

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**

**Departamento de Fisiologia - UFRGS**

**Estudo do Polimorfismo CAG do Receptor de Androgênio em Pacientes com  
Hiperplasia Prostática Benigna**

**Vanderlei Biolchi**

**Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Ciência Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito  
parcial para obtenção do grau de Mestre.**

**Dezembro 2005**

*"Tudo faz sentido, tudo tem uma explicação, o detalhe é que para muitos, não evoluímos o suficiente para entendê-los"*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Fisiologia; Professores e Funcionários.

Ao serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por permitir a realização desse projeto.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilma Simoni Brum da Silva, minha orientadora, por ter me aceitado na realização desse projeto, pelo exemplo como pesquisadora, pelo constante estímulo, dedicação, principalmente, pela confiança e amizade.

Aos professores Edison Capp, Débora Martinho Morsch e Poli Mara Spritzer, pela amizade, convívio e ensinamentos sempre prestados.

Aos colegas de Laboratório, Adriane Pozzobon, Ana Luiza Ferrari, Antonio Miragem, Diego Pianta, Gisele Branchini, Juliana Vieira, Lolita Schneider, Mateus Reche, Polyana Maier, Sheila Lecke, Simone Radavelli, Rafael Orcy e Vivian Giesel, pela amizade e convívio durante a realização desse trabalho.

À secretária Mirian Sant'Helena, pelo carinho, dedicação e auxílio sempre disponibilizados.

À Idelma Oliveira Pithan, pelo carinho e dedicação diária na preparação dos materiais utilizados no laboratório.

Ao Dr. Brasil Silva Neto, pelo grande auxílio prestado no atendimento aos pacientes, fundamental para a realização deste projeto, e pela paciência ao me explicar procedimentos técnicos relacionados ao mesmo.

Ao acadêmico de Medicina Cleber Brener e ao Dr. Karlo Dorneles Biolo, pelo auxílio prestado no atendimento dos pacientes.

Aos meus amigos Fabiana Ribarcki, Felipe Amorim, Gabriela Cavagni, Glauco Caon, José Eduardo Maciel, Sandra Costa Valle e Ricardo Pellegrino, pela amizade e agradável companhia.

Aos meus pais Anselmo e Tercila, pelo amor, afeto, carinho e pelo empenho para me propiciar uma boa educação.

À minha namorada Inajara Barreto Kirst, pelo amor e carinho. Por tornar tranquilos meus momentos de apreensão.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>Hiperplasia Prostática Benigna</b> .....	<b>1</b>
<b>Fatores de Risco para HPB</b> .....	<b>2</b>
<i>Idade</i> .....	2
<i>Etnia</i> .....	2
<i>Dieta</i> .....	3
<i>Androgênios</i> .....	4
<i>Mecanismo de Ação dos Hormônios Esteróides</i> .....	5
<b>Aspectos Genéticos da HPB</b> .....	<b>6</b>
<i>Receptor de Androgênio (AR)</i> .....	8
<i>Polimorfismo CAG</i> .....	10
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>Objetivo geral</b> .....	<b>14</b>
<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>14</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
<b>Delineamento</b> .....	<b>15</b>
<b>Critérios de inclusão e exclusão:</b> .....	<b>15</b>
<i>Pacientes</i> .....	15
<b>Métodos</b> .....	<b>16</b>
<i>População em estudo:</i> .....	16
<i>Cálculo de tamanho de amostra:</i> .....	17
<b>Análise molecular</b> .....	<b>17</b>
<i>Extração de DNA:</i> .....	17
<i>Reação de PCR para a amplificação das repetições CAG:</i> .....	18
<i>Análise dos polimorfismos CAG do receptor de androgênio:</i> .....	21
<b>Análise Bioquímica</b> .....	<b>21</b>

<b>Análise estatística .....</b>	<b>21</b>
<b>Considerações éticas .....</b>	<b>22</b>
<b>Locais de realização do projeto .....</b>	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>24</b>
<b>ARTIGO .....</b>	<b>31</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 3 .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 4 .....</b>	<b>57</b>

## RESUMO

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é uma anormalidade proliferativa relacionada com a idade e muito freqüente no período da senescência. A Prevalência da HPB encontra-se em torno de 40 a 50% aos 50 anos e de aproximadamente 80% aos 70 anos. A patogênese da formação tumoral tem sido estreitamente associada à ação dos hormônios esteróides. Os efeitos androgênicos são mediados pela testosterona e dihidrotestosterona (DHT) nas células alvo e suas ações têm sido demonstradas na morfogênese, diferenciação, proliferação celular e secreções da glândula prostática. A ligação dos androgênios promove a ativação do receptor de androgênios, recrutamento de cofatores, promovendo a transcrição de genes alvo hormônio-dependentes. O gene do AR humano está localizado no cromossomo X apresentando regiões polimórficas no exon 1. O polimorfismo CAG é o mais estudado e seu número de repetições está inversamente correlacionado com a atividade transcricional do receptor. Este trabalho teve como objetivo analisar a freqüência do polimorfismo CAG do AR em uma amostra da população masculina do Rio Grande do Sul com e sem HPB e verificar se o número de repetições está relacionado com o desenvolvimento da HPB. Foram avaliados 44 pacientes com HPB e 52 controles. O DNA foi extraído de leucócitos do sangue periférico. A região do gene do AR correspondente ao polimorfismo CAG foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR). O produto da PCR foi avaliado por eletroforese capilar e analisado pelo *software Genemapper* no seqüenciador automático ABI3100 Avant. A análise estatística foi feita através do teste *t* para amostras independentes, teste de qui-quadrado, análise de regressão linear múltipla e análise de variância seguida

pelo teste complementar de Duncan quando mais de três grupos foram comparados. O número de repetições CAG variou de 16 a 30 no grupo controle e de 16 à 31 no grupo HPB. A média de repetições foi de  $22,27 \pm 3,04$  e  $21,64 \pm 2,89$  respectivamente ( $p=0,30$ ). A testosterona sérica diferiu entre os grupos HPB ( $4,18 \pm 1,34$  ng/dl) e controles ( $4,92 \pm 1,29$  ng/dl), sendo menor no grupo com HPB ( $p=0,009$ ). A correlação entre estas variáveis é de 0,256 ( $p= 0,014$ ). Porém, quando corrigida pela idade, a correlação diminui e perdeu a significância ( $p=0,104$ ). Estes resultados sugerem que não há correlação entre o número de repetições CAG e o risco de HPB na amostra estudada. Os níveis séricos de testosterona não estão associados com o número de repetições CAG. Pacientes com HPB têm níveis de testosterona mais baixos que os controles.



## ABSTRACT

Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) is a common proliferative disorder related to age, in the man. Prevalence of the BPH approximately meets around 40-50% to the 50 years of the age to as much as 80% for men in their 70s. Pathogenesis of the tumoral formation has been narrowly associated to the action of steroids hormones. The androgens effect is mediated by the testosterone and dihydrotestosterone (DHT) in the cells and their action has been demonstrated in morphogenesis, differentiation, cellular proliferation and secretions of the prostate gland. The binding of the androgens to promote the activation of the androgen receptor (AR), stimulating the transcription of androgen-responsive genes. The androgen receptor gene is located in chromosome Xq 11-12 and contains 8 exons. Polymorphic variants are present in the exon 1. The CAG repeat length in this region is inversely associated with the AR transcriptional activity. We investigated the association of CAG repeat length and the risk of prostatic hyperplasia in a case-control study from a South Brazilian population. We evaluated 44 BPH patients and 52 healthy controls. DNA was extracted from peripheral leucocytes and the AR gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). PCR product was analysed with ABI 3100 Avant sequencer and Genemapper software. Student *t* test, qui-square test and logistic regression was used to analyse the data. For variables without normal distribution, it was used the Wilcoxon-Mann-Whitney *U* test. CAG length varied of 16 to 30 in the control group and 16 to 31 in HPB group. CAG mean length was  $22,27 \pm 3,04$  in control group and  $21,69 \pm 2,89$  in cases ( $p=0,43$ ). Testosterone level was lower in HPB group ( $p=0,016$ ). However, when carried through an analysis of controlled correlation for the age, the correlation

between these two variables lost the significance ( $R = 0,16$ ;  $p = 0,12$ ). These results suggest that there is no correlation between the androgen receptor CAG repeat length and HPB. The testosterone serum level there is no associates with CAG length, but it was different between groups.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AF-1	Domínio Função de Ativação
AF-2	Domínio Função de Ativação
AF5	Domínio Função de Ativação)
AR	Receptor de Anrogênio
ARE	Elementos Responsivos aos Androgênios
AR-LBD	Domínio de Ligação do Ligante no AR
ATP	Adenosina trifosfato
CAG	Citosina, Adenina, Guanina
CaP	Câncer de Próstata
cDNA	DNA complementar
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ER	Receptor de Estrogênio
ERE	Elementos Responsivos aos Hormônios Esteróides
GGC	Guanina, Guanina, Citocina
GGN	Guanina, Guanina, (Citosina ou Guanina ou Timina)
GR	Receptor de Glicocorticóide
H	Hormônio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HPB	Hiperplasia prostática Benigna

HRE	Elemento Responsivo ao Hormônio
IC	Intervalo de Confiança
kDa	Kilo-Dalton
LNCaP	Células do câncer de prostate humano ( <i>human prostate cancer cell line</i> )
μl	Microlitro
Min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NLS	Sinal de Localização Nuclear
NR	Receptor Nuclear
NTP	Domínio Variável Amino-Terminal
OR	Razão de Probabilidade ( <i>Odds Ratio</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PR	Receptor de Progesterona
PSA	Antígeno Prostático Específico
R	Receptor
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAPII	RNA Polimerase do Tipo 2
rpm	Rotações por Minuto
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SBMA	Atrofia Muscular Espino-Bulbar
TE	Tampão Tris-HCl-EDTA
Tris-HCl	Tampão Tris-HCl
U	Unidade

## INTRODUÇÃO

### ***Hiperplasia Prostática Benigna***

Tecidos hormônio-dependentes estão sujeitos a uma alta incidência de distúrbios proliferativos, sendo a glândula prostática um dos tecidos alvo de hormônios esteróides que apresenta importantes alterações proliferativas. A regulação hormonal da próstata, incluindo os mecanismos moleculares que envolvem os processos de proliferação, diferenciação e apoptose não estão até hoje bem estabelecidos, assim como, os mecanismos de transformação neoplásica e carcinogênese. As alterações benignas, como a hiperplasia prostática benigna (HPB), são ainda pouco estudadas, mas podem ser um importante modelo para a investigação dos eventos iniciais que levam a proliferação celular descontrolada. A HPB é considerada uma doença progressiva, definida como o crescimento contínuo da próstata, levando a intensificação de sintomas e ao aumento do risco de complicações ao longo do tempo, como a retenção urinária aguda e cirurgia (Carson e Rittmaster, 2003).

Histologicamente, a HPB consiste no crescimento excessivo do tecido epitelial e fibromuscular da zona de transição da área periuretral da glândula prostática. Quando o tecido fibromuscular é preponderante, sintomas urinários são freqüentemente irritativos em vez de obstrutivos e podem estar correlacionados com o grau de estimulação da musculatura lisa pela atividade do sistema nervoso simpático (McNeal., 1990).

## **Fatores de Risco para HPB**

### **Idade**

A Hiperplasia Prostática Benigna é uma anormalidade proliferativa muito freqüente na espécie humana, relacionada com a idade (Kirby., 2000). Estimativas da prevalência da HPB são imprecisas devido a não uniformidade dos critérios de diagnósticos da doença (Neuhouser *et al.*, 2004).

A prevalência de HPB microscópica (sem evidências clínicas) em homens de 25 a 30 anos é de 10%, aumentando para mais de 50% aos 60 anos e atingindo em torno de 90% aos 85 anos. A HPB macroscópica pode ser detectável em torno dos 35 anos e atinge uma prevalência de mais de 50% aos 85 anos (Oesterling., 1996). Estudos mais recentes mostram que a prevalência da HPB encontra-se em torno de 40 a 50% aos 50 anos e de aproximadamente 80% aos 70 anos de idade (Kirby., 2000; Platz *et al.*, 2002). Dados da Associação Européia de Urologia mostram que a HPB é tão prevalente quanto à hipertensão e diabetes na população de mesma faixa etária (Curkendall *et al.*, 2000). Dados da Associação Americana de Urologia confirmam que aproximadamente 50% dos homens entre as idades de 51 e 60 anos e 90% dos homens acima de 80 anos desenvolvem HPB (<http://www.urologyhealth.org/search> acessado em 16/07/05). Infelizmente, não dispomos de dados a respeito da incidência de HPB na população brasileira.

### **Etnia**

A incidência da HPB varia entre diferentes populações étnicas e países. As taxas mais baixas de incidência da HPB estão entre os países asiáticos (Denis *et al.*,

1999; Griffiths *et al.*, 1998). O mesmo achado foi visto em asiático-americanos (Kang *et al.*, 2004). Por outro lado, têm sido observadas taxas de incidência de HPB mais elevadas em populações africanas (Dawam *et al.*, 2000); A população brasileira apresenta características étnicas altamente heterogêneas, com grande miscigenação entre Europeus, Africanos e Ameríndios na sua constituição. Populações consideradas como sendo de raça branca, através de características físicas, apresentam uma significativa fração de traços genéticos característicos de africanos e ameríndios. O mesmo foi observado quando se tentou identificar indivíduos da raça negra através da observação de características fenotípicas. A exceção foi encontrada na população da cidade de Veranópolis/RS onde existe uma manutenção dos traços genéticos que caracterizam ancestralidade européia (Parra *et al.*, 2003; Marrero *et al.*, 2005). Em virtude dessas observações, a correlação entre a etiologia da HPB e a raça na população brasileira, torna-se uma tarefa difícil, senão sem relevância clínica.

### **Dieta**

Fatores nutricionais podem influenciar o desenvolvimento da HPB. Obesidade, falta de atividade física, dislipidemias, diabetes, hipertensão, pobre status nutricional podem significativamente aumentar o risco de HPB (Moyad., 2003; Lagiou *et al.*, 1999, Campbell., 2005). Estudos sugerem um papel protetor dos fitoestrógenos (flavonóides, isoflavonóides, ligninas) (Denis *et al.*, 1999, Griffiths *et al.*, 1998, Brossner *et al.*, 2004) e do leucopeno (Kim *et al.*, 2003) nos distúrbios prostáticos relacionados à HPB.

A composição de macronutrientes da dieta pode ser importante. Um consumo elevado de ácidos graxos insaturados pode contribuir na peroxidação lipídica da membrana das células e dos componentes da fluidez destas membranas, que poderiam afetar a atividade 5 $\alpha$ -redutase (Liang e Liao., 1992). Weisser e Krieg., (1998) identificaram mudanças, relacionadas à idade, na composição de ácidos graxos do epitélio e do estroma da próstata em homens com HPB.

### ***Androgênios***

A patogênese da formação tumoral tem sido estreitamente associada à ação de hormônios esteróides (Geck *et al.*, 1999; Geck *et al.*, 2000; Latil *et al.*, 2001). Estes hormônios exercem sua ação através de receptores nucleares, que são fatores de transcrição e regulam a expressão de genes alvo de uma maneira dependente do ligante.

As ações dos androgênios têm sido amplamente demonstradas na próstata humana, seja por sua importância na morfogênese, diferenciação, proliferação celular e secreções da glândula prostática (Lee *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 1999; Avances *et al.*, 2001; Planz *et al.*, 2001) ou como tratamento de câncer de próstata e HPB (Daneshgari e Crawford.,1993). A regulação desses processos requer a ativação de genes responsivos e dependentes da ativação do complexo androgênio-receptor (Cude *et al.*, 1999; Brinkmann *et al.*, 1999).

Os efeitos dos androgênios são mediados pela testosterona e dihidrotestosterona (DHT) nas células. A ligação destes ligantes induz o AR a assumir uma configuração que conduz à ativação (ou inibição) transcricional e permite conduzir a transmissão de sinais extracelulares em respostas intracelulares,



pela ativação de elementos promotores responsivos e o recrutamento de cofatores (Gobinet *et al.*, 2002).

Além da ação do hormônio, complexos formados por co-ativadores ou co-repressores, causam uma modificação local da estrutura da cromatina e também participam da regulação da expressão gênica (Hart., 2002; Gobinet *et al.*, 2002). A expressão gênica do receptor de androgênios (AR) pode ser regulada em múltiplos níveis por mecanismos de transcrição, pós-transcrição e pós-tradução (Kalio *et al.*, 1996), e com isto alterar os mecanismos de regulação da proliferação celular.

### ***Mecanismo de Ação dos Hormônios Esteróides***

No tecido alvo, a testosterona é convertida em DHT pela ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase, liga-se ao AR, configurando a primeira etapa da ativação do receptor. A ligação do androgênio ao AR, permite que o receptor mude para uma conformação mais compacta, capaz de ligar-se ao DNA, como demonstrado em experiências por proteólise (Kuil e Mulder., 1995). A ligação do androgênio promove a hiperfosforilação do AR por um processo comum nos receptores nucleares e outros fatores de transcrição. Quando inativado, o AR já se encontra num estado fosforilado, mas novos locais são alvejados quando o AR é ativado (Kuiper e Brinkmann., 1995). O papel destas fosforilações permanece incerto. Para mediar o efeito hormonal, o receptor necessita interagir com seqüências específicas curtas do DNA (Roche *et al.*, 1992), chamadas de elementos responsivos ao hormônio (HRE), que estão localizados na região promotora dos genes.

Após a ligação do complexo hormônio-receptor em suas seqüências específicas (ARE), o AR pode recrutar todos os componentes da maquinaria

transcricional, particularmente a RNA polimerase do tipo II (RNAPII). O DNA não está sempre acessível na sua forma descondensada e, neste caso, é necessário recrutar os fatores nucleares transcricionais que interagem com os receptores nucleares. Suas atividades enzimáticas (por exemplo, acetilases) induzem a descompactação local da cromatina, o que permite o acesso da RNAP II e também permite que a maquinaria geral transcricional alcance o promotor do gene alvo (Orphanides e Reinberg., 2002). Estes coreguladores formam uma ponte entre a maquinaria transcricional e os receptores que modulam a transcrição, promovendo a transcrição dos genes alvos hormônio-dependentes (Figura 1).

### ***Aspectos Genéticos da HPB***

Diversos genes têm sido estudados e sugeridos como potencialmente envolvidos no desenvolvimento da HPB, como os polimorfismos dos genes HSD3B1, CYP19, AKR1C3 (Roberts *et al.*, 2005), SRD5A2 (Salam *et al.*, 2005), expressão dos genes p-53, c-myc (Royuela *et al.*, 2000) e polimorfismos CAG e GGC do receptor de androgênio. O estudo das diferentes vias interconectadas no mecanismo de ação hormonal, envolvendo especialmente co-reguladores e co-repressores da ação hormonal que regulam a proliferação e/ou diferenciação celular, podem fornecer dados importantes para o conhecimento da fisiopatologia da HPB. A associação de informações genéticas com o fenótipo clínico dos indivíduos, incluindo dados clínicos, perfil metabólico e nutricional, tem sido utilizados em diversos estudos a fim de gerar novos caminhos no reconhecimento de fatores predisponentes e de

proteção, na prevenção primária e secundária de doenças da próstata dependentes de hormônios sexuais.

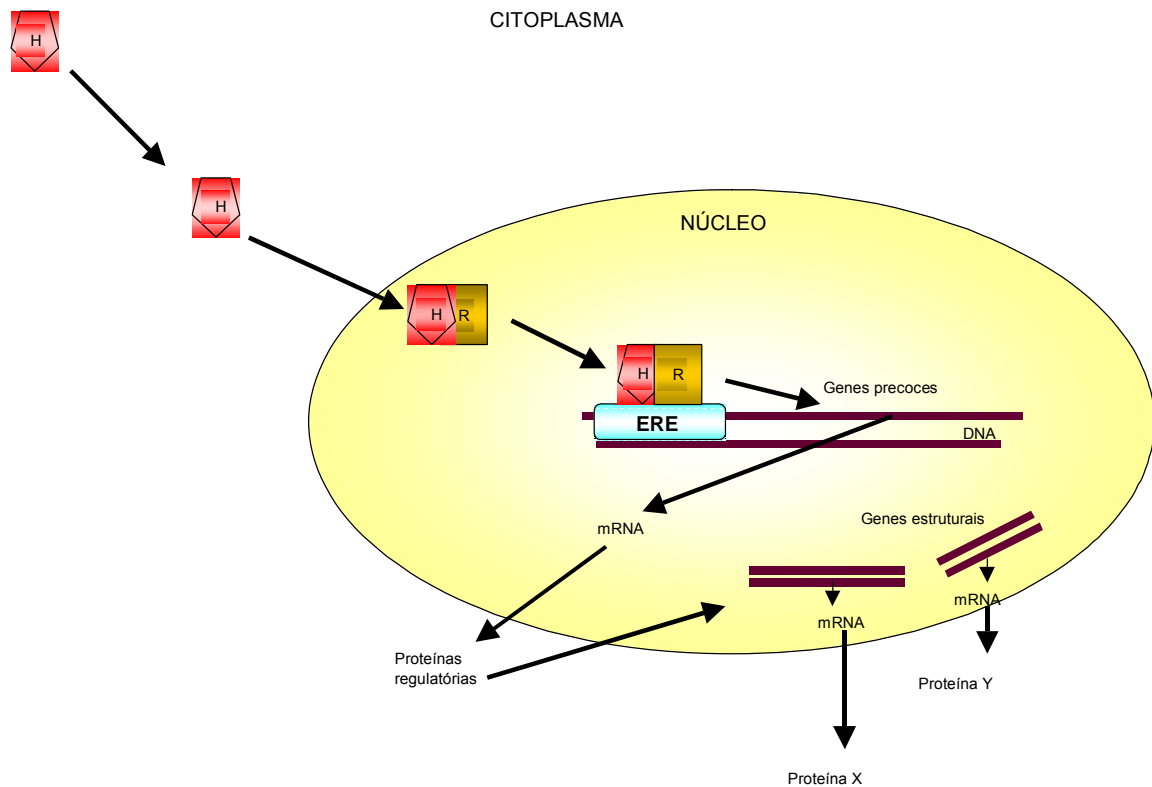


Figura 1 – Mecanismo de ação de hormônios esteróides

O hormônio esteróide (H) difunde-se para dentro da célula ligando-se a receptores específicos (R) no núcleo da célula-alvo. O complexo hormônio-receptor (HR) liga-se a elementos responsivos a hormônios esteróides localizados na fita de DNA (ERE) induzindo a transcrição imediata dos genes precoces. A proteína produzida por estes genes regula a transcrição dos genes estruturais tardios cujos produtos interferem no desenvolvimento celular (proteína X e proteína Y) (Schuchard *et al.*, 1993).

### ***Receptor de Androgênio (AR)***

O gene AR humano está localizado no cromossomo X, na posição q11-12, contém 8 exons (Lubahn *et al.*, 1988) e um tamanho aproximado de 90 kb (Chamberlain *et al.*, 1994), sendo um membro da superfamília dos receptores hormonais nucleares (Zhou *et al.*, 1994). A família dos fatores de transcrição ligante-dependentes são proteínas chave na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo embriogênese, desenvolvimento e homeostasia. A clonagem de cDNAs dos receptores nucleares de glicocorticóide (Hollenberg *et al.*, 1985), estrogênio (Green *et al.*, 1986), mineralocorticóide (Arriza *et al.*, 1987) e progesterona (Misrahi *et al.*, 1987) revelaram uma homologia estrutural em três domínios funcionais; um domínio que interage com o DNA, um domínio que interage com o esteróide e um domínio N-terminal. Claramente separados, os domínios tem sido bem caracterizados (Figura 2). O domínio variável N-terminal (NTD), está implicado na ativação transcricional e pode participar no recrutamento de cofatores. Este domínio contém a região de ativação transcricional AF-1, a qual é essencial para a atividade de transativação do AR, e a região AF-5, a qual possui uma forte atividade constitutiva (Gobinet *et al.*, 2002). O domínio de ligação ao DNA tipo-dedo de zinco (DBD) é altamente conservado e promove a interação com DNA. O domínio de ligação do ligante (LBD), contém uma região de ativação transcricional estritamente dependente do ligante, denominado domínio de função de ativação 2 (AF-2) e funcionalmente interage com fatores intermediários e cofatores nucleares (Berrevoets *et al.*, 1998). Müller *et al.*, (2000), sugeriram uma possível interação

entre NTD e LBD resultando na formação de uma nova superfície que facilitaria a interação com cofatores que interagiriam em receptores esteróides/nucleares (NR).

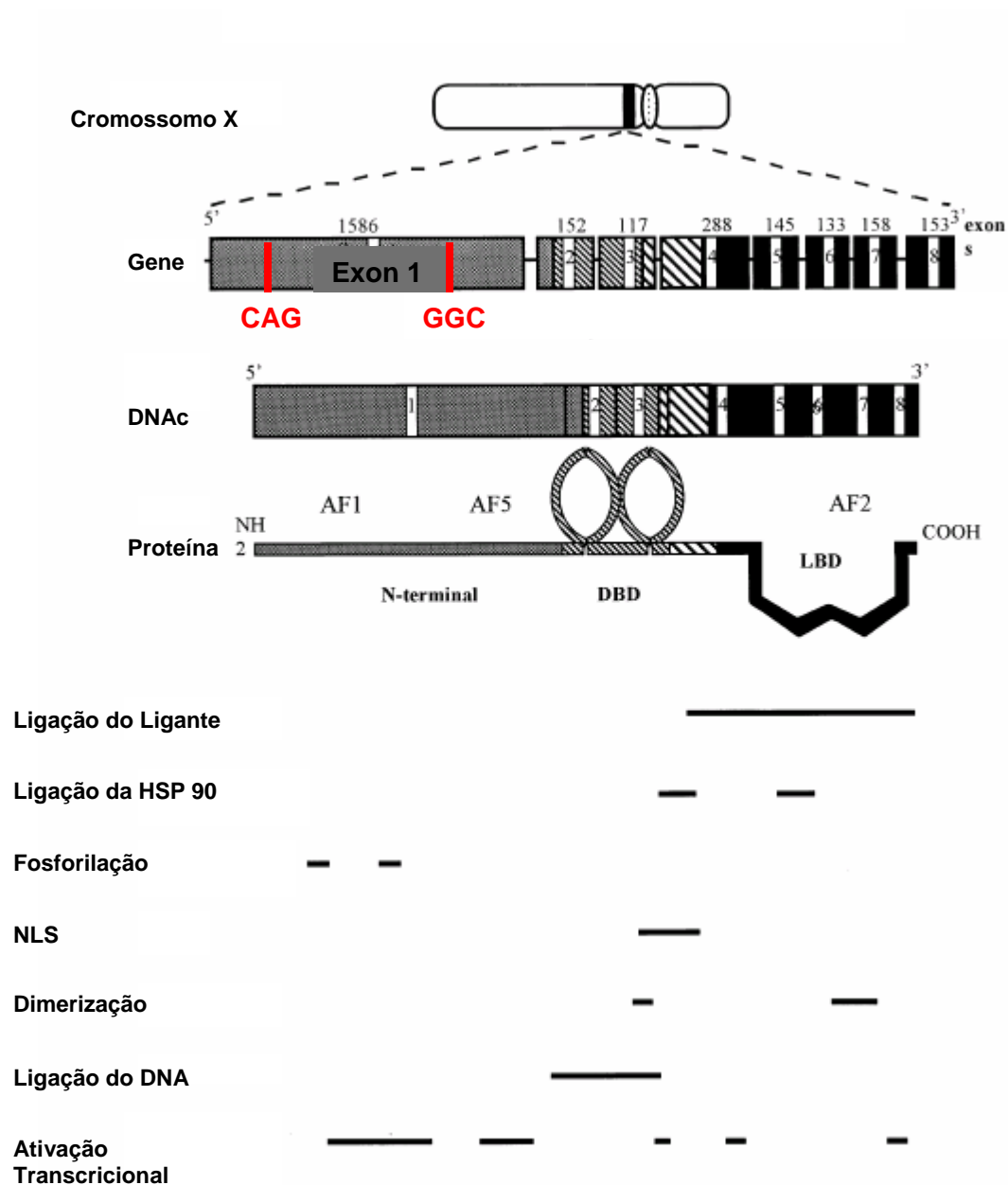


Figura 2: Organização genética e funcional do AR (Gobinet *et al.*, 2002)

### **Polimorfismo CAG**

Polimorfismos são variantes genéticas que ocorrem em pelo menos 1% da população. Variantes polimórficas significam diferenças alélicas no gene e, conseqüentemente, podem levar a modificações na função das proteínas. A análise dos polimorfismos genéticos permite analisar o grau de diversidade genética em uma determinada população (<http://home.comcast.net/~john.kimball1/BiologyPages> acessado em novembro de 2005). Enquanto a maioria das repetições de trinucleotídeos ocorre em seqüências não codificadoras do genoma, portanto sem influência na expressão do gene, aqueles localizados em regiões codificadoras podem influenciar a expressão do gene, modular a estrutura do RNAm e alterar a função das proteínas resultantes (Buchanan *et al.*, 2004)

O gene AR apresenta duas repetições polimórficas; CAG (que codifica para um trato poliglutamínico) e GGC (que codifica um trato poliglicínico). Ambos estão localizados no exon 1, no domínio de transativação NH2-terminal, uma região regulatória do processo de transcrição (Chamberlain *et al.*, 1994). O número de repetições CAG pode variar de 8 a 31 com média em torno de 20 repetições (Edwards *et al.*, 1992).

Quando o número de repetições CAG for de 40 ou mais, é caracterizada uma patologia ligada ao cromossomo X que promove desordens neurodegenerativas conhecida como atrofia muscular espino-bulbar (SMBA), também conhecida como doença de Kennedy (La Spada *et al.*, 1991 e 1992). Além da fraqueza progressiva do músculo devido à perda dos neurônios motores cerebrais e da medula espinhal, os homens com esta desordem apresentam, freqüentemente, sintomas de insensibilidade parcial aos androgênios (ginecomastia e atrofia testicular), indicativos

de um mau funcionamento do AR (Arbizu et al., 1983). Diversos estudos demonstraram que o número de repetições CAG está correlacionado inversamente com o risco de desenvolver câncer de próstata (Giovannucci et al., 1997; Hsing et al., 2000; Stanford et al., 1997; Beilin et al., 2000). Além disso, o comprimento da repetição CAG foi implicado, de forma herdada, com a insensibilidade aos androgênios, como audição prejudicada hereditária, esquizofrenia, hiperplasia prostática benigna e o risco de desenvolvimento de câncer de mama e endométrio (Roberts et al., 2004; Yaron et al., 2001; Rebbeck et al., 1999; Yu et al., 2000; Saleem et al., 2001; Wittekindt et al., 1998; Lesperance et al., 1995).

Estudos realizados *in vitro* mostraram uma correlação negativa entre o número de repetições CAG e a atividade transcricional do receptor de androgênios: o número aumentado de CAG reduz a atividade transcricional do AR enquanto que uma redução até zero induz uma atividade aumentada do AR (Chamberlain et al., 1994; Beilin et al., 2000; Kazemi-Esfarjani et al., 1995; Tut et al., 1997; Irvine et al., 2000). Recentemente, estes dados foram reproduzidos em células prostáticas por Wang et al., (2005). Nesse trabalho, foi sugerido que alterações nas mudanças conformacionais induzidas pelo ligante, aumentam o recrutamento de co-ativadores e isto, pode estar relacionado a hiperatividade transcricional do AR associada com o encurtamento do trato poliglutamínico.

A variabilidade deste polimorfismo pode ser influenciada pelas diferenças étnicas entre as populações. A prevalência de repetições menores do CAG é maior entre os Afro-Americanos e menor entre os Asiáticos, sendo intermediária entre os caucasianos. Em homens saudáveis com descendência africana, a média do número de repetições CAG tem sido descrito entre 18 e 20 repetições (Edwards et al.,

1992; Platz *et al.*, 2000). O mesmo número de repetições foi encontrado em certas subpopulações africanas (Kittles *et al.*, 2001). Em caucasianos saudáveis, a média do número de repetições CAG é de 21-22 (Edwards *et al.*, 1992; Platz *et al.*, 2000) enquanto que em populações asiáticas a média encontrada foi de 22-23 repetições (Wang *et al.*, 2001; Platz *et al.*, 2000; Hsing *et al.*, 2000).

No Brasil, um estudo de prevalência dos polimorfismos em indivíduos sem câncer de próstata verificou uma média de 20,65 repetições do CAG e 22,38 do GGN, não tendo considerado diferenças raciais (Ribeiro *et al.*, 2002). Em outro estudo de caso-controle que avaliou uma amostra da população brasileira, a média do número de repetições CAG no grupo câncer foi de 21,8 e no grupo controle foi de 22,1, não havendo diferença significativa entre as médias. Não foi encontrada associação entre um número menor de repetições CAG (21 ou menos) e risco de câncer de prostático. Foi observada uma tendência de um menor número de repetições CAG na raça negra (Santos *et al.*, 2003).

O efeito da extensão do segundo microsatélite do gene do AR, consistindo das repetições GGN codificando um trato poliglicínico não é claro. No entanto, Platz *et al.*, (2000) sugeriram que 23 repetições pode representar a seqüência codificadora ótima para a conformação e atividade da proteína do AR. Um desvio no número médio de repetições pode representar uma atividade alterada do AR. Os mesmos autores sugeriram que o menor número de repetições CAG e GGC no gene do AR pode estar associado com um risco aumentado de desenvolver HPB, propondo a investigação desta associação em pacientes com HPB. Uma vez que o AR está localizado no cromossomo X existe somente uma cópia do gene, portanto a presença de ambos alelos de alto risco (curtos) poderia resultar no encurtamento do



gene do receptor de androgênios e alterar consideravelmente sua função (Roberts *et al.*, 2004).

Recentemente, tem sido sugerido que o crescimento rápido da HPB é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de próstata (Hammarsten *et al.*, 2002).

A interação entre polimorfismos de alto risco e fatores ambientais também ainda é pouco estudada, tanto na HPB como no câncer de próstata.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Analisar a frequência do polimorfismo CAG do AR em uma amostra da população masculina do Rio Grande do Sul com e sem HPB.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar o número de repetições CAG do receptor de androgênios em uma amostra de indivíduos com Hiperplasia Prostática Benigna e no grupo controle;
2. Investigar uma possível associação entre o número de repetições CAG do receptor de androgênios e a HPB;
3. Avaliar o nível sérico de PSA e testosterona e verificar se estas variáveis estão associadas ao número de repetições CAG do AR.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Delineamento**

Estudo de caso-controle (associação).

### ***Crítérios de inclusão e exclusão:***

#### ***Pacientes***

Grupo HPB - Pacientes entre 45 e 90 anos com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna, com volume prostático medido por ecografia abdominal acima de 30g, toque retal sem suspeita de neoplasia maligna, que não estejam em tratamento com inibidores da 5 $\alpha$ -redutase e que não possuam diagnóstico de neoplasia concomitante, em acompanhamento no ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os pacientes com HPB que participaram deste estudo, já haviam sido submetidos à cirurgia (prostatectomia aberta ou ressecção transuretral) tendo o diagnóstico confirmado pelo exame anatopatológico, com exceção de 2 pacientes que migraram do grupo controle.

Controles – Pacientes provenientes do ambulatório de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e indivíduos voluntários, com idade entre 45 – 80 anos, com dosagem sérica do PSA menor ou igual a 2,0 ng/ml, volume prostático menor que 30g, exame de toque retal normal e sem diagnóstico de outra neoplasia concomitante.

## **Métodos**

### ***População em estudo:***

Pacientes com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna e grupo controle recrutados no período de setembro de 2004 e maio de 2005.

Os indivíduos com diagnóstico de HPB foram recrutados nos turnos de ambulatório do Serviço de Urologia do HCPA, e foram encaminhados a um ambulatório específico para realização desta pesquisa. Os objetivos da pesquisa foram explicados e, após a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1), foi realizada coleta de 5ml de sangue venoso periférico para avaliação dos polimorfismos e 5ml para dosagem sérica de testosterona total. Os dados relacionados à idade, raça, tamanho da próstata, valor do PSA na época do diagnóstico foram registrados em ficha específica (anexo 2).

Os controles foram recrutados dos ambulatórios de Urologia e Medicina Interna e, uma vez verificados os critérios de inclusão e exclusão, também foram encaminhados ao ambulatório específico desta pesquisa. Após explicação dos objetivos da pesquisa e aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 3), foi realizada coleta de sangue venoso periférico para avaliação dos polimorfismos e dosagens hormonais em estudo (5ml cada). Os dados relacionados à identificação e informações da história clínica foram registrados em ficha específica (anexos 4).

### ***Cálculo de tamanho de amostra:***

O tamanho da amostra foi calculado através do programa PEPI 3, utilizando-se dados do estudo de Santos e colaboradores (2003), que avaliou o polimorfismo CAG numa população brasileira. Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90%, diferença entre as médias de 2 repetições e diferenças entre os desvios-padrão entre os grupos = 1 repetição, chegando-se a um N de 49 pacientes por grupo.

## **Análise molecular**

### ***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 HPB. Logo após era realizada a lise de hemácias utilizando 2 volumes de solução para lise de hemácias (NH<sub>4</sub>Cl 114 mM, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 1mM) sendo incubada a solução entre 4 - 8°C por 30 min. A solução era centrifugada por 15 min à 3000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. A etapa de lise de hemácias era repetida mais uma vez. Em seguida, realizava-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 era homogeneizada e incubada a 37°C por aproximadamente

18 horas. Após a incubação, era adicionada à solução 0,72 mL de solução saturada de NaCl (6M). A solução era centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, transferia-se o sobrenadante e acrescentavam-se 2 volumes de etanol absoluto (gelado) para precipitar o DNA. O DNA era retirado e colocado em tubo Eppendorf contendo 0,9 mL de etanol 70% (gelado) e a solução era centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm. Repetia-se essa etapa por mais duas vezes. Após desprezava-se o sobrenadante e o álcool era evaporado no ar ambiente, ficando, somente, o pellet de DNA no Eppendorf. Na etapa final, o pellet era ressuspensionado 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, logo então, armazenado a uma temperatura de 4 – 8°C.

***Reação de PCR para a amplificação das repetições CAG:***

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 50µl. Um µl de DNA genômico foi denaturado a 96°C por 5 minutos na presença de 20 mM de TrisHCl pH 8,4 com 50 mM de KCL e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Após este pré-aquecimento, 1,25 U de Taq DNA polimerase foi adicionada junto com o mesmo tampão Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de primers sense e antisense e 0,2 mM de dNTP mix. As reações de PCR foram realizadas utilizando primers específicos da região polimórfica CAG do AR: sense 5' TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC 3' marcado com corante fluoresceínico FAM e antisense 5' GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT 3'.

As ampliações foram realizadas utilizando termociclador automático (MJ Research, Waltham, MA,USA) nas seguintes condições: desnaturação inicial, 5 minutos a 96°C; desnaturação de 1 min à 94°C a cada ciclo; 3 ciclos com temperatura de anelamento de 61°C; 3 ciclos com temperatura de anelamento de 59°C e 25 ciclos com temperatura de anelamento de 55°C; extensão à 72°C de 20 segundos a cada ciclo e extensão final de 72°C por 7 min. A qualidade dos produtos da PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Figura 3).

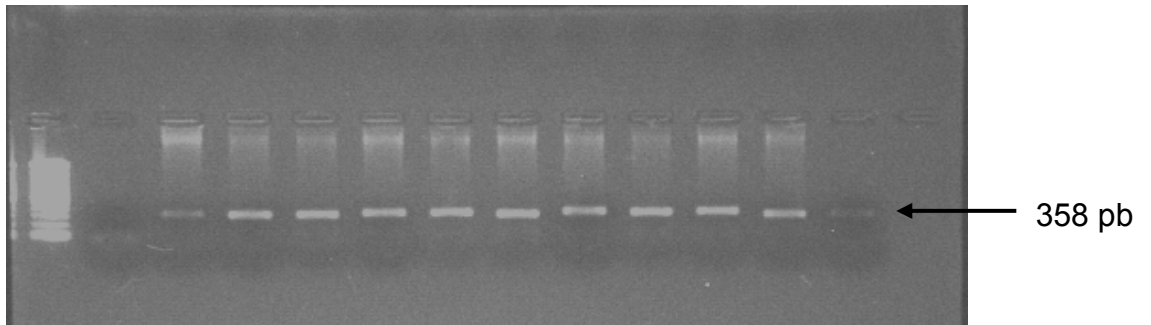


Figura 3 – Amplificação do produto da PCR analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.



### ***Análise dos polimorfismos CAG do receptor de androgênio:***

Para cada amostra, o produto da PCR foi diluído em água Milly-Q, 5 ou 10X, dependendo do grau de amplificação das amostras quando visualizadas em gel agarose (1,5%). Logo após, 1µl do PCR diluído foi misturado com 10µl formamida e 0,3µl de um marcador de peso molecular fluorescente 500HD (ROX) *Size Standard*, Applied Biosystems, Foster City, CA. Após, a solução foi desnaturada à 95°C por 2 minutos, sendo resfriada, logo em seguida, à 0°C por mais dois minutos. Em seguida, as amostras eram retiradas do gelo e transferidas para placa específica, a fim de ser realizada a eletroforese capilar no seqüenciador automático ABI 3100 AVANT. A análise do fragmento amplificado foi realizada pelo *software Genemapper* versão 3.5 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)

### **Análise Bioquímica**

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

### **Análise estatística**

Os dados entre os grupos foram analisados pelo teste *t* de Student. As associações entre os polimorfismos e fatores de risco foram calculadas pelo teste do

qui-quadrado. As variáveis sem distribuição normal foram analisadas pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney ou teste de Kruskal Wallis. O *odds ratio* (OR) foi à medida utilizada para estimar o risco relativo de HPB para o CAG. Foi considerado o nível de significância como  $p < 0,05$ . O processador de dados SPSS-PC foi utilizado para estas análises.

### **Considerações éticas**

Os pacientes e os indivíduos controles foram esclarecidos em relação ao estudo e somente participaram após terem assinado termo de consentimento (Anexos 1 e 3). Não houve implicação do estudo sobre o atendimento prestado aos pacientes no ambulatório. A retirada de uma amostra de sangue venoso não necessitou procedimento especial e envolveu riscos mínimos para os pacientes. Já 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 dos polimorfismos ou dos genes estudados, e nem para que se faça alguma abordagem diagnóstica diferente para as pessoas saudáveis que apresentem diferença no número de tais polimorfismos. A fase de estudo está ainda relacionada a buscar risco associado com o desenvolvimento de HPB; não existem estratégias específicas para preveni-la ou para abordagem especial dos pacientes de acordo com a variabilidade dos polimorfismos ou diferente expressão dos genes estudados.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética do HCPA (registro de aprovação n° 04-243).

### **Locais de realização do projeto**

- Avaliação Clínica: história, exame físico e coleta de sangue foram realizados no Serviço de Urologia do HCPA.
- Avaliação molecular: foi realizada no Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia da UFRGS.
- Exames laboratoriais: Foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas – HCPA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arbizu T, Santamaria J, Gomez JM, Quilez A, Serra JP. A family with adult spinal and bulbar muscular atrophy, X-linked inheritance and associated testicular failure. *J Neurol Sci* 1983;59:371–82.
- Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science* 1987;237:268–75.
- Avances C, Georget V, Terouanne B, Orio F, Cussenot O, Mottet N, Costa P, Sultan C. Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2001;184(1-2):13-24.
- Beilin J, Ball, EM, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol* 2000;25:85–96.
- Berrevoets CA, Doesburg P, Steketee K, Trapman J, Brinkmann AO. Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the aminoterminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor 2). *Mol Endocrinol* 1998;12:1172-83.
- Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, Trapman J. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Ster Biochem and Mol Biol* 1999;69:307-13.
- Brossner C, Petritsch K, Fink K, Auprich M, Madersbacher S, Adlercreutz H, Rehak P, Petritsch P. Phytoestrogen tissue levels in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and their association with prostatic diseases. *Urology* 2004;64(4):707-11.
- Buchanan G, Yang M, Cheong A, Harris JM, Irvine RA, Lambert PF, Moore NL, Raynor M, Neufing PJ, Coetzee GA, Tilley WD. Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Human Molecular Genetics*. 2004;13:1677-1692.
- Campbell B. High rate of prostate symptoms among Ariaal men from Northern Kenya. *Prostate* 2005;62(1):83-90.
- Carson C 3<sup>rd</sup>, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2003;61(4 Suppl 1):2-7.

- Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994;22:3181–86.
- Cude KJ, Dixon SC, Guo Y, Lisella J, Figg WD. The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer. *J Mol Med* 1999;77(5):419-26. Review
- Curkendall SM, Jones JK, Dale G, *et al.*: Incidence of medically detected erectile dysfunction and related diseases before and after Viagra™ (sildenafil citrate) (abstr). *Eur Urol* 2000;37(suppl 2):81.
- Daneshgari F, Crawford ED. Endocrine therapy of advanced carcinoma of the prostate. *Cancer* 1993;71(3 Suppl):1089-97. Review
- Dawam D, Rafindadi AH, Kalayi GD. Benign prostatic hyperplasia and prostate carcinoma in native Africans. *BJU Int* 2000;85(9):1074-7
- Denis L, Morton MS, Griffiths K. Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol* 1999;35(5-6):377-87
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992;12:241–53.
- Geck P, Szelei J, Jimenez J, Sonnenschein C, Soto AM. Early gene expression during androgen-induced inhibition of proliferation of prostatic cancer cells: a new suppressor candidate on chromosome 13, in the BRCA2-Rb1 locus. *J Steroid Biochem and Mol Biol* 1999;68:41-50.
- Geck P, Maffini MV, Szelei J, Sonnenschein C, Soto AM. Androgen-induced proliferative quiescence in prostate cancer cells: The role of AS3 as its mediator. *Medical Sciences* 2000;97(18):10185-190.
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, Talcott J, Hennekens CH, Kantoff PW. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;1;94(7):3320-3. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;22;94(15):8272.
- Gobinet J, Poujol N, Sultan Ch. Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198(1-2):15-24.
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P & Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA; sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 1986;320:134–39.

- Griffiths K, Denis L, Turkes A, Morton MS. Phytoestrogens and diseases of the prostate gland. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998;12(4):625-47.
- Hammarsten J, Hogstedt B. Calculated fast-growing benign prostatic hyperplasia--a risk factor for developing clinical prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol* 2002;36(5):330-8.
- Hart S. Modulation of nuclear receptor dependent transcription. *Biol Res* 2002;35(2):295-303.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Ord AE, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985;318:635-641.
- Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Benichou J, Chang C. Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a populationbased case-control study in China. *Cancer Research* 2000;60:5111-16.
- Irvine RA, Ma H, Yu MC, Ross RK, Stallcup MR, Coetzee GA. Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum Mol Genet* 2000;9:267-74.
- Kallio PJ, PalvinJJ, JannOA. Genetic regulation of androgen action. *The Prostate* 1996;6:45-51.
- Kang D, Andriole GL, Van De Vooren RC, Crawford D, Chia D, Urban DA, Reding D, Huang WY, Hayes RB. Risk behaviours and benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* 2004;93(9):1241-5.
- Kazemi-Esfarjani P, Trifiro, MA, Pinsky L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG) n-expanded neuronopathies. *Hum Mol Genet* 1995;4:523-27.
- Kim HS, Bowen P, Chen L, Duncan C, Ghosh L, Sharifi R, Christov K. Effects of tomato sauce consumption on apoptotic cell death in prostate benign hyperplasia and carcinoma. *Nutr Cancer* 2003;47(1):40-7.
- Kirby RS. The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology* 2000;56:3-6.
- Kittles RA, Young D, Weinrich S, Hudson J, Argyropoulos G, Ukoli F, Adams-Campbell L, Dunston GM. Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: implications for prostate cancer risk. *Human Genetics* 2001;109:253-61.

- Kuil CW, Mulder E. Effects of androgens and antiandrogens on the conformation of the androgen receptor. *Ann New York Acad Sci* 1995;761:351-54.
- Kuiper GG, Brinkmann AO. Phosphotryptic peptide analysis of the human androgen receptor: detection of a hormone-induced phosphopeptide. *Biochemistry* 1995;34:1851-7.
- La Spada AR, Roling DB, Harding AE, Warner CL, Spiegel R, Hausmanowa-Petrusewicz I, Yee WC, Fischbeck KH. Meiotic stability and genotype-phenotype correlation of the trinucleotide repeat in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet* 1992;2:301-4.
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 1991;352:77-9.
- Lagiou P, Wu J, Trichopoulou A, Hsieh CC, Adami HO, Trichopoulos D. Diet and benign prostatic hyperplasia: a study in Greece. *Urology* 1999;54(2):284-90.
- Latil A, Bieche I, Vidaud D, Lidereau R, Berthon P, Cussenot O, Vidaud M. Evaluation of Androgen, Estrogen (Er $\alpha$  and Er $\beta$ ) and Progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res* 2001;61:1919-26.
- Lee C, Kozlowski JM, Grayhack JT. Etiology of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin Am* 1995;22(2):237-46.
- Lesperance MM, Hall JWI, Bess FH, Fukushima K, Jain PK, Ploplis B, San Agustin TB, Skarka H, Smith RJH, Wills M, Wilcox ER. A gene for autosomal dominant nonsyndromic hereditary hearing impairment maps to 4p16.3. *Hum Mol Genet* 1995;4:1967-72.
- Liang T, Liao S. Inhibition of steroid 5 $\alpha$ -reductase by specific aliphatic unsaturated fatty acids. *Biochem J* 1992;285:557-62.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 1988;240:327-30.
- Marrero AR, Leite FPN, Carvalho BA, Peres LM, Kommers TC, Cruz IM, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Da Silva Júnior WA, Bortolini MC. Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *American Journal of Human Biology*. 2005;17(4):496-506.
- McNeal J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin N Am* 1990;17:477-86.
- Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon-Mantel A, Galibert F, Milgrom E. Complete amino acid sequence of the human

- progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;143(2):740-8.
- Moyad MA. Lifestyle changes to prevent BPH: heart healthy = prostate healthy. *Urol Nurs* 2003;23(6):439-41.
- Müller JM, Isele U, Metzger E, Rempel A, Moser M, Pscherer A, Breyer T, Holubarsch C, Buettner R, Schule R. FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *Embo J* 2000;19:359-69.
- Nakano K, Fukabori Y, Itoh N, Lu W, Kan M, McKeehan WL, Yamanaka H. Androgen-stimulated human prostate epithelial growth mediated by stromal-derived fibroblast growth factor-10. *Endocr J* 1999;46(3):405-13.
- Neuhouser ML, Kristal AR, Penson DF. Steroid hormones and hormone-related genetic and lifestyle characteristics as risk factors for benign prostatic hyperplasia: review of epidemiologic literature. *Urology* 2004;64(2):201-11.
- Oesterling JE. Benign Prostatic Hyperplasia: A Review of Its Histogenesis and Natural History. *The Prostate* 1996;6(Suppl):67-73.
- Orphanides G, Reinberg D. A unified theory of gene expression. *Cell* 2002;108:439-51.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SDJ. Color and genomic ancestry in brazilians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(1):177-182.
- Planz B, Wang Q, Kirley SD, Marberger M, McDougal WS. Regulation of keratinocyte growth factor receptor and androgen receptor in epithelial cells of the human prostate. *J Urology* 2001;166(2):678-83.
- Platz EA, Smit E, Curhan GC, *et al*: Prevalence of and racial/ethnic variation in lower urinary tract symptoms and noncancer prostate surgery in U.S. men. *Urology* 2002;59:877–83.
- Platz E A, 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;92:2009–17.
- Rebeck TR, Kantoff PW, Krithivas K, Neuhausen S, Blackwood MA, Godwin AK, Daly MB, Narod SA, Garber JE, Lynch HT, Weber BL, Brown M. Modification of BRCA1-associated breast cancer risk by the polymorphic androgen-receptor CAG repeat. *Am J Hum Genet* 1999;64:1371–7.
- Ribeiro ML, Santos A, Carvalho-Salles AB, Hackel C. Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(2):205-13.



- Roberts RO, Bergstralh EJ, Cunningham JM, Hebring SJ, Thibodeau SN, Lieber MM, Jacobsen SJ. Androgen receptor gene polymorphisms and increased risk of urologic measures of benign prostatic hyperplasia. *Am J Epidemiol* 2004;159(3):269-76.
- Roberts RO, Bergstralh EJ, Farmer SA, Jacobson DJ, Hebring SJ, Cunningham JM, Thibodeau SN, Lieber MM, Jacobsen SJ. Polymorphisms in genes involved in sex hormone metabolism may increase risk of benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 2005. In press
- Roche PJ, Hoare SA, Parker MG. A consensus DNA binding site for the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 1992;6:2229-35.
- Royuela M, de Miguel MP, Ruiz A, Fraile B, Arenas MI, Romo E, Paniagua R. Interferon-gamma and its functional receptors overexpression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: parallelism with c-myc and p53 expression. *Eur Cytokine Netw*. 2000 Mar;11(1):119-27.
- 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.
- Saleem Q, Dash D, Gandhi C, Kishore A, Benegal V, Sherrin T, Mukherjee O, Jain S, Brahmachari SK. Association of CAG repeat loci on chromosome 22 with schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiat* 2001;6:694-700.
- Santos ML, Sarkis AS, Nishimoto IN, Nagai MA. Androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer from a Brazilian population. *Cancer Detect Prev* 2003;27(5):321-6.
- Schuchard, Landers, Sandhu, Spelsberg. Steroid hormone regulation of nuclear proto-oncogenes. *Endocri Rev*, 1993;14(6):659-69.
- Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA, Ostrander EA. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res* 1997;57:1194-8.
- Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3777-82.
- Wang G, Chen G, Wang X, Zhong J, Lu J. The polymorphism of (CAG)<sub>n</sub> repeats within androgen receptor gene among Chinese male population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2001;18(6):456-8.
- Wang L, Hsu CL, Chang C. Androgen receptor corepressors: An overview. *Prostate*. 2005;63(2):117-30. Review

- Weisser H, Krieg M. Fatty acid composition of phospholipids in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1998;36:235–43.
- Wittekindt O, Jauch A, Burgert E, Scharer L, Holtgreve-Grez H, Yvert G, Imbert G, Zimmer J, Hoehe MR, Macher JP, Chiaroni P, van Calker D, Crocq MA, Morris-Rosendahl DJ. The human small conductance calcium-regulated potassium channel gene (hSKCa3) contains two CAG repeats in exon 1, is on chromosome 1q21.3, and shows a possible association with schizophrenia. *Neurogenetics* 1998;1:259–65.
- Yaron M, Levy T, Chetrit A, Levavi H, Sabah G, Schneider D, Halperin R, Ben Rafael Z, Friedman E. The polymorphic CAG repeat in the androgen receptor gene in Jewish Israeli women with endometrial carcinoma. *Cancer* 2001;92:1190–4.
- Yu H, Bharaj B, Vassilikos EJ, Gai M, Diamandis EP. Shorter CAG repeat length in the androgen receptor gene is associated with more aggressive forms of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2000;59:153–61.
- Zhou ZX, Wong CI, Sar M, Wilson EM. The androgen receptor: an overview. *Recent Progress in Hormone Research* 1994;49:249–74.

**ARTIGO**

## **Polimorfismo das repetições CAG do receptor de androgênios e o risco de hiperplasia prostática benigna: Análise de uma população do Sul do Brasil**

Vanderlei Biolchi<sup>1</sup>, Brasil Silva Neto<sup>2</sup>, Walter Koff<sup>2</sup>, Poli Mara Spritzer<sup>1,3</sup>, Ilma Simoni Brum<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Endocrinologia molecular e Neuroendocrinologia, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>2</sup>Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>3</sup>Unidade de Endocrinologia Ginecológica, Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

**Abreviações:** HPB, hiperplasia prostática benigna; AR, receptor de androgênio; DHT, dihidrotestosterona.

### **Resumo:**

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é uma anormalidade proliferativa relacionada com a idade e muito freqüente no período da senescência. A Prevalência da HPB encontra-se em torno de 40 a 50% aos 50 anos e de aproximadamente 80% aos 70 anos. A patogênese da formação tumoral tem sido estreitamente associada à ação dos hormônios esteróides. A ligação do androgênio promove a ativação do receptor de androgênios (AR), recrutamento de cofatores,

promovendo a transcrição de genes alvos hormônio-dependentes. O gene do AR humano está localizado no cromossomo X apresentando regiões polimórficas no exon 1. O polimorfismo CAG é o mais estudado e seu número de repetições está inversamente correlacionado com a atividade transcricional do AR. Este trabalho teve como objetivos analisar o número de repetições CAG do AR em uma amostra da população masculina do Sul do Brasil com e sem HPB e verificar se esse número de repetições está relacionado com o desenvolvimento da HPB. Foram avaliados 44 pacientes com HPB e 52 controles. O número de repetições CAG variou de 16 a 30 no grupo controle e de 16 a 31 no grupo HPB. A média de repetições foi de  $22,27 \pm 3,04$  e  $21,64 \pm 2,89$  respectivamente ( $p=0,30$ ). A testosterona sérica diferiu entre os grupos HPB ( $4,18 \pm 1,34$  ng/dl) e controles ( $4,92 \pm 1,29$  ng/dl), sendo menor no grupo com HPB ( $p=0,009$ ). A correlação entre estas variáveis é de 0,256 ( $p= 0,014$ ). Porém, quando corrigida pela idade, a correlação diminui e perdeu a significância ( $p=0,104$ ). Estes resultados sugerem que não há correlação entre o número de repetições CAG e o risco de HPB na amostra estudada. Os níveis séricos de testosterona parecem não estar associados com o número de repetições CAG. Pacientes com HPB apresentam níveis de testosterona mais baixos que os controles.

**Palavras-Chave:** CAG, Receptor de Androgênios, Polimorfismo, Hiperplasia Prostática Benigna.

## Introdução

A Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) é uma anormalidade proliferativa muito freqüente na espécie humana, relacionada com a idade (Kirby., 2000). A HPB é considerada uma doença progressiva, definida como o crescimento contínuo da próstata, levando a intensificação de sintomas e ao aumento do risco de complicações ao longo do tempo, como a retenção urinária aguda e cirurgia (Carson e Rittmaster., 2003). Estudos mostram que a prevalência da HPB encontra-se em torno de 40 a 50% aos 50 anos e de aproximadamente 80% aos 70 anos de idade (Kirby., 2000; Platz *et al.*, 2002).

A patogênese da formação tumoral tem sido estreitamente associada à ação dos hormônios esteróides (Geck *et al.*, 1999; Geck *et al.*, 2000; Latil *et al.*, 2001). Os efeitos androgênicos são mediados pela testosterona e dihidrotestosterona (DHT) nas células alvo e suas ações têm sido demonstradas na morfogênese, diferenciação, proliferação celular e secreções da glândula prostática. A ligação do androgênio promove a ativação do receptor de androgênios, recrutamento de cofatores, promovendo a transcrição de genes alvos hormônio-dependentes (Avances *et al.*, 2001; Gobinet *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1999; Planz *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

O gene do AR humano está localizado no cromossomo X, na posição q11-q12, o qual contem 8 exons (Lubahn *et al.*, 1988) e um tamanho aproximado de 90 kb (Chamberlain *et al.*, 1994), sendo um membro da superfamília dos receptores hormonais nucleares (Zhou *et al.*, 1994).

O polimorfismo CAG está localizado no exon 1 do AR, no domínio de transativação NH<sub>2</sub>-terminal, uma região regulatória do processo de transcrição (Chamberlain *et al.*, 1994). O número de repetições CAG pode variar de 8 a 31 com média em torno de 20 repetições (Edwards *et al.*, 1992).

Estudos realizados *in vitro* mostraram uma correlação negativa entre o número de repetições CAG e a atividade transcricional do receptor de androgênios: o número aumentado de CAG reduz a atividade transcricional do AR enquanto que uma redução até zero induz uma atividade aumentada do AR (Beilin *et al.*, 2000;

Chamberlain *et al.*, 1994; Irvine *et al.*, 2000; Kazemi-Esfarjani *et al.*, 1995; Tut *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2005).

Este trabalho teve como objetivos analisar a frequência do polimorfismo CAG do AR em uma amostra da população masculina do Sul do Brasil com e sem HPB e verificar se o número de repetições está relacionado com o desenvolvimento da HPB.

## **Materiais e Métodos**

### ***População em estudo:***

Pacientes com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna e grupo controle foram recrutados no Serviço de Urologia do HCPA, no período de setembro de 2004 e maio de 2005.

No grupo HPB foram incluídos pacientes com idade entre 45 e 90 anos com diagnóstico de hiperplasia prostática benigna, com volume prostático medido por ecografia abdominal acima de 30g, toque retal sem suspeita de neoplasia maligna, sem uso de inibidores da 5 $\alpha$ -redutase e que não possuam diagnóstico de neoplasia concomitante. Dos pacientes que participaram deste estudo, 43 já haviam sido submetidos à cirurgia (prostatectomia aberta ou ressecção transuretral) tendo o diagnóstico de HPB confirmado pelo exame anatopatológico. Dois pacientes migraram do grupo controle para o grupo HPB.

O grupo controle foi formado por indivíduos voluntários, com idade entre 45 – 80 anos, com dosagem sérica do PSA menor ou igual a 2,0 ng/ml, volume prostático menor de 30g, exame de toque retal normal e sem diagnóstico de outra neoplasia concomitante.

Todos os pacientes foram esclarecidos sobre o estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do HCPA.

### ***Extração de DNA:***

A análise dos polimorfismos e dosagens hormonais foram realizadas a partir da coleta de sangue venoso periférico (10ml).

A extração de DNA foi realizada a partir do sangue total coletado em tubos com EDTA dos pacientes dos grupos controles e HPB. Logo após era realizada a lise de hemácias utilizando 2 volumes de solução para lise de hemácias (NH<sub>4</sub>Cl 114 mM, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 1mM) sendo incubada a solução entre 4 - 8°C por 30 min. A solução era centrifugada por 15 min à 3000rpm, desprezando-se o sobrenadante. A etapa de lise de hemácia era repetida mais uma vez. Em seguida, realizava-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 era homogeneizada e incubava-se a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após a incubação, era adicionada à solução 0,72 ml de solução saturada de NaCl (6M). A solução era centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Após a centrifugação, transferia-se o sobrenadante e acrescentavam-se 2 volumes de etanol absoluto (gelado) para precipitar o DNA. O DNA era retirado e colocado em tubo Eppendorf contendo 0,9 mL de etanol 70% (gelado) e a solução era centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm. Repetia-se essa etapa por mais duas vezes. Após desprezava-se o sobrenadante e o álcool era evaporado no ar ambiente, ficando, somente, o precipitado de DNA no Eppendorf. Na etapa final, o precipitado era ressuspendido 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 armazenado a uma temperatura de 4 – 8°C.

### ***Reação de PCR para a amplificação das repetições CAG:***

As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 50µl. Um µl de DNA genômico foi desnaturado a 96°C por 5 minutos na presença de 20 mM de TrisHCL pH 8,4 com 50 mM de KCL e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Após a desnaturação inicial, foram adicionados 1,25 U de Taq DNA polimerase, tampão Tris-HCl, 1,5 mM



MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de *primers* sense e antisense e 0,2 mM de dNTP mix. As reações de PCR foram realizadas utilizando *primers* específicos da região polimórfica CAG do RA: sense 5' TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC 3' marcado com corante fluoresceínico FAM e antisense 5' GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT 3'.

As amplificações foram realizadas utilizando termociclador automático (MJ Research, Waltham, MA, USA) nas seguintes condições: desnaturação inicial, 5 minutos a 96°C; desnaturação a 94°C por 1 min cada ciclo; 3 ciclos com temperatura de anelamento de 61°C; 3 ciclos com temperatura de anelamento de 59°C e 25 ciclos com temperatura de anelamento de 55°C; extensão a 72°C por 20 segundos em cada ciclo e extensão final de 72°C por 7 min. A qualidade dos produtos da PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

### ***Análise dos polimorfismos CAG do receptor de androgênio:***

Para cada amostra, o produto da PCR foi diluído em água Milly-Q, 5 ou 10X, dependendo do grau de amplificação das amostras quando visualizadas em gel agarose (1,5%). Logo após, 1µl do PCR diluído foi misturado com 10µl de formamida e 0,3µl de um marcador de peso molecular (500HD (ROX) *Size Standard*, Applied Biosystems, Foster City, CA). Após, a solução foi desnaturada à 95°C por 2 minutos, sendo resfriada, logo em seguida, à 0°C por mais dois minutos. A eletroforese capilar foi realizada no seqüenciador automático ABI 3100 AVANT. Os fragmentos correspondentes às repetições CAG foram analisados pelo *software Genemapper*.

### ***Análise estatística***

Os dados entre os grupos foram analisados pelo teste *t* de Student. As associações entre os polimorfismos e fatores de risco foram calculadas pelo teste do qui-quadrado. As variáveis sem distribuição normal foram analisadas pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney ou teste de Kruskal Wallis. O *odds ratio* (OR) foi à medida

utilizada para estimar o risco relativo de HPB para o CAG. Foi considerado o nível de significância como  $p < 0,05$ . Foi utilizado o processador de dados SPSS-PC.

## Resultados

Foram avaliados 100 pacientes da região metropolitana de Porto Alegre (Sul do Brasil), sendo 50 pacientes para o grupo HPB e 50 pacientes no grupo controle. No grupo controle, 2 pacientes foram adicionados, por não preencherem os critérios de inclusão no grupo HPB. No grupo HPB, 2 pacientes migraram para o grupo controle e 4 pacientes foram excluídos por não retornarem para a realização dos exames complementares. Com isto, 96 pacientes efetivamente participaram do estudo (44 HPB e 52 controles).

A tabela I mostra os principais dados relativos ao perfil clínico da população estudada. A idade do grupo com HPB variou entre 34 a 79 anos. O grupo controle apresentou idades entre 45 e 75 anos. A média de idade entre os dois grupos foi diferente ( $p < 0,001$ ), tendo o grupo hiperplasia apresentado idade mais alta. Houve predominância de pacientes com raça branca (observada pelo examinador), perfazendo 82% do grupo HPB e 77 % do grupo controle, sem diferença estatística entre os grupos (Tabela 1).

Os valores médios de testosterona total foram maiores ( $p = 0,009$ ) no grupo controle ( $4,92 \pm 1,29$  ng/dl) em relação aos casos ( $4,18 \pm 1,34$  ng/dl). A dosagem sérica de PSA total foi significativamente maior ( $p = 0,002$ ) no grupo HPB ( $1,19$  ( $0,69 - 3,23$  ng/ml) em relação ao grupo controle ( $0,67$  ( $0,51 - 1,01$ ) ng/ml), assim como o volume prostático, grupo HPB ( $43,7$  ( $32,4 - 52,6$  cm<sup>3</sup>) e grupo controle ( $16,7$  ( $12,6 - 22,0$  cm<sup>3</sup>) ( $p < 0,001$ ) (tabela 1).

A distribuição de freqüências do número de repetições do polimorfismo CAG nos dois grupos é mostrada na figura 1 e a média do número de repetições CAG é mostrada na figura 2. A variação no número de repetições no grupo HPB foi de 16 a 31 repetições, com a média =  $21,64 \pm 2,89$ . O grupo controle apresentou variação do número de repetições entre 16 a 30, com média =  $22,27 \pm 3,04$ . Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos grupos ( $p = 0,30$ ).

A população em estudo foi dividida em relação ao número de repetições CAG, em diferentes subgrupos. A divisão foi feita entre os percentis 25/75, criando-se os grupos com  $\leq 20$  repetições, 21 a 23 repetições e  $\geq 24$  repetições. A tabela 2 descreve os resultados desta análise. A distribuição entre os subgrupos foi bastante uniforme.

Como visto na Tabela 1, a testosterona sérica diferiu entre os grupos de pacientes e controles, sendo menor no grupo com HPB. A correlação entre estas variáveis é de 0,256 ( $p= 0,009$ ). Porém, quando corrigida pela idade, a correlação diminui e perde a significância ( $p=0,104$ ).

A comparação entre os níveis de testosterona sérica na população estudada e o número de repetições CAG não foi significativa, tanto nas análises comparando estas duas variáveis contínuas, quanto categorizando os grupos pelos pontos de corte do CAG em 20, 21 ou 22 repetições. No entanto, quando analisamos separadamente o grupo HPB, pacientes com o número de repetições  $\leq 20$  apresentam níveis de testosterona sérica significativamente maiores ( $4,89 \text{ ng/dl} \pm 1,74$ ) que pacientes com mais de 20 repetições ( $3,85 \text{ ng/dl} \pm 0,98$ )  $p=0,019$  (Tabela 3). A análise em separado do grupo controle não mostrou diferenças. Sabendo-se que a testosterona sérica é relacionada com a idade, verificamos se esta variável poderia estar interferindo na diferença encontrada. Para isto foi realizada uma análise de correlação parcial controlada pela idade, e obtivemos uma correlação negativa  $r^2= -0,3445$  com  $p= 0,032$ .

Avaliamos o risco relativo dos pacientes com testosterona menor ou igual à média do grupo HPB ( $4,18 \text{ ng/dl} \pm 1,34$ ) ou maior e com até 20 repetições CAG ou mais. O valor do qui-quadrado foi de 0,552 e  $p=0,457$ .

Considerando os valores de testosterona sérica, avaliamos também o risco estimado (OR) para HPB entre os indivíduos com testosterona total menor ou igual a  $4,18 \text{ ng/dl}$  e maior, o risco foi duas vezes maior para os pacientes que têm TT menor ou igual à média [OR=1,90 (IC 1,21 – 2,991)]. O valor de qui-quadrado obtido foi de 8,26  $p=0,004$ .

Os níveis séricos de PSA não apresentaram correlação com o número de repetições CAG ( $r^2=0,063$  e  $p=0,599$ ).

## Discussão

A associação entre o número de repetições CAG e o risco de desenvolvimento de HPB e/ou câncer, ainda são controversos.

O receptor de androgênio é um fator de transativação dependente da ligação de um hormônio esteróide. Essa atividade de transativação regulada pelo androgênio é um fator chave na proliferação e diferenciação de células prostáticas. A variação polimórfica da região regulatória do gene do AR, onde estão localizados os polimorfismos de maior variação (CAG e GGC) pode alterar a atividade transcricional do receptor (Chamberlain *et al.*, 1994; Irvine *et al.*, 2000).

A relação entre o número de repetições CAG e o tamanho da próstata nos homens sem HPB não tem sido reportada consistentemente na literatura. No presente estudo não foi encontrada diferença significativa no número médio de repetições CAG entre o grupo controle e HPB, na amostra da população avaliada. Estes dados corroboram com alguns dados da literatura que também não demonstraram associação entre esse polimorfismo e o desenvolvimento da HPB. Li *et al.*, (2003) analisaram o número de repetições CAG em 38 pacientes suecos e 33 japoneses com HPB em relação a 98 indivíduos Suecos e 43 Japoneses controles, não observando diferença entre os grupos. Similarmente, Bousema *et al.*, (2000) analisando 98 pacientes com HPB e 61 controles de conveniência (pacientes com predominância em câncer de bexiga), não encontraram diferença entre o número médio de repetições CAG entre pacientes controle e HPB. Contudo, o uso de um grupo de conveniência, como o grupo controle nesse estudo, poderia ter predisposto os achados do estudo, pois podem não ser populações representativas para as amostras que estão sendo estudadas. Schatzl *et al.*, (2002) não demonstrou associação nos parâmetros clínicos e endócrinos, quando comparados ao número de repetições CAG do AR em homens com HPB. Em um estudo realizado por Mononem *et al.*, (2002) em 1363 finlandeses, também não foi encontrada diferença entre a média do número de repetições CAG entre pacientes controles e HPB. Em um recente estudo caso-controle, envolvendo o risco de câncer de próstata na população indiana (113 controles, 57 HPB), foi visto que o número médio das repetições CAG não foi significativamente diferente em HPB e em controles

saudáveis; entretanto, os pacientes HPB mostraram uma tendência para um menor número de repetições CAG (Mishra *et al.*, 2005). Por outro lado, Mitsumori *et al.*, (1999) analisando 176 pacientes com HPB e 41 controles, encontrou diferença, estatisticamente significativa, entre o aumento do peso do adenoma e um menor comprimento da repetição CAG, entre os quartiles do adenoma. O comprimento da repetição CAG no quarto quartil era significativamente mais curto do que no primeiro quartil. A análise combinada do baixo número de repetições dos polimorfismos CAG e GGC no gene do AR também foi sugerida estar envolvida no aumento do risco para desenvolver HPB (Roberts *et al.*, 2004).

Estudos sugerem que o número de repetições CAG possa estar relacionado com o grupo étnico. Em populações afro-americanas foi demonstrado um número médio de repetições menor que os de caucasianos (Edwards *et al.*, 1992; Platz *et al.*, 2000), o mesmo achado foi encontrado em certas subpopulações africanas (Edwards *et al.*, 1992; Platz *et al.*, 2000; Kittles *et al.*, 2001), enquanto a população asiática (Platz *et al.*, 2000; Hsing *et al.*, 2000) apresentaria um número médio de repetições maior. Isto poderia explicar, em parte, a distribuição de frequências do câncer de próstata nas diferentes regiões do mundo. Neste estudo, a proporção de indivíduos negros foi pequena e homogeneamente distribuída entre os grupos HPB e controle, por isso, não realizamos análise em separado considerando este fator. O registro da raça (ou cor) feito pelo examinador ou declarado pelo paciente não é suficiente para definir de maneira adequada a ancestralidade do paciente em nossa população. Na população brasileira, a avaliação da raça é particularmente difícil devido a grande heterogeneidade genética encontrada e a superposição de características genéticas entre europeus, africanos e ameríndios.

Um achado surpreendente do nosso estudo foi à diferença nos níveis de testosterona sérica entre o grupo HPB e controle. A correlação entre estas variáveis é de 0,256 ( $p=0,009$ ). Sabendo-se que os níveis de testosterona sérica decaem com a idade e que os pacientes com HPB apresentaram diferença de idade em relação ao grupo controle, realizamos uma análise de correlação entre essas variáveis, controlada pela idade, para eliminar possível interferência do fator idade na análise deste dado. Quando corrigida pela idade, a correlação diminuiu e perdeu a significância ( $p=0,104$ ). A avaliação concomitante de metabólitos da testosterona,

testosterona livre ou SHBG, poderia ter caracterizado de modo mais completo, o status androgênico desta amostra. Isso não possível devido a limitações técnicas.

No entanto, quando analisamos separadamente o grupo HPB, observamos que os pacientes com um número maior que 20 repetições CAG têm testosterona mais baixa e, estas duas variáveis estão correlacionadas mesmo depois de corrigidas pela idade. Este dado poderia sugerir uma possível associação entre testosterona sérica, polimorfismo CAG e HPB, no entanto a análise de risco relativo não confirmou esta hipótese. Por outro lado, quando analisamos o risco relativo dos níveis séricos de testosterona maiores ou menores que a média do grupo HPB, obtivemos um valor de  $\chi^2$  significativo e um risco duas vezes maior para aqueles pacientes que têm testosterona mais baixa. A ação dos androgênios no período da senescência é pouco estudada. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram em um modelo de cultura primária de células epiteliais derivadas de HPB que uma baixa dose de DHT promove a proliferação celular e aumenta a expressão de protooncogenes relacionados à regulação do ciclo celular (Silva *et al.*, 2001; Brum *et al.*, 2003). Outros autores também demonstraram esta ação de baixas doses de androgênios em cultura de linhagens celulares derivadas de câncer de próstata humano (LNCaP) (Sonnenschein *et al.*, 1989; Olea *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1995).

O estudo dos polimorfismos do receptor de androgênios pode trazer importante contribuição para a compreensão da complexa interação gênica envolvida no desenvolvimento da HPB. Assim como a interação de variáveis genéticas metabólicas e nutricionais. Neste trabalho, descrevemos a frequência de repetições do polimorfismo CAG do AR em uma amostra da população do Sul do Brasil. Não encontramos associação entre as repetições CAG e HPB. No entanto, demonstramos que os pacientes com HPB têm níveis de testosterona mais baixos que os controles. Outros estudos são necessários para caracterizar o papel da DHT no desenvolvimento da HPB.

## **Referências Bibliográficas**

- Avances C, Georget V, Terouanne B, Orio F, Cussenot O, Mottet N, Costa P, Sultan C. Human prostatic cell line PNT1A, a useful tool for studying androgen receptor transcriptional activity and its differential subnuclear localization in the presence of androgens and antiandrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2001;184(1-2):13-24.
- Beilin J, Ball, EM, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol* 2000;25:85–96.
- Bousema JT, Bussemakers MJ, van Houwelingen KP, Debruyne FM, Verbeek AL, de La Rosette JJ, Kiemeny LA. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and the androgen receptor gene and the risk of benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 2000;37:234–8.
- Brum IS, Morsch DM, Pozzobon A, Boeri VA, Geib G, Spritzer PM. Androgen-dependent expression of c-jun and c-fos in human non-transformed epithelial prostatic cells: association with cell proliferation. *Horm Res* 2003;60(5):209-14.
- Carson C 3<sup>rd</sup>, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. *Urology* 2003;61(4 Suppl 1):2-7.
- Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 1994;22:3181–86.
- Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 1992;12:241–53.
- Geck P, Szelei J, Jimenez, Sonnenschein C, Soto AM. Early gene expression during androgen-induced inhibition of proliferation of prostatic cancer cells: a new suppressor candidate on chromosome 13, in the BRCA2-Rb1 locus. *J Steroid Biochem and Mol Biol* 1999;68:41-50.
- Geck P, Maffini MV, Szelei J, Sonnenschein C, Soto AM. Androgen-induced proliferative quiescence in prostate cancer cells: The role of AS3 as its mediator. *Medical Sciences* 2000;97(18):10185-190.
- Gobinet J, Poujol N, Sultan Ch. Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198(1-2):15-24.
- Hsing A W, Gao Y T, Wu G, Wang X, Deng J, Chen Y L, Sesterhenn I A, Mostofi F K, Benichou J, Chang C. Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen

- receptor gene and prostate cancer risk: a populationbased case-control study in China. *Cancer Research* 2000;60:5111-16.
- Irvine RA, Ma H, Yu MC, Ross RK, Stallcup MR, Coetzee GA. Inhibition of p160-mediated coactivation with increasing androgen receptor polyglutamine length. *Hum Mol Genet* 2000;9:267-74.
- Kazemi-Esfarjani P, Trifiro, MA, Pinsky L. Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG) n-expanded neuronopathies. *Hum Mol Genet* 1995;4:523-27.
- Kirby RS. The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology* 2000;56:3-6.
- Kittles RA, Young D, Weinrich S, Hudson J, Argyropoulos G, Ukoli F, Adams-Campbell L, Dunston GM. Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: implications for prostate cancer risk. *Human Genetics* 2001;109:253-61.
- Latil A, Bieche I, Vidaud D, Lidereau R, Berthon P, Cussenot O, Vidaud M. Evaluation of Androgen, Estrogen (Er $\alpha$  and Er $\beta$ ) and Progesterone receptor expression in human prostate cancer by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Cancer Res* 2001;61:1919-26.
- Lee C, Sutkowski DM, Sensibar JA, Zelner D, Kim I, Amsel I, Shaw N, Prins GS, Kozlowski JM. Regulation of proliferation and production of prostate-specific antigen in androgen-sensitive prostatic cancer cells, LNCaP, by dihydrotestosterone. *Endocrinology* 1995;136(2):796-803.
- Li C, Gronberg H, Matsuyama H, Weber G, Nordenskjold M, Naito K, Bergh A, Bergerheim U, Damber JE, Larsson C, Ekman P. Difference between Swedish and Japanese men in the association between AR CAG repeats and prostate cancer suggesting a susceptibility-modifying locus overlapping the androgen receptor gene. *Int J Mol Med* 2003;11(4):529-33.
- Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, Willard HF, French FS, Wilson EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 1988;240:327-30.
- Mishra D, Thangaraj K, Mandhani A, Kumar A, Mittal R. Is reduced CAG repeat length in androgen receptor gene associated with risk of prostate cancer in Indian population? *Clin Genet* 2005;68(1):55-60.
- Mitsumori K, Terai A, Oka H, Segawa T, Ogura K, Yoshida O, Ogawa O. Androgen receptor CAG repeat length polymorphism in benign prostatic hyperplasia (BPH): correlation with adenoma growth. *Prostate* 1999;41:253-7.



- Mononen N, Ikonen T, Autio V, Rokman A, Matikainen MP, Tammela TL, Kallioniemi OP, Koivisto PA, Schleutker J. Androgen receptor CAG polymorphism and prostate cancer risk. *Hum Genet* 2002;111:166–71.
- Nakano K, Fukabori Y, Itoh N, Lu W, Kan M, McKeehan WL, Yamanaka H. Androgen-stimulated human prostate epithelial growth mediated by stromal-derived fibroblast growth factor-10. *Endocr J* 1999;46(3):405-13.
- Olea N, Sakabe K, Soto AM, Sonnenschein C. The proliferative effect of “anti-androgens” on the androgen-sensitive human prostate tumor cell line LNCaP. *Endocrinol* 1990;126(3):1457-1463.
- Planz B, Wang Q, Kirley SD, Marberger M, McDougal WS. Regulation of keratinocyte growth factor receptor and androgen receptor in epithelial cells of the human prostate. *J Urology* 2001;166(2):678-83.
- Platz EA, Smit E, Curhan GC, *et al*: Prevalence of and racial/ethnic variation in lower urinary tract symptoms and noncancer prostate surgery in U.S. men. *Urology* 2002;59:877–83.
- 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;92:2009–17.
- Roberts RO, Bergstralh EJ, Cunningham JM, Hebring SJ, Thibodeau SN, Lieber MM, Jacobsen SJ. Androgen receptor gene polymorphisms and increased risk of urologic measures of benign prostatic hyperplasia. *Am J Epidemiol* 2004;159(3):269-76.
- Schatzl G, Madersbacher S, Gsur A, Preyer M, Haidinger G, Haitel A, Vutuc C, Micksche M, Marberger M. Association of polymorphisms within androgen receptor, 5 $\alpha$ -reductase, and PSA genes with prostate volume, clinical parameters, and endocrine status in elderly men. *Prostate* 2002;52:130–8.
- Silva IS, Morsch DM, Urnauer L, Spritzer PM. Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocr Res* 2001;27(1-2):153-69.
- Sonnenschein C, Olea N, Pasanen ME, Soto AM. Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens. *Canc Res* 1989;49:3474-81.
- Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL. Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3777–82.

Wang G, Chen G, Wang X, Zhong J, Lu J. The polymorphism of (CAG)<sub>n</sub> repeats within androgen receptor gene among Chinese male population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2001;18(6):456-8.

Wang L, Hsu CL, Chang C. Androgen receptor corepressors: An overview. *Prostate* 2005;63(2):117-30. Review

Zhou ZX, Wong CI, Sar M, Wilson EM. The androgen receptor: an overview. *Recent Progress in Hormone Research* 1994;49:249-74.

Tabela 1. Principais características da população em estudo (n=96).

	HPB (n=45)	Controles (n=52)	p
Idade (anos)	65,42 ± 8,99	59,31 ± 6,80	<0,001
Raça			
branca	36 (82%)	40 (77%)	NS
negra	7 (16%)	10 (19%)	
Testosterona (ng/dl)	4,18 ± 1,34	4,92 ± 1,29	0,009
PSA (ng/ml)	1,19 (0,69 – 3,23)	0,67 (0,51 – 1,01)	0,002
Volume (cm <sup>3</sup> )	47,7 (32,4 – 52,6)	16,7 (12,6 – 22,0)	<0,001

Os valores são expressos como média ± desvio-padrão para idade e testosterona; mediana e percentil 25/75, para PSA e volume e número de casos para raça. NS (não significativo)

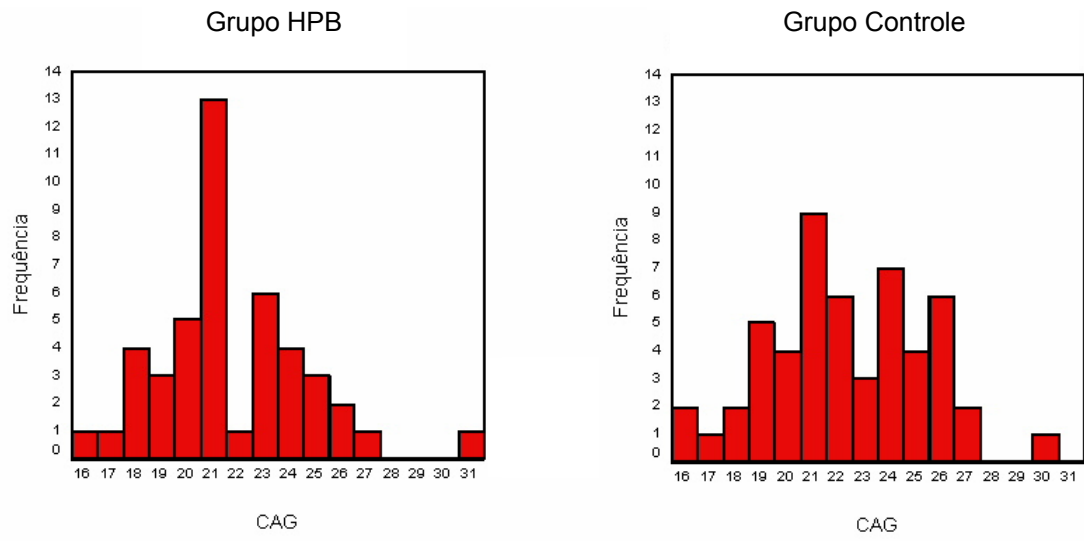


Figura 1. Distribuição da frequência de repetições do CAG nos grupos HPB e controle.

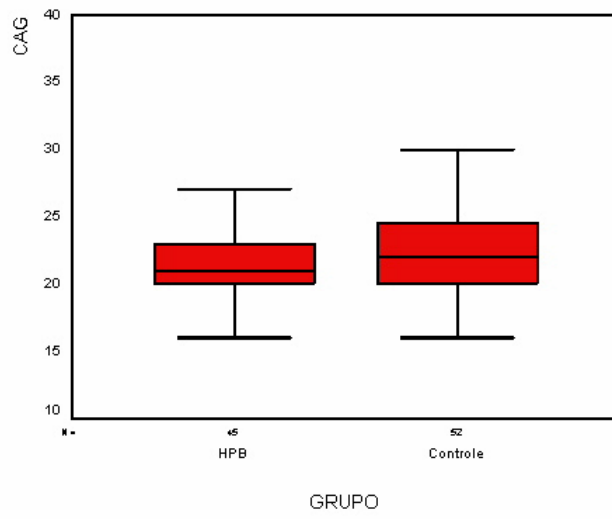


Figura 2. Média do número de repetições CAG de cada grupo.

Tabela 2. Distribuição do número de repetições do CAG categorizadas por tertis.

Repetições CAG	n	HPB	Controles	p*
≤ 20	27	13	14	NS
21-23	38	20	18	NS
≥ 24	32	12	20	NS

Valores expressos em número.

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

Tabela 3. Análise da Testosterona sérica nos casos e controles isoladamente, subdivididos os grupos entre CAG  $\leq$  20 e  $>$ 20.

	Testosterona Total (ng/dL )Média $\pm$ SD	p
Grupo HPB		
CAG $\leq$ 20	4,90 $\pm$ 1,74	0,019
CAG $>$ 20	3,85 $\pm$ 0,98	
Grupo controle		
CAG $\leq$ 20	4,93 $\pm$ 1,62	0,966
CAG $>$ 20	4,91 $\pm$ 1,17	

## CONCLUSÕES

- O presente estudo não mostrou associação entre o número de repetições do polimorfismo CAG do gene do receptor androgênio e o desenvolvimento de HPB na amostra avaliada;
- A média de repetições CAG nesta população assemelha-se à média obtida previamente na população brasileira;
- Pacientes com HPB apresentam níveis de testosterona mais baixos que os controles. No entanto, outros estudos, incluindo a análise de testosterona livre, SHBG, metabólitos da testosterona e DHT, devem ser realizados para melhor caracterizar o perfil hormonal desta população.



## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - HPB

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) e expressão de genes que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver hiperplasia benigna da próstata. Os polimorfismos são alterações que acontecem em um gene e modificam alguma característica da pessoa. Como o Sr. tem/teve hiperplasia prostática, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue– na ocasião de sua entrada no estudo. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em um gene responsável pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata. Caso o Sr. venha a ser encaminhado a cirurgia por hiperplasia prostática, por indicação médica, independente deste trabalho, coletaremos também um fragmento do tecido prostático que será retirado para a análise de outros dois genes que podem estar associados ao desenvolvimento de hiperplasia de próstata e à forma com que ela 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 hiperplasia benigna 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 a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, o Dr. Brasil Silva Neto e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005, 99969044, 33163671), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

\_\_\_\_\_  
Local e data

Paciente ou responsável:

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**ANEXO 2****Ficha HPB**

<b>Nome</b>	
<b>Idade</b>	
<b>Prontuário</b>	
<b>Raça</b>	
<b>Natural.</b>	
<b>Procedenc.</b>	
<b>Hx Familiar</b>	
<b>Toque</b>	
<b>Tamanho prostata</b>	
<b>PSA</b>	
<b>Comorbidades</b>	
<b>Testtotal</b>	
<b>Testlivre</b>	
<b>Colesterol</b>	
<b>Triglicerídeos</b>	
<b>Insulina</b>	
<b>Glicose 1</b>	
<b>Glicose 2</b>	
<b>HDL</b>	
<b>Peso</b>	
<b>Altura</b>	
<b>Cintura</b>	
<b>Quadril</b>	
<b>Pregas cutâneas</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Observações</b>	

## ANEXO 3

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles

Prezado Sr.:

Estamos conduzindo um estudo para identificar características genéticas (polimorfismos) que podem se associar a um risco aumentado de desenvolver hiperplasia benigna da 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 hiperplasia ou câncer de próstata, podendo fazer parte do estudo para a comparação. Caso aceite, realizaremos o registro de suas informações médicas, e uma coleta de sangue venoso – 10 ml de sangue. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de 2 polimorfismos em genes responsáveis pela regulação da ação dos hormônios masculinos na próstata, que podem estar associados ao desenvolvimento da hiperplasia ou 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 a Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, o Dr. Brasil Silva Neto, e o Prof. Dr. Walter José Koff (fone para contato com os pesquisadores 33168286, 99161005, 99969044, 33163671), tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

\_\_\_\_\_  
Local e data

Paciente ou responsável:

\_\_\_\_\_  
Nome

\_\_\_\_\_  
Assinatura

**ANEXO 4****Ficha Controles**

<b>Nome</b>	
<b>Idade</b>	
<b>Prontuário</b>	
<b>Raça</b>	
<b>Natural.</b>	
<b>Procedenc.</b>	
<b>PSA</b>	
<b>Toque</b>	
<b>Hx Familiar</b>	
<b>Comorbidades</b>	
<b>Testtotal</b>	
<b>Testlivre</b>	
<b>Colesterol</b>	
<b>Triglicérideos</b>	
<b>HDL</b>	
<b>Insulina</b>	
<b>Glicose 1</b>	
<b>Glicose 2</b>	
<b>Peso</b>	
<b>Altura</b>	
<b>Cintura</b>	
<b>Quadril</b>	
<b>Pregas cutâneas</b>	
<b>IMC</b>	
<b>Observações</b>	