimorfismo V89L não apresentou diferença significativa na frequência genotípica na população de pacientes com CaP e hiperplasia prostática benigna quando comparados com o grupo controle. No entanto, em homens com o genótipo V/V ou V/L apresentaram um aumento significativo do risco de desenvolver CaP em comparação com o genótipo L/L, demonstrando desta forma que no polimorfismo V89L do gene SRD5A2, o alelo V apresenta uma associação com o aumento do risco de CaP.

Por outro lado, os achados de um estudo feito por Cicek *et. al.* (62), mostra que o polimorfismo V89L pode influenciar no risco de desenvolver CaP, especialmente entre homens jovens com diagnóstico comprovado ou com a doença em caráter mais agressivo. Da mesma forma, Bogger-Meggido *et. al.* (54), observou que a associação da agressividade da doença prostática é mais eminente em indivíduos que apresentam o genótipo V/V do que em homens com o genótipo V/L ou L/L, porém o aumento do risco do tumor em homens com genótipo V/L e L/L é restrito para casos de tumores mais agressivos.

Já Cussenot *et. al.* (63), verificou em uma amostra da população francesa que apresenta o genótipo L/L para o polimorfismo V89L tem um risco aumentado para o CaP.

Paz-y-Mino *et. al.* (59), também verificou que indivíduos de uma população equatoriana apresentam ao menos um alelo V pode ter um risco aumentado no desenvolvimento de CaP.

Um estudo feito por Nam *et. al.* (64) verificou que em pacientes que apresentavam o alelo V tinham um risco duas vezes maior para desenvolver CaP, e um risco adicional duas vezes maior de apresentar progressão da doença quando comparados com pacientes com genótipo L/L.

Já Pearce *et al* (65) não obtiveram os mesmos resultados, ou seja, não houve diferença estatística com risco maior entre aqueles com alelo V. Yamada *et. al.* (66), também avaliou o polimorfismo V89L através de um estudo caso-controle em uma população japonesa e não encontraram diferença estatística que conferisse maior risco aqueles que possuíam o alelo V.

Uma metanálise realizada neste ano, investigou a associação entre o polimorfismo V89L com o risco de CaP em 25 artigos elegíveis, onde o total de amostras analisadas foram de 8615 casos (CaP) e 9089 controles. Foi verificado que o polimorfismo está associado significativamente com câncer em homens com idade inferior a 65 anos e em europeus. Já asiáticos e africanos não apresentaram associações significantes (67).

Diante do exposto, observando essa diferença do polimorfismo em diferentes populações, o presente projeto teve como objeto investigar a associação do polimorfismo V89L do gene SRD5A2 com o risco de câncer de próstata em uma amostra da população do Rio Grande do Sul.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Diversos estudos têm buscado um melhor esclarecimento sobre os diferentes mecanismos genéticos envolvidos na carcinogênese da próstata. Porém, a correlação destes eventos e sua ação integrada ou independente ainda não estão bem elucidadas. Além disso, os mecanismos destes eventos podem ser diferentes nas diversas populações.

Portanto, a caracterização destas alterações em diferentes populações é de maior importância, pois com uma melhor compreensão destes eventos acredita-se que será possível o estabelecimento de testes diagnósticos preditivos mais efetivos, aumentando o potencial de cura dos pacientes bem como o desenvolvimento de uma terapia mais adequada.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliação da associação do polimorfismo V89L do gene SRD5A2 com o risco de câncer de próstata em uma amostra da população do Rio Grande do Sul.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliação da frequência do polimorfismo V89L em uma amostra de indivíduos com câncer de próstata e em um grupo controle;
- Correlação da frequência do polimorfismo V89L com os níveis séricos de testosterona total e livre, bem como o PSA.

## **4 PACIENTES E MÉTODO**

### **4.1 População em Estudo**

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

Os controles foram recrutados do ambulatório do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e, após a verificação dos critérios de inclusão e exclusão, foram encaminhados ao local específico desta pesquisa. Após esclarecimento dos objetivos da pesquisa e aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo I), foi realizada a coleta de sangue venoso periférico para avaliação do polimorfismo e para dosagem sérica de testosterona total, testosterona livre e dosagem de PSA total. Os dados relacionados aos itens de identificação e informações da história clínica serão registrados em ficha específica (Anexo III).

Já os pacientes com diagnóstico de CaP foram recrutados no ambulatório do Serviço de Urologia do HCPA, e foram encaminhados a um local específico para o esclarecimento desta pesquisa através do TCLE (Anexo II) e, após assinado o

termo, foi realizada a coleta de sangue venoso periférico para avaliação do polimorfismo e para dosagem sérica dos hormônios em estudo.

## **4.2 Critérios de Inclusão e Exclusão**

### *4.2.1 Casos*

Pacientes entre 45 e 80 anos com diagnóstico de CaP procedentes do ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que não tivessem recebido tratamento quimioterápico ou terapia hormonal e sem outra neoplasia concomitante.

### *4.2.2 Controles*

Pacientes entre 45 e 80 anos dos ambulatórios de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que apresentassem um exame de toque retal normal e sem diagnóstico de outra neoplasia concomitante, foram aceitos no grupo controle.

## **4.3 Delineamento da Pesquisa**

Estudo de caso-controle.

## **4.4 Variáveis em Estudo**

- Análise da associação entre o polimorfismo V89L do gene da enzima 5  $\alpha$ -redutase tipo II (SRD5A2) com o aumento do risco de câncer de próstata.

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

## **4.5 Análise laboratorial**

Foram colhidas amostras de sangue venoso para as dosagens de testosterona total, testosterona livre e PSA, sendo dosadas no laboratório de Patologia Clínica do HCPA.

#### **4.6 Análise molecular**

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET) do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

##### *4.6.1 Extração de DNA*

A extração de DNA foi realizada a partir do sangue total coletado em tubos com EDTA dos pacientes dos grupos controles e CaP. Logo após foi realizada a lise de hemácias utilizando 2 volumes de Solução de Lise de Hemácias (NH<sub>4</sub>Cl 114 mM, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 1mM) sendo incubada a solução por 30 minutos em temperatura ambiente. Após, a solução foi centrifugada por 15 minutos à 3000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. A etapa de lise de hemácias foi repetida mais uma vez. Em seguida, realizou-se a lise de leucócitos com 1,8 mL de Solução de Lise de Leucócitos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM, pH 8,0), 36 µl de SDS a 10% e 30 µL de Proteinase K (10 mg/mL). A solução foi homogeneizada e incubada a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após a incubação, foi adicionado à solução 0,72 mL de Solução Saturada de NaCl (6M). A solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, foi transferido o sobrenadante e acrescentado 2 volumes de etanol absoluto gelado para precipitar o DNA. O DNA foi retirado e colocado em tubo *ependorf* contendo 0,9 mL de etanol 70% gelado e a solução foi centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm. Essa etapa se repetiu por mais duas vezes. Após desprezou-se o sobrenadante e o álcool foi evaporado no ar

ambiente, ficando, somente, o *pellet* de DNA no eppendorf. Na etapa final, o *pellet* foi ressuspenso em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0), aquecido por 5 minutos a uma temperatura de 65°C e, em seguida, armazenado a uma temperatura de 80°C negativos.

#### 4.6.2 Real Time PCR

A análise molecular foi feita através da PCR em Tempo Real, com sistema de detecção de sondas Taqman® (Applied Biosystems). As sondas lineares de hidrólise incluem além do PCR e os *primers* específicos, um fluorocromo “*reporter*”, o qual emite fluorescência e uma molécula “*quencher*”, a qual absorve a fluorescência emitida pelo “*repórter*”.

O equipamento utilizado foi o PCR real time *StepOne* (Applied Biosystems). A tabela abaixo descreve a preparação do Mix:

Mix	Quantidade em µl por poço
Taqman Universal PCR Master Mix (2x)	7,5
Reagente de trabalho (20x) do ensaio inventariado para o polimorfismo em estudo	0,75
Amostra de DNA contendo concentração de 10 ng	6,75

As condições de ciclagem utilizadas foram: 40 ciclos, sendo 10 minutos a 95°C, desnaturação 10 segundos a 92°C e anelamento 1 minuto a 60°C.

#### 4.7 Locais de coleta de dados e de amostra

A história clínica, coleta de dados, assinatura do TCLE e coleta de sangue foram realizados no Serviço de Urologia do HCPA. Também foram utilizadas 188 amostras já armazenadas pelo projeto 04.243 para avaliação do polimorfismo V89L, em que 105 correspondem aos casos e 83 aos controles. Sendo que a possibilidade de reutilização do DNA desses pacientes está presente no TCLE do projeto mencionado acima.

#### **4.8 Cálculo do tamanho amostral**

O cálculo amostral foi baseado no estudo de Nam *et. al.* (64). Considerando-se um poder de 80% e um nível de significância de 95% para o genótipo V/V do polimorfismo V89L do gene SRD5A2, o tamanho amostral, a partir do *software* WinPepi 3.0, foi de 342 pacientes, sendo 171 com CaP e 171 controles.

#### **4.9 Análise estatística**

Foi utilizado o teste Qui-quadrado para as correlações entre os grupos estudados com as diferentes variáveis e para comparar a frequência genotípica entre casos e controles. Regressão logística binária corrigida pela idade foi usada para estimar o Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% para associação entre os diferentes genótipos do polimorfismo e o risco de desenvolver câncer de próstata.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg para as frequências genotípicas do polimorfismo para casos e controles também foi verificado.

Foi considerado o nível de significância como  $p < 0,05$  e foi utilizado o processador de dados SPSS versão 18.0.

## 5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

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

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

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Presti JC. Neoplasms of prostate gland. In: Tanagho EM, McAninch JW. 2000;15ed(Lange Medical Books):399-421.
2. Srougi M. Próstata: Isso é com você. 2003(Publifolha, São Paulo):18-55.
3. INCA. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2010. 2010.
4. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. Lancet. 2003 Mar 8;361(9360):859-64.
5. Sobti RC, Gupta L, Singh SK, Seth A, Kaur P, Thakur H. Role of hormonal genes and risk of prostate cancer: gene-gene interactions in a North Indian population. Cancer Genet Cytogenet. 2008 Sep;185(2):78-85.
6. AmericanCancerSociety. Cancer Facts & Figures. 2010.
7. Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, Hayes RB, Legler JM, Prorok PC, et al. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. J Natl Cancer Inst. 1999 Jun 16;91(12):1017-24.
8. Chokkalingam AP, Stanczyk FZ, Reichardt JK, Hsing AW. Molecular epidemiology of prostate cancer: hormone-related genetic loci. Front Biosci. 2007;12:3436-60.
9. dos Santos RM, de Jesus CM, Trindade Filho JC, Trindade JC, de Camargo JL, Rainho CA, et al. PSA and androgen-related gene (AR, CYP17, and CYP19) polymorphisms and the risk of adenocarcinoma at prostate biopsy. DNA Cell Biol. 2008 Sep;27(9):497-503.
10. Lima MM, Jr., Oliveira MN, Granja F, Trindade AC, De Castro Santos LE, Ward LS. Lack of association of GSTT1, GSTM1, GSTO1, GSTP1 and CYP1A1

polymorphisms for susceptibility and outcome in Brazilian prostate cancer patients. *Folia Biol (Praha)*. 2008;54(3):102-8.

11. Zeegers MP, Kiemeny LA, Nieder AM, Ostrer H. How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Nov;13(11 Pt 1):1765-71.

12. Schulman CC, Ekane S, Zlotta AR. Nutrition and prostate cancer: evidence or suspicion? *Urology*. 2001 Sep;58(3):318-34.

13. Reiter RE, Kernion JB. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Walsh: *Campbell's Urology*. 2002;8th(WB Saunders):3002-3.

14. Bennett CL, Price DK, Kim S, Liu D, Jovanovic BD, Nathan D, et al. Racial variation in CAG repeat lengths within the androgen receptor gene among prostate cancer patients of lower socioeconomic status. *J Clin Oncol*. 2002 Sep 1;20(17):3599-604.

15. Platz EA, Rimm EB, Willett WC, Kantoff PW, Giovannucci E. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Dec 20;92(24):2009-17.

16. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 24;349(4):366-81.

17. Neslund-Dudas C, Bock CH, Monaghan K, Nock NL, Yang JJ, Rundle A, et al. SRD5A2 and HSD3B2 polymorphisms are associated with prostate cancer risk and aggressiveness. *Prostate*. 2007 Nov 1;67(15):1654-63.

18. Konishi N, Hiasa Y, Matsuda H, Tao M, Tsuzuki T, Hayashi I, et al. Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. *Am J Pathol*. 1995 Oct;147(4):1112-22.

19. Ripple GH, Wilding G. Drug development in prostate cancer. *Semin Oncol*. 1999 Apr;26(2):217-26.

20. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD, Frantz ME, Spooner AE, Ogata GK, et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med*. 1995 May 25;332(21):1393-8.

21. Yu H, Diamandis EP, Levesque M, Asa SL, Monne M, Croce CM. Expression of the prostate-specific antigen gene by a primary ovarian carcinoma. *Cancer Res*. 1995 Apr 15;55(8):1603-6.

22. Young CY, Montgomery BT, Andrews PE, Qui SD, Bilhartz DL, Tindall DJ. Hormonal regulation of prostate-specific antigen messenger RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer Res.* 1991 Jul 15;51(14):3748-52.
23. Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J, Schalken JA, Rittenhouse H. Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett.* 2007 Apr 28;249(1):5-13.
24. Carter HB, Pearson JD. Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer: formulation of guidelines. *Urology.* 1999 Nov;54(5):780-6.
25. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med.* 1991 Apr 25;324(17):1156-61.
26. Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL, Jr., Beard JH, Pond HS, Terry WJ, et al. Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol.* 1990 Jun;143(6):1146-52; discussion 52-4.
27. Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol.* 1974 Jan;111(1):58-64.
28. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* 1992 Mar;23(3):273-9.
29. Lunn RM, Bell DA, Mohler JL, Taylor JA. Prostate cancer risk and polymorphism in 17 hydroxylase (CYP17) and steroid reductase (SRD5A2). *Carcinogenesis.* 1999 Sep;20(9):1727-31.
30. Bosland MC. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000(27):39-66.
31. Berndt SI, Chatterjee N, Huang WY, Chanock SJ, Welch R, Crawford ED, et al. Variant in sex hormone-binding globulin gene and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Jan;16(1):165-8.
32. Webber MM, Bello D, Quader S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate.* 1997 Jan 1;30(1):58-64.
33. Hsing AW. Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev.* 2001;23(1):42-58.

34. Bratoeff E, Cabeza M, Ramirez E, Heuze Y, Flores E. Recent advances in the chemistry and pharmacological activity of new steroidal antiandrogens and 5 alpha-reductase inhibitors. *Curr Med Chem*. 2005;12(8):927-43.
35. Galbraith SM, Duchesne GM. Androgens and prostate cancer: biology, pathology and hormonal therapy. *Eur J Cancer*. 1997 Apr;33(4):545-54.
36. Kirby R, Christmas T. Benign Prostatic Hyperplasia. 1993(Wolfe):107.
37. Choong CS, Wilson EM. Trinucleotide repeats in the human androgen receptor: a molecular basis for disease. *J Mol Endocrinol*. 1998 Dec;21(3):235-57.
38. Hsing AW, Reichardt JK, Stanczyk FZ. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate*. 2002 Aug 1;52(3):213-35.
39. Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, Reichardt JK, Yu MC, Feigelson H, et al. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res*. 1998 Oct 15;58(20):4497-504.
40. Reichardt JK, Makridakis N, Henderson BE, Yu MC, Pike MC, Ross RK. Genetic variability of the human SRD5A2 gene: implications for prostate cancer risk. *Cancer Res*. 1995 Sep 15;55(18):3973-5.
41. Titus MA, Gregory CW, Ford OH, 3rd, Schell MJ, Maygarden SJ, Mohler JL. Steroid 5alpha-reductase isozymes I and II in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Jun 15;11(12):4365-71.
42. Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ. Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Aug 21;88(16):1118-26.
43. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, et al. 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet*. 1992 Apr 11;339(8798):887-9.
44. Wu AH, Whittemore AS, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, West DW, et al. 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*. 1995 Oct-Nov;4(7):735-41.
45. Ntais C, Polycarpou A, Tsatsoulis A. Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur J Endocrinol*. 2003 Dec;149(6):469-77.
46. Mononen N, Schleutker J. Polymorphisms in genes involved in androgen pathways as risk factors for prostate cancer. *J Urol*. 2009 Apr;181(4):1541-9.

47. Salam MT, Ursin G, Skinner EC, Dessissa T, Reichardt JK. Associations between polymorphisms in the steroid 5-alpha reductase type II (SRD5A2) gene and benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urol Oncol*. 2005 Jul-Aug;23(4):246-53.
48. Roberts RO, Bergstralh EJ, Farmer SA, Jacobson DJ, McGree ME, Hebring SJ, et al. Polymorphisms in the 5alpha reductase type 2 gene and urologic measures of BPH. *Prostate*. 2005 Mar 1;62(4):380-7.
49. Meikle AW, Stephenson RA, Lewis CM, Wiebke GA, Middleton RG. Age, genetic, and nongenetic factors influencing variation in serum sex steroids and zonal volumes of the prostate and benign prostatic hyperplasia in twins. *Prostate*. 1997 Oct 1;33(2):105-11.
50. Ring HZ, Lesov CN, Reed T, Marcus R, Holloway L, Swan GE, et al. Heritability of plasma sex hormones and hormone binding globulin in adult male twins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jun;90(6):3653-8.
51. Jorde, Carey, Bramshad, White. Variação genética: sua origem e detecção. In: *Genética Médica*. 2004;3ª edição(Elsevier):33-64.
52. Makridakis N, Ross RK, Pike MC, Chang L, Stanczyk FZ, Kolonel LN, et al. A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5alpha-reductase. *Cancer Res*. 1997 Mar 15;57(6):1020-2.
53. Allen NE, Forrest MS, Key TJ. The association between polymorphisms in the CYP17 and 5alpha-reductase (SRD5A2) genes and serum androgen concentrations in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Mar;10(3):185-9.
54. Boger-Megiddo I, Weiss NS, Barnett MJ, Goodman GE, Chen C. V89L polymorphism of the 5alpha-reductase Type II gene (SRD5A2), endogenous sex hormones, and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Feb;17(2):286-91.
55. Febbo PG, Kantoff PW, Platz EA, Casey D, Batter S, Giovannucci E, et al. The V89L polymorphism in the 5alpha-reductase type 2 gene and risk of prostate cancer. *Cancer Res*. 1999 Dec 1;59(23):5878-81.
56. Li Z, Habuchi T, Mitsumori K, Kamoto T, Kinoshita H, Segawa T, et al. Association of V89L SRD5A2 polymorphism with prostate cancer development in a Japanese population. *J Urol*. 2003 Jun;169(6):2378-81.
57. Giwercman YL, Abrahamsson PA, Giwercman A, Gadaleanu V, Ahlgren G. The 5alpha-reductase type II A49T and V89L high-activity allelic variants are more

common in men with prostate cancer compared with the general population. *Eur Urol.* 2005 Oct;48(4):679-85.

58. Gsur A, Feik E, Madersbacher S. Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World J Urol.* 2004 Feb;21(6):414-23.

59. Paz-y-Mino C, Witte T, Robles P, Llumipanta W, Diaz M, Arevalo M. Association among polymorphisms in the steroid 5alpha-reductase type II (SRD5A2) gene, prostate cancer risk, and pathologic characteristics of prostate tumors in an Ecuadorian population. *Cancer Genet Cytogenet.* 2009 Mar;189(2):71-6.

60. Li X, Huang Y, Fu X, Chen C, Zhang D, Yan L, et al. Meta-analysis of three polymorphisms in the steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2 gene (SRD5A2) and risk of prostate cancer. *Mutagenesis.* 2010 Dec 21.

61. Scariano JK, Treat E, Alba F, Nelson H, Ness SA, Smith AY. The SRD5A2 V89L polymorphism is associated with severity of disease in men with early onset prostate cancer. *Prostate.* 2008 Dec 1;68(16):1798-805.

62. Cicek MS, Conti DV, Curran A, Neville PJ, Paris PL, Casey G, et al. Association of prostate cancer risk and aggressiveness to androgen pathway genes: SRD5A2, CYP17, and the AR. *Prostate.* 2004 Apr 1;59(1):69-76.

63. Cussenot O, Azzouzi AR, Nicolaiiew N, Mangin P, Cormier L, Fournier G, et al. Low-activity V89L variant in SRD5A2 is associated with aggressive prostate cancer risk: an explanation for the adverse effects observed in chemoprevention trials using 5-alpha-reductase inhibitors. *Eur Urol.* 2007 Oct;52(4):1082-7.

64. Nam RK, Toi A, Vesprini D, Ho M, Chu W, Harvie S, et al. V89L polymorphism of type-2, 5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology.* 2001 Jan;57(1):199-204.

65. Pearce CL, Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Kolonel LN, Henderson BE, et al. Steroid 5-alpha reductase type II V89L substitution is not associated with risk of prostate cancer in a multiethnic population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Apr;11(4):417-8.

66. Yamada Y, Watanabe M, Murata M, Yamanaka M, Kubota Y, Ito H, et al. Impact of genetic polymorphisms of 17-hydroxylase cytochrome P-450 (CYP17) and steroid 5alpha-reductase type II (SRD5A2) genes on prostate-cancer risk among the Japanese population. *Int J Cancer.* 2001 Jun 1;92(5):683-6.

67. Wang C, Tao W, Chen Q, Hu H, Wen XY, Han R. SRD5A2 V89L polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Prostate*. 2010 Feb 1;70(2):170-8.

**ARTIGO**

## **Analysis of Polymorphism V89L of SRD5A2 Enzyme and Risk of Developing Prostate Cancer in a Sample of Rio Grande do Sul**

Bruna Amorin<sup>1</sup>, Walter J. Koff<sup>2</sup>, Tiago O. Fontanive<sup>1</sup>, Vanderlei Biolchi<sup>1</sup>, Ilma S. Brum<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Molecular Biology and Tumor Endocrinology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.*

<sup>2</sup> *Department of Urology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.*

### **Abstract**

**BACKGROUND:** 5  $\alpha$ -reductase type II (SRD5A2) is responsible for the biosynthesis of dihydrotestosterone (DHT) in the prostate. The polymorphism V89L, a valine (V) for leucine (L) substitution at the codon 89 of the SRD5A2 gene was evaluated with regard to prostate cancer risk.

**METHODS:** Blood samples were collected for 169 prostate cancer cases and 177 healthy controls. Genotypes (V/V, V/L and L/L) were compared among cases and controls.

**RESULTS:** The genotype V/V was significantly more common in the controls compared with cases. Meanwhile, we found no association between the genotypes of polymorphism V89L and the risk of developing prostate cancer. However, when we analyzed only patients under 65 years of age, we found that genotype V/V compared with genotype V/L or (L/L + V/L), is a protective factor (OR: 0.338 CI: 0.134-0.858,  $p = 0.022$  and OR: 0.046; CI: 0.166 to 0.990,  $p = 0.047$ , respectively). We also found that genotype V/L compared with genotype (V/V + L/L) presents a risk to developing prostate cancer (OR: 1.651 CI: 1.043 to 2.613,  $p = 0.032$ ).

**CONCLUSIONS:** Our study suggests that among patients under 65 years of age, genotype V/L V89L polymorphism may play a significant relationship with the risk of developing PCa and genotype V/V is associated with a protective factor for prostate cancer.

Keywords: prostate cancer; V89L; SRD5A2.

## **INTRODUCTION**

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer in men within the United States and Europe (1, 2). In 2010, the estimate for PCa in the U.S. is 217,730 new cases according to data from the American Cancer Society (3). The estimated incidence of prostate cancer in Brazil for the 2010, which will also be valid for the year 2011, is 489,270 new cases of cancer, being more incidents types the prostate cancers and lung cancer in males, following the same pattern as the magnitude observed for Latin America (4), except for skin cancer of non-melanoma. In Rio Grande do Sul, the estimate for PCa in 2010 is 4,510 cases per 100,000 men, and Porto Alegre is 690 cases per 100,000 men.

Despite a high mortality and morbidity associated with cancer, its etiology is still unclear (5, 6). It is estimated that 42% of PCa may be caused by genetic influences (7), because the incidence of prostate cancer varies widely among different ethnic populations and countries. It was shown that the incidence of PCa in men African-Americans is 60% higher than those observed in white groups and mortality from this disease is approximately 2-4 times higher in African-Americans (8).

Androgens are steroid hormones that induce the differentiation and maturation of male reproductive organs and development of secondary sexual characteristics. In men, androgens are produced in the testicle, adrenal cortex, and, in minor extent in peripheral tissues (5). Testosterone and dihydrotestosterone (DHT) are the two most important androgens in adult men, and the first is the main androgen in circulation, while the second is the main androgen tissue (9).

Over 90% of free testosterone is irreversibly converted under the action of the enzyme 5  $\alpha$ -reductase type II (SRD5A2), with NADPH as a co-factor, the most active metabolite intracellular dihydrotestosterone (DHT) (10).

Due to PCa androgen be an androgen-dependent tumor, it is likely that the genetic markers are involved in androgen biosynthesis and metabolism in prostate disease. This is supported by the evidence of genes involved in androgen via (11, 12).

The SRD5A2 gene is located on chromosome 2 (2p23), and has five exons and four introns coding the enzyme steroid reductase type II (13-15). Polymorphisms related to gene SRD5A2 may encode the enzyme 5  $\alpha$ -reductase modified, leading to different activities, probably due to an altered mRNA stability. Makridakis et. al. (16), reported a missense substitution (exchange of one nucleotide) in the SRD5A2 gene, which occurs an exchange of a nucleotide guanine (G) by a cytosine (C) (17-20), resulting in the substitution of valine by a leucine at codon 89 (21-23). This substitution results in a reduction of almost 30% in the activity of 5  $\alpha$ -reductase both *in vivo* and *in vitro* (24).

The aim of this study was to investigate the association of V89L polymorphism of SRD5A2 gene with prostate cancer risk in a population sample from Rio Grande do Sul.

## **METHODS**

### **Study population**

It was conducted a case-control study in patients with prostate cancer and controls recruited at the Outpatient Department of Urology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). The study was approved by the local and National Ethics Committee and informed consent was obtained from every subject.

The study included patients with prostate cancer between 45 and 80 years of age, who did not receive chemotherapy or hormonal therapy and no other concomitant cancer. The controls included patients between 45 and 80 years of age, who had a normal digital rectal examination, PSA lower than 2.0 ng/mL and without concomitant neoplasia. It was collected from peripheral venous blood for assessment of polymorphism and serum total testosterone, free testosterone and serum PSA.

### **DNA extraction**

Genomic DNA for patients and controls was extracted from peripheral blood leukocytes. After erythrocyte lysis, leukocytes lysis was done using 2mL of specific solution (150mM NaCl, 10nM Tris-HCl, pH 8.0, 10nM EDTA, pH 8.0), 36µl 10% SDS and 30 µl PK (10 mg / mL) and incubated at 37 °C for 18 hours. DNA was extracted and precipitated with 70% ethanol and re-

suspended with specific buffer 10:0, 1 TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA, pH 8.0).

### **Real Time PCR**

Molecular analysis was performed by Real Time PCR, with the probe detection system *Taqman*® (Applied Biosystems). The equipment used was the Real Time PCR *StepOne* (Applied Biosystems). Each reaction contained 7.5 mL of *Taqman Universal PCR Master Mix (2x)*, 0.75 µL of working reagent (20x) of an inventoried assay for the polymorphism studied (rs523349) and 6.75 µL of DNA sample containing a concentration of 10 ng.

The cycling conditions used were: 40 cycles, for 10 minutes at 95 °C, denaturation for 10 seconds at 92 °C, and annealing for 1 minute at 60 °C.

### **Laboratory tests**

Total testosterone was measured using radioimmunoassay, DSL kit (Diagnostic Systems Laboratory Inc., Webster, Texas). PSA and SHBG dosing were performed by electrochemiluminescence, 2010 Elecsys kit (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim, Germany). Free testosterone was calculated by "free testosterone calculator" (<http://www.issam.ch/freetesto.htm>). Albumin was analyzed using a colorimetric assay, Roche kit (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim, Germany).

Analyses were performed at the Department of Clinical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using SPSS (version 18.0).

We used the Chi-square test for correlations between groups with different variables and to compare the genotypes frequencies between cases and controls. Binary logistic regression adjusted for age was used to estimate the Odds Ratio (OR), with confidence interval of 95% for association between different genotypes of the polymorphisms and the risk of developing prostate cancer.

The Hardy-Weinberg equilibrium for the genotypes frequencies of the polymorphism for cases and controls was also verified.

## RESULTS

For the V89L polymorphism analysis, 169 cases and 177 controls were analyzed. The main characteristics of the sample are shown in Table I.

The mean age was  $63 \pm 7$  years and  $59 \pm 7$  years for cases and controls, respectively. The median total testosterone was 3.9 (3.3 to 5.2) for the cancer group and 4.2 (3.3 to 5.5) for the control group. Mean free testosterone was  $8.0 \pm 2.8$  and  $8.2 \pm 3.05$  for cases and controls, respectively. Serum PSA was 7.8 (5.65 to 12.92) and 1.04 (0.63 to 2.95) for cases and controls, respectively. PSA levels were higher in PCa than in controls groups ( $p < 0.05$ ).

It was found a frequency of 4.7% and 11.3% of homozygous genotype V/V to the cancer and control group, respectively. For the homozygous genotype L/L, the frequency was 45.6% in the cancer group and 47.5% in the control group and the heterozygote genotype V/L, it was found the frequency of 49.7% and 41.2% in case and control groups, respectively (Table II).

When the analysis of genotype frequency was made in cancer and control group (Table III), it showed that the genotype V/V compared with V/L is significantly more frequent in the control group ( $p = 0.043$ ), in the same manner when it was compared with the genotypes L/L + V/L ( $p = 0.026$ ).

When it was made risk analysis by binary logistic regression adjusted for age in all genotypes between cancer and control groups (Table IV), it showed no significant statistical difference in any of the genotypes for the risk of developing prostate cancer. However, when we analyzed the patients under 65 years of age (Table V), we found that patients who have the genotype V/V, compared with genotype V/L, have a decreased risk for developing prostate cancer (OR: 0.338, 95% CI :0,134-0, 858,  $p = 0.022$ ). We also observed this protective factor in patients who have the genotype V/V compared with the genotypes (L/L + V/L) (OR: 0.406, 95% CI :0,166-0, 990,  $p = 0.047$ ). In relation to patients with genotype V/L compared with the genotypes (V/V + L/L), we found a risk for developing prostate cancer (OR: 1.651, 95% CI 1.043 to 2.613,  $p = 0.032$ ).

Correlating the serum total testosterone level, free testosterone and PSA in the different genotypes of polymorphism V89L, we found no significance in these variables. When it was made the equilibrium analysis, we found that patients in the cancer group are in disequilibrium ( $p = 0.043$ ).

## **DISCUSSION**

Although the genetic factor for prostate cancer is poorly understood, variations in genes related to biosynthesis and metabolism of androgens have been a hypothesis to change the risk of developing prostate cancer (25).

The survey for genetic markers of susceptibility to diseases often focuses on one gene, based on the properties of metabolic via of their protein products. Thus, genes involved in an androgen biosynthesis and in metabolism cascade can identify possible changes in prostate carcinogenesis. Ethnic differences in genetic polymorphisms have a role in the metabolism of testosterone, and other androgens may affect different ethnic groups in the risk of developing PCa (24).

In our study, we analyzed the V89L polymorphism in patients that self-declared white and African descents. Both ethnic groups were analyzed together because they have a similar frequency distribution between cases and controls. The frequency of L/L genotype, followed by V/L, was the most frequent (46.5% and 45.4%, respectively). Some studies have demonstrated that the distribution of genotypes for the V89L polymorphism for the gene patterns of incidence of prostate cancer, have a prevalence of genotype L/L of 22-25% among Asians and only about 4% among whites and African-Americans, and the V/V genotype prevalence of 27-29% among Asians and about 58% among whites and African-Americans (26-28). According to data from the National Cancer Institute, the frequency of polymorphic variants in white groups is 3% L/L, 65% V/V 32% V/L and African-American is 8% L/L 50% V/V 42% V/L (29).

When the total sample was analyzed, we found no statistically significant association between the V89L polymorphism genotypes and the risk of developing PCa. Several studies also found no association of V89L polymorphism with the risk of developing PCa in different ethnic groups (7, 19, 25, 28, 30, and 31).

However, when we analyzed only patients under 65 years of age, we found that patients who have the genotype V/V genotype in comparison with the V/L have a decreased risk for developing prostate cancer, which may be regarded as a protective genotype. We also observed this protective factor in patients who have the genotype V/V compared with the genotypes (L/L + V/L).

These findings of our study are similar to data from a meta-analysis by Wang *et. al.* (32). In this study, analyzing 323 cases and 677 controls, patients under the age of 65 years who present the L/L genotype compared with genotype V/V have an increased risk of developing PCa (OR: 1.70, CI: 1, 09 to 2.66,  $p = 0.02$ ), reinforcing the idea of genotype V/V as a protective factor for PCa.

On the other hand, other studies that did not age-restricted, as the case-control study performed by *Physician's Health Study* found a small protective factor in the L/L genotype, but their results did not show a statistical significance (19). Similarly, Lunn *et al.* (30) found 10% of reduction in risk associated with L/L genotype, but again, this result does not support a statistical significance.

In relation to patients under the age of 65 years and who have the genotype V/L compared with the genotypes (V/V + L/L), we found an increased risk for developing prostate cancer.

Results of a case-control study suggest that variants of the V89L polymorphism may influence the risk of PCa, particularly among men with a younger age of diagnosis or more aggressive cases of the disease (33).

Without limiting the age, Li *et. al.* (20) found no significant difference between the frequencies of genotypes in patients with prostate cancer and controls ( $p = 0.071$ ). However, men with V/V or V/L genotypes showed a significant risk of developing cancer compared with patients with L/L genotype (OR 1.69, 95% CI 1.07 to 2.65,  $p = 0.024$ ). Another study by Nam *et. al.* (34) examined 320 men, of these 158 (49.4%) had a positive biopsy for prostate cancer. The risk for developing cancer in patients who had at least one V allele was 2.53 compared with patients who had the L/L genotype ( $p = 0.03$ ). Thus, it was shown that men with a V allele for the SRD5A2 gene have twice the risk of developing prostate cancer.

A study by Bogger-Megiddo *et. al.* (18), found that the association of aggressiveness of prostate disease is more prominent in patients who have the genotype V/V than in men with genotype V/L or L/L, but increased risk of tumor in men with genotype V/L and L/L is restricted to cases of more aggressive tumors. Another study by Paz-y-Mino *et. al.* (23) also found that patients of the Ecuadorian population have at least one V allele may have an increased risk of developing PCa.

Moreover, Cussenot *et. al.* (35), found in a sample of the French population, which presents the L/L genotype for polymorphism V89L, an increased risk for PCa. Three other studies also found a positive association between the L allele and the risk of PCa (29, 33, and 36).

Already Neslund Dudas *et. al.* (8) concluded that the V89L polymorphism is not associated independently with the risk of prostate cancer, only if the

patient also carries at least one allele of another polymorphism, such as the HSD3B2 gene polymorphism.

When the Hardy-Weinberg analysis was made, we found that patients in the cancer group are in disequilibrium ( $p=0.043$ ). Loukola *e.t a.l.*, (37) analyzed several polymorphisms related to androgen via and found that there is an association of polymorphisms, including the V89L, with the risk of developing PCa, but in his study also showed that V89L polymorphism is in disequilibrium ( $p = 0.02$ ) and argues that it is difficult to discern what may be a random variation or whether all variants can be analyzed in linkage disequilibrium.

In conclusion, our study suggests that among patients under 65 years of age, genotype V/L V89L polymorphism may play a significant relationship with the risk of developing PCa and genotype V/V is associated with a protective factor for prostate cancer.

### **Acknowledgements**

Fund Research Incentive Events and the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA-FIFE) and the Laboratory of Tumor Biology and Molecular Endocrinology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS-LaBiMET).

### **References**

1. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003;361(9360):859-864.
2. Silva Neto B, Koff WJ, Biolchi V, Brenner C, Biolo KD, Spritzer PM, Brum IS. Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest* 2008;26(1):74-80.
3. AmericanCancerSociety. *Cancer Facts & Figures*. 2010.
4. INCA. *Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil para 2010*. 2010.

5. Chokkalingam AP, Stanczyk FZ, Reichardt JK, Hsing AW. Molecular epidemiology of prostate cancer: hormone-related genetic loci. *Front Biosci* 2007;12:3436-3460.
6. dos Santos RM, de Jesus CM, Trindade Filho JC, Trindade JC, de Camargo JL, Rainho CA, Rogatto SR. PSA and androgen-related gene (AR, CYP17, and CYP19) polymorphisms and the risk of adenocarcinoma at prostate biopsy. *DNA Cell Biol* 2008;27(9):497-503.
7. Sobti RC, Gupta L, Singh SK, Seth A, Kaur P, Thakur H. Role of hormonal genes and risk of prostate cancer: gene-gene interactions in a North Indian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;185(2):78-85.
8. Neslund-Dudas C, Bock CH, Monaghan K, Nock NL, Yang JJ, Rundle A, Tang D, Rybicki BA. SRD5A2 and HSD3B2 polymorphisms are associated with prostate cancer risk and aggressiveness. *Prostate* 2007;67(15):1654-1663.
9. Hsing AW. Hormones and prostate cancer: what's next? *Epidemiol Rev* 2001;23(1):42-58.
10. Kirby R, Christmas T. Benign Prostatic Hyperplasia. 1993(Wolfe):107.
11. Hsing AW, Reichardt JK, Stanczyk FZ. Hormones and prostate cancer: current perspectives and future directions. *Prostate* 2002;52(3):213-235.
12. Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, Reichardt JK, Yu MC, Feigelson H, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res* 1998;58(20):4497-4504.
13. Mononen N, Schleutker J. Polymorphisms in genes involved in androgen pathways as risk factors for prostate cancer. *J Urol* 2009;181(4):1541-1549.
14. Salam MT, Ursin G, Skinner EC, Dessissa T, Reichardt JK. Associations between polymorphisms in the steroid 5-alpha reductase type II (SRD5A2) gene and benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urol Oncol* 2005;23(4):246-253.
15. Roberts RO, Bergstralh EJ, Farmer SA, Jacobson DJ, McGree ME, Hebring SJ, Cunningham JM, Anderson SA, Thibodeau SN, Lieber MM, Jacobsen SJ. Polymorphisms in the 5alpha reductase type 2 gene and urologic measures of BPH. *Prostate* 2005;62(4):380-387.
16. Makridakis N, Ross RK, Pike MC, Chang L, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Shi CY, Yu MC, Henderson BE, Reichardt JK. A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5alpha-reductase. *Cancer Res* 1997;57(6):1020-1022.
17. Allen NE, Forrest MS, Key TJ. The association between polymorphisms in the CYP17 and 5alpha-reductase (SRD5A2) genes and serum androgen concentrations in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(3):185-189.
18. Boger-Megiddo I, Weiss NS, Barnett MJ, Goodman GE, Chen C. V89L polymorphism of the 5alpha-reductase Type II gene (SRD5A2), endogenous sex hormones, and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(2):286-291.
19. Febbo PG, Kantoff PW, Platz EA, Casey D, Batter S, Giovannucci E, Hennekens CH, Stampfer MJ. The V89L polymorphism in the 5alpha-

- reductase type 2 gene and risk of prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59(23):5878-5881.
20. Li Z, Habuchi T, Mitsumori K, Kamoto T, Kinoshita H, Segawa T, Ogawa O, Kato T. Association of V89L SRD5A2 polymorphism with prostate cancer development in a Japanese population. *J Urol* 2003;169(6):2378-2381.
  21. Giwercman YL, Abrahamsson PA, Giwercman A, Gadaleanu V, Ahlgren G. The 5alpha-reductase type II A49T and V89L high-activity allelic variants are more common in men with prostate cancer compared with the general population. *Eur Urol* 2005;48(4):679-685.
  22. Gsur A, Feik E, Madersbacher S. Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World J Urol* 2004;21(6):414-423.
  23. Paz-y-Mino C, Witte T, Robles P, Llumipanta W, Diaz M, Arevalo M. Association among polymorphisms in the steroid 5alpha-reductase type II (SRD5A2) gene, prostate cancer risk, and pathologic characteristics of prostate tumors in an Ecuadorian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;189(2):71-76.
  24. Pearce CL, Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Kolonel LN, Henderson BE, Reichardt JK. Steroid 5-alpha reductase type II V89L substitution is not associated with risk of prostate cancer in a multiethnic population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(4):417-418.
  25. Ntais C, Polycarpou A, Tsatsoulis A. Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur J Endocrinol* 2003;149(6):469-477.
  26. Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Crocitto LE, Kolonel LN, Pearce CL, Henderson BE, Reichardt JK. Association of mis-sense substitution in SRD5A2 gene with prostate cancer in African-American and Hispanic men in Los Angeles, USA. *Lancet* 1999;354(9183):975-978.
  27. Ross RK, Bernstein L, Lobo RA, Shimizu H, Stanczyk FZ, Pike MC, Henderson BE. 5-alpha-reductase activity and risk of prostate cancer among Japanese and US white and black males. *Lancet* 1992;339(8798):887-889.
  28. Yamada Y, Watanabe M, Murata M, Yamanaka M, Kubota Y, Ito H, Katoh T, Kawamura J, Yatani R, Shiraishi T. Impact of genetic polymorphisms of 17-hydroxylase cytochrome P-450 (CYP17) and steroid 5alpha-reductase type II (SRD5A2) genes on prostate-cancer risk among the Japanese population. *Int J Cancer* 2001;92(5):683-686.
  29. Scario JK, Treat E, Alba F, Nelson H, Ness SA, Smith AY. The SRD5A2 V89L polymorphism is associated with severity of disease in men with early onset prostate cancer. *Prostate* 2008;68(16):1798-1805.
  30. Lunn RM, Bell DA, Mohler JL, Taylor JA. Prostate cancer risk and polymorphism in 17 hydroxylase (CYP17) and steroid reductase (SRD5A2). *Carcinogenesis* 1999;20(9):1727-1731.
  31. Rajender S, Vijayalakshmi K, Pooja S, Madhavi S, Paul SF, Vettriseli V, Shroff S, Singh L, Thangaraj K. Longer (TA)<sub>n</sub> repeat but not A49T and V89L polymorphisms in SRD5A2 gene may confer prostate cancer risk in South Indian men. *J Androl* 2009;30(6):703-710.

32. Wang C, Tao W, Chen Q, Hu H, Wen XY, Han R. SRD5A2 V89L polymorphism and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Prostate* 2010;70(2):170-178.
33. Cicek MS, Conti DV, Curran A, Neville PJ, Paris PL, Casey G, Witte JS. Association of prostate cancer risk and aggressiveness to androgen pathway genes: SRD5A2, CYP17, and the AR. *Prostate* 2004;59(1):69-76.
34. Nam RK, Toi A, Vesprini D, Ho M, Chu W, Harvie S, Sweet J, Trachtenberg J, Jewett MA, Narod SA. V89L polymorphism of type-2, 5-alpha reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology* 2001;57(1):199-204.
35. Cussenot O, Azzouzi AR, Nicolaiew N, Mangin P, Cormier L, Fournier G, Valeri A, Cancel-Tassin G. Low-activity V89L variant in SRD5A2 is associated with aggressive prostate cancer risk: an explanation for the adverse effects observed in chemoprevention trials using 5-alpha-reductase inhibitors. *Eur Urol* 2007;52(4):1082-1087.
36. Shibata A, Garcia MI, Cheng I, Stamey TA, McNeal JE, Brooks JD, Henderson S, Yemoto CE, Peehl DM. Polymorphisms in the androgen receptor and type II 5 alpha-reductase genes and prostate cancer prognosis. *Prostate* 2002;52(4):269-278.
37. Loukola A, Chadha M, Penn SG, Rank D, Conti DV, Thompson D, Cicek M, Love B, Bivolarevic V, Yang Q, Jiang Y, Hanzel DK, Dains K, Paris PL, Casey G, Witte JS. Comprehensive evaluation of the association between prostate cancer and genotypes/haplotypes in CYP17A1, CYP3A4, and SRD5A2. *Eur J Hum Genet* 2004;12(4):321-332.

**Table I**

## Main characteristics of the sample

Characteristics	PCa	Control
Age (years) <sup>a</sup>	63 ± 7	59 ± 7
Ethnic Groups <sup>c</sup>		
Caucasian	103	131
African descent	36	33
Family History	22 (13%)	22 (12.4%)
Total Testosterone (ng/mL) <sup>b</sup>	3.9 (3.3-5.2)	4.2 (3.3-5.5)
Free Testosterone (ng/mL) <sup>a</sup>	8.0 ± 2.8	8.2 ± 3.05
PSA <sup>b</sup>	7.8 (5.65-12.92)	1.04(0.63-1.95)*

<sup>a</sup> Values given as mean ± standard deviation<sup>b</sup> Values given as median (percentile 25-75)<sup>c</sup> The difference in relation to polymorphism refers to cases where race was not declared by the patient\**p* < 0.05**Table II**

## Frequency of patients with PCa and controls according to genotype

Genotype	Cancer	Control	Total
V/V	8 (4.7%)	20 (11.3%)	28 (8.1%)
L/L	77 (45.6%)	84 (47.5%)	161 (46.5%)
V/L	84 (49.7%)	73 (41.2%)	157 (45.4%)

**Table III**

Comparison of genotype frequency in cancer and control group

Genotype	Cancer	Control	Total	<i>p</i>
V/V	8 (9.4%)	20 (19.2%)	28 (14.8%)	0.059
L/L	77 (90.6%)	84 (80.8%)	161 (85.2%)	
V/V	8 (8.7%)	20 (21.50%)*	28 (15.22%)	0.043
V/L	84 (91.3%)	73 (78.49%)	156 (84.78%)	
L/L	77 (47.82%)	84 (53.85%)	161 (50.79%)	0.337
V/L	84 (52.18%)	72 (46.15%)	156 (49.21%)	
L/L	77 (45.6%)	84 (47.5%)	161 (46.5%)	0.724
V/V + V/L	92 (54.4%)	93 (52.5%)	185 (53.5%)	
V/V	8 (4.8%)	20 (11.3%)*	28 (8.1%)	0.026
L/L + V/L	160 (95.2%)	157 (88.7%)	317 (91.9%)	
V/L	84 (49.71%)	72 (40.90%)	156 (45.22%)	0.142
VV + L/L	85 (50.29%)	104 (59.10%)	189 (54.78%)	

\**p* < 0.05

**Table IV**

Risk analysis of the different genotypes between cancer and control groups

Genotype	OR	IC	<i>p</i>
V/V x L/L	0.538	(0.207-1.401)	0.024
V/V x V/L	0.410	(0.164-1.021)	0.055
L/L x V/L	0.733	(0.456-1.180)	0.201
L/L x (V/V+V/L)	0.834	(0.529-1.317)	0.437
V/V x (L/L+V/L)	0.469	(0.190-1.155)	0.100
V/L x (V/V+L/L)	1.498	(0.947-2.369)	0.084

**Table V**

Risk analysis of the different genotypes between cancer and control groups in people under 65 years of age

Genotype	OR	IC	<i>p</i>
V/V x L/L	0.479	(0.189-1.214)	0.121
V/V x V/L	0.338*	(0.134-0.858)	0.022
L/L x V/L	0.675	(0.420-1.085)	0.105
L/L x (V/V+V/L)	0.798	(0.507-1.254)	0.327
V/V x (L/L+V/L)	0.406*	(0.166-0.990)	0.047
V/L x (V/V+L/L)	1.651*	(1.043-2.613)	0.032

\*  $p < 0.05$

## CONCLUSÕES

- Somente em indivíduos com menos de 65 anos de idade que o genótipo V/V confere um fator protetor ao câncer de próstata e o genótipo V/L apresenta um risco para o desenvolvimento de CaP;
- Não houve correlação entre os diferentes genótipos do polimorfismo V89L e as dosagens séricas de testosterona total, testosterona livre e PSA;
- Indivíduos do grupo câncer apresentam um desequilíbrio em relação ao polimorfismo V89L.

## **ANEXO I**

### **Termo de Consentimento Informado - Controles**

Prezado Sr.:

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

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

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

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são Bruna Amorin e Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 512101-8286, 54 9963-4540), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

\_\_\_\_\_

Local e data

Paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Nome

\_\_\_\_\_

Assinatura

## **ANEXO II**

### **Termo de Consentimento Informado**

Prezado Sr.:

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

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

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

Os pesquisadores responsáveis por este Projeto são Bruna Amorin e Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 51 2101-8286, 54 9963-4540), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

\_\_\_\_\_

Local e data

Paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

Nome

\_\_\_\_\_

Assinatura

## **Anexo III**

### **Fichas Casos / Controle**

Nome:

Idade:

Prontuário:

Raça:

Naturalidade:

Procedência:

PSA:

Toque retal:

Testosterona Total:

Testosterona Livre:

Peso e altura:

Observações: