



# PUCRS

FACULDADE DE MEDICINA  
DOUTORADO EM CLÍNICA MÉDICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GERIATRIA

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DAS ENZIMAS  
SUPERÓXIDO DISMUTASE MITOCONDRIAL DEPENDENTE DE MANGANÊS  
(MnSOD OU SOD2) E CITOCROMO P450C17 $\alpha$  (CYP17) COM A NEOPLASIA  
MALIGNA DA PRÓSTATA**

TESE DE DOUTORADO

**GUSTAVO PEREIRA DE SÁ**

Porto Alegre, março de 2003.

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**

Av. Ipiranga, 6681 - Caixa Postal 1429  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
[www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)  
CEP 90619-900 Porto Alegre - RS  
Brasil

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
DOUTORADO EM CLÍNICA MÉDICA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GERIATRIA**

**ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DAS ENZIMAS  
SUPERÓXIDO DISMUTASE MITOCONDRIAL DEPENDENTE DE MANGANÊS  
(MnSOD OU SOD2) E CITOCROMO P450C17 $\alpha$  (CYP17) COM A NEOPLASIA  
MALIGNA DA PRÓSTATA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Doutorado em Clínica Médica, área de concentração em Geriatria para a obtenção do título de Doutor.

**GUSTAVO PEREIRA DE SÁ**

Orientadora: Profa. Dra Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Porto Alegre

Março de 2003

*Dedico esta tese às duas pessoas mais importantes em minha vida, das quais meu convívio foi ceifado por longos meses de dedicação acadêmica na busca de mais esta realização profissional:*

*A **Deborah**, minha esposa, companheira em todos os momentos, mãe exemplar e mestre na arte de me fazer crescer.*

*A **Eduardo**, nosso filho que, pelo simples fato de existir, me faz mais forte e com vontade de lutar.*

*Amo vocês!*

## **AGRADEÇO**

À Profa. Dra. Ivana B. Mânica da Cruz, minha orientadora, pelos ensinamentos e tempo dispendido para a concretização deste trabalho.

À equipe do laboratório de biologia molecular do Instituto de Geriatria da PUCRS, em particular, às biólogas Margô E. Canto, Graziela Oliveira e Maristela Tauffer e ao acadêmico Jorge G. do Valle, pelo auxílio na coleta de dados e trabalhos no laboratório.

Ao Instituto de Geriatria e Gerontologia da PUCRS.

Ao Serviço de Urologia do Hospital São Lucas da PUCRS, particularmente, aos Profs. Henrique Sarmiento Barata e Aloysio Floriano de Toledo.

Aos funcionários do curso de pós-graduação em medicina, em especial, à Sônia Mantovani, pelo apoio no decorrer deste curso.

Aos pacientes voluntários, que, de maneira desinteressada, auxiliam-nos no progresso da ciência, sem os quais nada disso seria possível.

Aos meus familiares, em especial à minha esposa Deborah, pelo auxílio na revisão desta tese.

Aos meus pais, pilares fundamentais em minha educação, estimuladores de meu estudo na medicina e do meu crescimento científico.

Obrigado a todos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
1.1 O AUMENTO DA POPULAÇÃO IDOSA.....	17
1.2 O CÂNCER DE PRÓSTATA .....	20
1.2.1 Epidemiologia.....	20
1.2.2 Carcinogênese.....	27
1.2.3 Fatores de risco.....	30
1.2.4 Diagnóstico.....	40
1.2.5 Tratamento.....	43
1.3 POLIMORFISMO GENÉTICO .....	47
1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, DANO OXIDATIVO, NEOPLASIA PROSTÁTICA E ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE MANGANÊS- DEPENDENTE (MNSOD OU SOD2).....	49
1.5 ANDROGÊNIOS, NEOPLASIA PROSTÁTICA E ENZIMA CITOCROMO P450C17 $\alpha$ (CYP17).....	56

<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>63</b>
2.1	GERAIS.....	63
2.2	ESPECÍFICOS .....	63
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>64</b>
3.1	DELINEAMENTO .....	64
3.2	PERÍODO DO ESTUDO.....	64
3.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA .....	64
3.4	ANÁLISE CLÍNICA .....	67
3.5	ANÁLISE LABORATORIAL.....	67
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	71
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>84</b>
5.1	FREQÜÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DAS ENZIMAS SOD2 E CYP 17 EM UMA POPULAÇÃO ALEATÓRIA.....	86
5.2	ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA SOD2 E NEOPLASIA PROSTÁTICA.....	88
5.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CYP 17 E NEOPLASIA PROSTÁTICA .....	96
5.4	INTERAÇÃO GENÉTICA ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES SOD2 E CYP17 E SUA ASSOCIAÇÃO COM NEOPLASIA PROSTÁTICA.....	100
	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>105</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>108</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>131</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia prostática no Brasil por 100.000 indivíduos, estimadas para o ano de 2002, segundo a unidade da federação .....24
- Figura 2 - Relação entre ingestão de gordura e mortalidade por neoplasia prostática .....35
- Figura 3 - Representação esquemática das rotas, pelas quais as ROS levam à carcinogênese .....53
- Figura 4 - Representação esquemática simplificada da produção de hormônios androgênicos a partir da molécula de Colesterol.....60
- Figura 5 - Esquema da visualização, em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio, dos fragmentos do gene da enzima MnSOD digeridos pela endonuclease de restrição Hae III, gerando os três genótipos possíveis .....69
- Figura 6 - Esquema representativo da visualização em gel de agarose 4%, dos fragmentos do gene da enzima CYP17 digeridos pela endonuclease HhaI, gerando os três genótipos possíveis .....70
- Figura 7 - Comparação nos níveis de agressividade tumoral, pelo escore de Gleason, entre indivíduos afetados por câncer de próstata com dois alelos A e pelo menos um alelo B do polimorfismo da SOD2.....75
- Figura 8 - Comparação nos níveis de agressividade tumoral, pelo escore de Gleason, entre indivíduos afetados por câncer de próstata com diferentes genótipos do polimorfismo da SOD2 .....76



Figura 9 - Comparação nos níveis de agressividade tumoral, pelo escore de Gleason, entre indivíduos afetados por câncer de próstata com diferentes genótipos do polimorfismo do CYP17 .....	78
Figura 10 - Comparação nos níveis de agressividade tumoral, pelo escore de Gleason, entre indivíduos afetados por câncer de próstata com dois alelos A1 e pelo menos um alelo A2 do polimorfismo da CYP17 .....	78
Figura 11 - Frequências genótípicas dos polimorfismos SOD2 e CYP17 na amostra investigada (população aleatória de Gravataí) .....	80
Figura 12 - Distribuição das frequências das combinações genótípicas dos polimorfismos da SOD2/CYP17 em indivíduos afetados e não afetados por câncer de próstata. ....	81
Figura 13 - Frequência da combinação dos genótipos SOD2/CYP17 AA/A1A2 e AB/A1A2 em indivíduos com e sem câncer de próstata .....	82
Figura 14 - Frequência da combinação dos genótipos SOD2/CYP17 (BB/A1A1 e AB/A1A1) em indivíduos com e sem câncer de próstata.....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos da SOD2 e CYP17 em uma amostra geral da população com idade maior ou igual a 50 anos.....	72
Tabela 2 - Comparação entre as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos da SOD2 em indivíduos afetados e não afetados por câncer de próstata.....	74
Tabela 3 - Comparação entre as frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos da CYP17 em indivíduos afetados e não afetados por câncer de próstata.....	76
Tabela 4 - Regressão logística da associação entre os polimorfismos da SOD2 e CYP17 com câncer de próstata.....	79

## RESUMO

**Objetivos:** A neoplasia de próstata é um câncer muito freqüente no Brasil, especialmente na região sul e particularmente no Rio Grande do Sul. Estudos sugerem uma provável origem multigênica desta neoplasia. Polimorfismos da SOD2 e CYP17 têm sido associados com neoplasias. Analisou-se a associação entre o polimorfismo destes genes, de maneira isolada e em interação, com câncer de próstata. Objetivou-se também a descrição das freqüências alélicas e genotípicas em uma população aleatória do sul do Brasil.

**Materiais e Métodos:** Foi analisado um total de 270 indivíduos, divididos em três grupos distintos, sendo 169 da população aleatória, 54 indivíduos com neoplasia prostática e 47 controles em um estudo de caso-controle. Foram avaliados quanto a polimorfismos da SOD2 e CYP17 e sua relação com neoplasia prostática.

**Resultados:** Quanto à análise da SOD2, o grupo de afetados apresentou uma freqüência 7,2 vezes maior de genótipos AA ( $\chi^2=5,378$ ,  $p=0,04$ ). O alelo B foi mais freqüente entre controles ( $\chi^2=5,86$ ,  $p=0,03$ ). Na análise da CYP17 foi demonstrada associação significativa entre alelo A2 e neoplasia de próstata ( $\chi^2=6,37$ ,  $p=0,01$ ), com razão de chance de 3,16 (1,27-7,87). Grupo controle apresentou genótipo A1A1 mais freqüente ( $\chi^2=6,30$ ,  $p=0,04$ ). Interações genotípicas do tipo AA/A1A2 e AB/A1A2 foram mais freqüentes no grupo de afetados ( $\chi^2=6,43$ ,  $p=0,01$ ), com razão de chance de 3,03 (1,26-7,28).

**Conclusão:** Os resultados demonstraram haver associação entre polimorfismos dos genes da SOD2 e CYP17 e neoplasia prostática, sendo o genótipo AA da SOD2 e o alelo A2 da CYP17 de risco para tal. Tais polimorfismos podem representar futuros marcadores de fatores de risco genéticos a serem utilizados em políticas preventivas.

## ABSTRACT

**Purpose:** Prostate cancer is a very common neoplasm in the south of Brazil. Studies have pointed to a possible multigenic origin on this cancer. Polymorphisms of SOD2 and CYP17 have been associated to neoplasms. Was analyzed the association of the polymorphism of these genes, alone and in interaction, with prostate carcinoma. That was made a description on allelic and genotypic frequencies of a random population in south of Brazil.

**Materials and Methods:** Two hundred and seventy individuals were analyzed, divided in 3 groups, 169 from a random population, 54 with prostate cancer and 47 controls, it was a case-control study. Were analyzed polymorphisms of SOD2 and CYP17 genes on these groups and its association with prostate cancer.

**Results:** On the analysis of SOD2 polymorphism, the prostate cancer group presented with the AA genotype 7,2 times more frequent ( $\chi^2=5,378$ ,  $p=0,04$ ). The B allele was more common among controls ( $\chi^2=5,86$ ,  $p=0,03$ ). On the CYP17 analysis was found association between the A2 allele and prostate neoplasm ( $\chi^2=6,37$ ,  $p=0,01$ ), odd ratio of 3,16(1,27-7,87). Control group presented the A1A1 genotype more frequently ( $\chi^2=6,30$ ,  $p=0,04$ ). Genotypic interactions like AA/A1A2 e AB/A1A2 were more common among the affected group ( $\chi^2=6,43$ ,  $p=0,01$ ), odd ratio of 3,03 (1,26-7,28).

**Conclusions:** The results display an association between polymorphisms on SOD2 and CYP17 genes and prostate cancer, being the AA genotype of SOD2 and A2 allele of CYP17 of risk for this neoplasm. These polymorphisms might represent future genetic risk factors and may be used for preventive measures.

## INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida é uma realidade, tanto nos países desenvolvidos, quanto nos em desenvolvimento. Esse fato gera uma maior probabilidade para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas; entre elas, as neoplasias, como a prostática.

A neoplasia prostática vem, com o passar do tempo, tornando-se mais prevalente, tendo aumentado de forma significativa nos últimos anos, preocupando a ciência médica e a sociedade de um modo geral. Até o início da década de noventa, a neoplasia prostática representava o terceiro tumor mais freqüente no sexo masculino, excetuando-se os tumores de pele não-melanoma, sendo menos incidente que as neoplasias de pulmão e cólon. A partir dessa época, os tumores da próstata ultrapassaram em números essas duas neoplasias e passaram a ser o câncer mais prevalente no sexo masculino, representando, hoje, 40% dos tumores no sexo masculino e a segunda causa de morte por neoplasias neste grupo.

Consideráveis progressos têm sido feitos no intuito de se definir os eventos moleculares que contribuem para a transformação de uma célula epitelial prostática

normal em uma célula neoplásica metastática androgênio-independente. Só recentemente investigadores começaram a identificar oncogenes e genes supressores envolvidos na carcinogênese prostática, assim como o papel do dano oxidativo desencadeado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) e a relação da neoplasia prostática com hormônios androgênicos.

Muito tem se estudado sobre os fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia, sendo que alguns já foram bem definidos: idade, história familiar e etnia, todos fatores não passíveis de intervenção em nível de prevenção primária.

O perfil oxidativo relaciona-se com a produção de ROS, que pode estar associada ao aumento de mutações que ocorrem no DNA celular e com a expressão de enzimas antioxidantes protetoras dos efeitos causados pelos radicais livres. Desse modo, o perfil oxidativo (ou dano oxidativo) tem sido muito citado como provável fator de risco, associado ao câncer de próstata.

Enzimas antioxidantes, que defendem o organismo do dano oxidativo, são determinadas geneticamente. Uma associação entre a variação genética destas enzimas e neoplasias tem sido feita; sendo assim, é possível que haja uma relação entre o polimorfismo dos genes reguladores dessas enzimas e, particularmente, o gene regulador da enzima Superóxido Dismutase Mitocondrial, dependente de Manganês (MnSOD ou SOD2), e neoplasia prostática. Apesar da ocorrência de variações genéticas na estrutura da enzima, que podem representar mudanças na sua forma ou função, a expressão das enzimas antioxidantes é fortemente regulada por fatores ambientais.

Alguns estudos têm identificado uma relação entre o polimorfismo da SOD2 e sua menor capacidade antioxidante de neutralizar o radical superóxido, o que potencialmente levaria a um maior dano oxidativo nas mitocôndrias celulares.

Hormônios androgênicos incluem-se entre os fatores intrinsecamente associados à neoplasia prostática, cuja relação já há longo tempo é estudada. Observações do início do século passado mostraram que eunucos apresentavam próstatas pequenas e não desenvolviam câncer nesse órgão. A partir dessas verificações, a castração cirúrgica passou a ser o principal tratamento para a neoplasia prostática.

Porém, os mecanismos pelos quais tais hormônios influenciam na carcinogênese e na progressão tumoral ainda não são completamente compreendidos nos dias de hoje, quase um século após tais observações. Vários autores têm descrito como um possível mecanismo de carcinogênese o dano oxidativo decorrente da ação dos hormônios androgênicos. Tais hormônios também são, em parte, regulados geneticamente, o que nos faz crer que alterações polimórficas em tais genes possam ter influência no desenvolvimento da neoplasia prostática. E mais: como um dos mecanismos propostos para tal desenvolvimento é o dano oxidativo ao DNA celular influenciado por estes hormônios, uma relação de potencialização poderia ocorrer dependente da combinação de variações genéticas (polimorfismos sinérgicos).

No tangente aos possíveis polimorfismos sinérgicos, tomando-se como base genes associados ao metabolismo de antioxidantes e de androgênicos, pode-se supor que uma produção defectiva de SOD2, devido a alterações genéticas, restringindo a sua capacidade antioxidante, poderia agregar-se a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), proporcionada por alterações nos

genes reguladores da produção de hormônios androgênicos. Essa interação sinérgica, por acarretar maior dano oxidativo, poderia estar associada ao desenvolvimento do câncer prostático, por dano ao DNA celular.

Sob tal contexto, esta tese teve como objetivo analisar as questões supracitadas, na tentativa de auxiliar no melhor entendimento dos mecanismos associados à neoplasia prostática. Adicionalmente, o estudo tem como perspectiva contribuir para um maior conhecimento da carcinogênese prostática, assim como direcionar tais achados para possíveis formas futuras de prevenção primária e tratamento destes neoplasmas.



## **1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 O AUMENTO DA POPULAÇÃO IDOSA**

O fenômeno do aumento da expectativa de vida é algo que ocorre em quase todo o mundo, o que não é diferente no Brasil, já que estatísticas nacionais (1) apontam para uma tendência semelhante, em especial, na região sul. Estima-se que, no ano de 2025, a população brasileira será a sexta maior do mundo em número de idosos, com mais de trinta milhões de pessoas acima de 60 anos (2), uma vez que ocorreu um aumento de mais de 100% na população idosa nos últimos vinte anos (3).

Com base nos números do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas para população masculina, a qual é de especial interesse para o presente estudo (4), pode-se verificar claramente a evolução no número de idosos, maiores de 60 anos, no país, principalmente nos estados do sul. No ano de 1980, havia 3.422.127 de homens com mais de 60 anos de idade no Brasil, representando 5,78% desta população. Já no ano de 2000, este número subiu para 6.533.784, sendo responsável por uma parcela de 7,81% da população masculina nacional, o que

representou um aumento real de 35,12% na população idosa masculina em um período de 20 anos. Se analisarmos os dados referentes à região sul de nossa federação, este crescimento é ainda de maior monta. Em 1980, eram 541.162 homens com idade igual ou superior a 60 anos nesta região, representando uma parcela de 5,67% deste grupo de indivíduos. Vinte anos mais tarde, em 2000, o número praticamente dobrou, chegando a 1.029.514, o que representava uma parcela de 8,29% da população masculina residente na região sul e um crescimento real de 46,20%. Assim, pode-se dizer que o Rio Grande do Sul é particularmente um estado de idosos, visto que, no último recenseamento em 2000, apurou-se uma parcela de 9,09% da população masculina residente com idade igual ou superior a 60 anos (4).

É natural que, com o aumento da parcela idosa da população, as doenças crônico-degenerativas, também denominadas não transmissíveis, passem a representar a principal *causa mortis* desses indivíduos, uma vez que, na atualidade, existe um grande controle sobre as doenças infectocontagiosas (3).

No Brasil, desde a década de 40, a incidência de doenças crônico-degenerativas vem aumentando (5). Dentre essas, as patologias cardiovasculares representam a principal causa de óbitos (4), seguidas pelas neoplasias, cuja prevalência vem crescendo proporcionalmente (5,6), em virtude do maior controle das doenças cardiovasculares (7).

Evidências científicas têm demonstrado que as doenças crônico-degenerativas são multifatoriais e dependentes, tanto de fatores genéticos, quanto ambientais (8,9).

A população em geral, com o passar do tempo de vida, incorre no crescente aumento de neoplasias (8,9), o que é bem marcado no caso do câncer de próstata, pois trata-se de uma patologia que, na imensa maioria das vezes, acomete idosos, tendo em vista que extremamente rara antes dos 50 anos de idade (10).

A neoplasia prostática é um tipo de câncer predominantemente de indivíduos idosos, já que em mais de 75% dos diagnósticos o paciente apresenta-se com mais de 65 anos (13). Exemplo ilustrativo desse fato é apresentado por Demers e colaboradores (11), demonstrando que a incidência norte-americana é de 21 casos por 100.000 homens brancos com menos de 65 anos, enquanto que a mesma sobe para 819 em 100.000 homens brancos americanos acima de 65 anos. Ao contrário, a probabilidade de um homem desenvolver câncer de próstata, com menos de 40 anos, é da ordem de um em 10.000 homens. Quando esse indivíduo chegar a uma idade superior a 60 anos, esse risco aumenta vertiginosamente para 1 em cada 8 homens (12).

A despeito de uma maior incidência de neoplasia prostática em idosos, dados americanos mostram que a incidência desse neoplasma em homens entre 50 e 59 anos vem crescendo. Quando dados da década de 70 são observados, percebe-se que a incidência aumentou de 35/100.000, em 1973, para 70/100.000, em 1989, elevando-se ainda mais no período de 1989 a 1992, com taxa média de 105/100.000. Importante também é observar que, ao contrário do grupo com mais de 60 anos (que será discutido posteriormente), nos Estados Unidos, na faixa etária de 50 a 59 anos, não houve um decréscimo de incidência a partir de 1992 (16).

## 1.2 O CÂNCER DE PRÓSTATA

### 1.2.1 Epidemiologia

Como comentado anteriormente, a neoplasia prostática é uma das mais incidentes em termos mundiais, principalmente na parte ocidental (17,16).

O câncer prostático é o quarto neoplasma maligno mais comum no mundo, com incidência e mortalidade que variam marcadamente entre os diferentes países (13).

No Brasil, para o ano de 2002, o Instituto Nacional do Câncer, do Ministério da Saúde (INCA), estimou 337.535 novos casos e 122.600 óbitos por câncer em geral. Para o sexo masculino, são esperados 165.895 casos novos e 66.060 óbitos por essa patologia, sendo que 25.600 novos casos de câncer de próstata e 7.870 óbitos por este tipo de neoplasia (19).

As maiores taxas de incidência de neoplasia, no país, para o sexo masculino, em estimativas do INCA para 2002, foram de: 36,57/100.000 para câncer de pele não-melanoma, seguido de 29,76/100.000 para neoplasia prostática e 17,45/100.000 para neoplasia de pulmão.

Estima-se para o ano de 2002 que - utilizando-se, em homens, uma série histórica disponível (4) de taxas de mortalidade por câncer consolidadas em âmbito nacional, por localização primária - a neoplasia pulmonar será a primeira causa de morte por câncer no Brasil, com uma taxa de 12,99/100.000, seguida pela neoplasia prostática com uma taxa de 9,14/100.000 (19). Essas altas taxas de incidência e mortalidade do câncer de próstata representam um sério problema de saúde pública no Brasil.

A incidência e taxa de mortalidade do câncer prostático variam sobremaneira nas diversas regiões geográficas do globo. Países escandinavos apresentam uma alta taxa de incidência de neoplasia prostática, quando comparados com países do sul europeu. A mortalidade do câncer de próstata é, por exemplo, o dobro, quando se comparam taxas da Noruega e Espanha (24/100.000 *versus* 13/100.000) (20). Essa diferença torna-se mais marcada quando são analisados os dados de incidência de câncer de próstata em países asiáticos, principalmente Japão e China. Esses países possuem taxas das mais baixas, em termos mundiais, de incidência e mortalidade por neoplasia prostática (13). O Japão apresentou uma mortalidade por câncer de próstata, entre os anos de 1992-95, de 4/100.000 (20).

Ao tomar-se como base a incidência de câncer de próstata em afro-americanos residentes nos Estados Unidos, uma das mais altas no mundo, e comparando-as com a incidência em países asiáticos, tais diferenças tornam-se abissais. No início dos anos 90, até o ano de 1993, a incidência de neoplasia prostática em afro-americanos chegou a ser de 250/100.000 (13), enquanto que, no mesmo período, essa taxa foi de 0,8/100.000 em Shangai, na China (21). Estima-se que, na Jamaica, a incidência de neoplasia prostática seja da ordem de 305/100.000 (22).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, em uma estimativa feita para o ano de 2002, a incidência dessa neoplasia foi da ordem de 29,76/100.000, quando foram diagnosticados mais de 25.000 novos casos, com uma taxa bruta de mortalidade de 9,14/100.000, tendo ocorrido ao redor de 8.000 mortes por esse tipo de câncer (19).

As causas para tais diferenças de incidência e mortalidade entre nações no mundo não são totalmente conhecidas, e os fatores que influenciam as taxas são bastante complexos.

Embora as razões postuladas para explicar essas discrepâncias não sejam completamente conhecidas, existem dois importantes fatores que influenciam em tais diferenças, os quais são a genética e o meio ambiente (13).

Estudos epidemiológicos indicam que homens de etnia africana possuem uma incidência maior de câncer de próstata, quando moram na América, em relação a outras etnias. Embora seja possível que fatores ambientais também contribuam para tal desfecho, é mais provável que esta etnia possua uma maior predisposição genética ao desenvolvimento dessa neoplasia. A referida hipótese é reforçada quando são analisados dados de incidência dessa patologia na Nigéria, que são semelhantes à encontrada entre afroamericanos que residem nos Estados Unidos (23). Estes dados, neste caso, mostram um importante fator etnogenético na incidência do câncer prostático. Da mesma maneira, pode-se observar que os indivíduos de etnia asiática, residentes nos Estados Unidos, possuem uma incidência menor de neoplasia prostática, quando comparados aos afroamericanos ou mesmo aos caucasianos, embora possuam incidência maior que os asiáticos residentes em seus países de origem (13). Tal observação sugere a ocorrência de interações genético-ambientais.

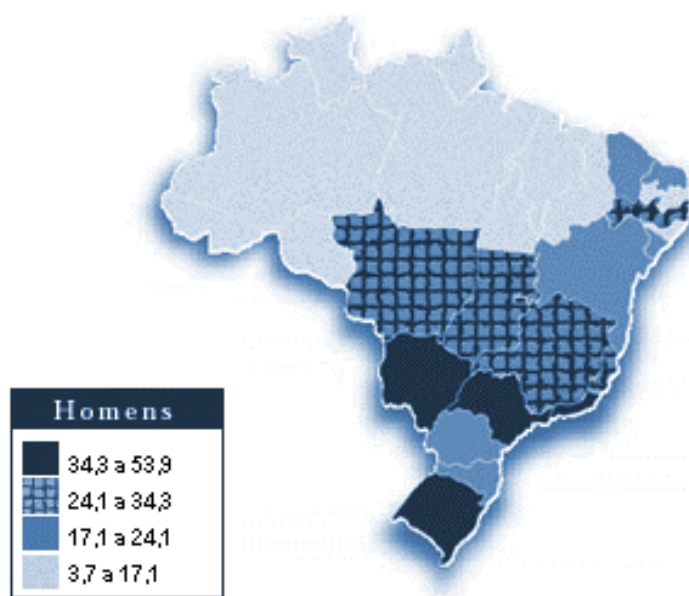
Fatores ambientais representam, da mesma maneira, um grande impacto sobre a incidência e mortalidade deste neoplasma. Tal conclusão pode ser bem expressa quando a incidência de câncer de próstata em homens asiáticos é analisada, principalmente chineses e japoneses que migram para os Estados Unidos.

Japoneses e chineses que residem nos Estados Unidos tem uma incidência aumentada quando comparados aos seus pares residentes na Ásia (24). A incidência de câncer de próstata em Japoneses e Chineses morando em seus países natais, quando comparados a descendentes de primeira linha, morando na área de São Francisco, na Califórnia, modifica-se sobremaneira. Os que residem na cidade americana chegam a apresentar uma incidência de 3 a 7 vezes maior em relação aos residentes no Japão (25). Da mesma maneira, a incidência de neoplasia prostática aumentou no Japão com a ocidentalização da dieta (20).

Assim, pode-se observar que os fatores genéticos e ambientais são determinantes na incidência e mortalidade do câncer prostático, não somente de um modo isolado, mas também sinergicamente de um modo protetor, ou aumentando os riscos do desenvolvimento deste neoplasma, como discute-se em outro tópico.

Da mesma maneira que a distribuição geográfica da neoplasia prostática é diversa ao redor do mundo, no Brasil, país de proporções continentais, este padrão de distribuição também ocorre. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (19), em uma estimativa para o ano de 2002, pôde-se observar uma grande diferença, tanto de incidência, quanto de mortalidade por câncer de próstata nos diversos estados da Federação. Tomando-se como exemplo o estado do Rio de Janeiro, que desponta como o estado com a maior incidência estimada para 2002, com uma taxa bruta de 53,81/100.000, e comparando-se ao estado do Amapá, com as menores taxas estimadas de incidência de neoplasia prostática com 4,04/100.000, pôde-se observar um aumento de mais de 13 vezes nas taxas de incidência desta neoplasia em dois estados de um mesmo país. A taxa bruta

nacional de incidência de neoplasia prostática projetada para o ano de 2002 foi de 29,76/100.000 (19).



**Figura 1 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasia prostática no Brasil por 100.000 indivíduos, estimadas para o ano de 2002, segundo a unidade da federação**

Fonte: Instituto Nacional do Câncer-Ministério da Saúde (<http://www.inca.gov.br>) (19)

Quanto às taxas de mortalidade por câncer de próstata, pôde-se observar também uma grande diferença. O Rio Grande do Sul é o estado de maior mortalidade por neoplasma maligno da próstata, com uma taxa bruta de mortalidade, estimada para 2002, de 15,26/100.000. Este dado estatístico, quando comparado com a taxa bruta de mortalidade do estado do Maranhão, que é de 2,41/100.000, fornece uma dimensão das variações epidemiológicas dessa neoplasia no país, dependente da região geográfica (4,19). Se apenas as capitais estaduais forem observadas, esta discrepância é ainda mais evidente. Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, é a capital brasileira onde mais se morre por câncer de próstata (19), com



uma taxa bruta de óbitos estimada de 20,57/100.000 no ano de 2002. Comparando-se esta taxa, com Palmas, no Tocantins, estimada em 2,76/100.000, observa-se, de maneira ainda mais marcante, essas diferenças.

A análise destes dados sugere que existam, dentro do País, taxas de mortalidade comparáveis às maiores e menores do mundo. Com base em dados estatísticos anteriormente descritos (4,19), a taxa de mortalidade em Porto Alegre é comparável à taxa de mortalidade norueguesa, uma das mais altas no mundo (24/100.000 entre os anos de 1998-1999). Da mesma maneira, ao serem comparados dados de taxa de mortalidade no estado do Maranhão (2,41/100.000), observa-se que a mesma é mais reduzida que a taxa de mortalidade japonesa, uma das menores em termos mundiais (4/100.000 entre os anos de 1992-1995).

A incidência da neoplasia prostática tem aumentado sobremaneira nos últimos anos, principalmente após a introdução da dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA), como marcador bioquímico associado ao câncer de próstata, no início da década de 90 (26).

Segundo dados americanos do *National Cancer Institute* (27), a incidência do câncer de próstata cresceu gradualmente de 1973 até o final da década de 80, quando este aumento tornou-se mais pronunciado. Entre 1986 e 1992, quando se obteve a maior taxa de incidência ajustada por idade em homens brancos, houve um aumento de 108%; ou seja, de 86 para 179 casos novos por 100.000 homens ao ano. A taxa, ajustada por idade, de incidência de neoplasia prostática para homens negros, atingiu o seu pico no ano de 1993, tendo havido um aumento de 102%, quando comparada às taxas de 1986; isto é, um aumento de 124 para 250 novos casos por 100.000 homens ao ano. Após este período de pico, houve um declínio de

incidência em ambos os grupos étnicos. As razões para estas mudanças de padrão não são totalmente claras. Embora o pico mais recente, na primeira metade da década de 90, muito provavelmente se deva ao rastreamento da neoplasia prostática com o uso disseminado do PSA, o aumento observado antes da era do PSA parece refletir, pelo menos em parte, mudanças na prevalência de fatores de risco para o desenvolvimento de tal neoplasia na população (27).

A mortalidade do câncer prostático, nos Estados Unidos, também aumentou nas últimas décadas (27). Entre homens brancos, a mortalidade aumentou de 20,3/100.000 em 1973, chegando a um pico de 24/100.000 em 1991, decrescendo, após, a 22,9/100.000 em 1995, o que representou um decréscimo de 7,3% entre 1991 e 95. Entre os negros, esta mortalidade, que era de 39,5/100.000 em 1973, subiu, chegando a 56,2/100.000, em 1993, e declinando para 53,5/100.000 em 1995. Apesar da baixa da taxa de mortalidade a partir de 1992, o número absoluto de óbitos diminuiu pela primeira vez somente em 1995 (27), o que talvez tenha sido consequência de um maior número de diagnósticos precoces e casos curáveis dessa neoplasia.

No Brasil, a taxa de mortalidade, entre os anos de 1979 e 1999, aumentou de 3,73/100.000 para 8,93/100.000, o que equivale a uma variação percentual relativa de 139%. Sendo que, para o ano de 2002, as expectativas são de que esta taxa seja de 9,14/100.000, segundo estimativas do INCA. Este aumento da mortalidade de aproximadamente 140%, observado entre 1979 e 1999, reflete, pelo menos parcialmente, o envelhecimento da população brasileira (19).

O aumento da incidência de casos diagnosticados, nos países em que séries temporais precisas existem, pode estar refletindo um aumento de detecção de casos

assintomáticos, resultante do uso cada vez mais disseminado do teste do PSA como estratégia de prevenção secundária para a neoplasia prostática. Por sua vez, o aumento concomitante da mortalidade sugere que a maior incidência não pode ser explicada somente por um viés de detecção de casos subclínicos.

Com um aumento do uso do PSA, é de se esperar que uma parcela maior de casos em estágios precoces seja diagnosticada, fazendo com que aumente a possibilidade de cura, o que diminui a mortalidade, visto que casos em estágios avançados não são, até o momento, passíveis de cura. Tal observação reforça a idéia de que o aumento na incidência de tal neoplasia não se deu unicamente devido ao maior número de diagnósticos em função do uso corrente da dosagem do PSA.

### **1.2.2 Carcinogênese**

A gênese do câncer, ou seja, os eventos que levam uma célula normal, e - no caso da neoplasia prostática - uma célula epitelial prostática normal a se transformar em uma célula neoplásica metastática, não são totalmente conhecidos.

O processo de carcinogênese, em geral, se dá de maneira lenta, podendo levar vários anos para que uma célula neoplásica prolifere e dê origem a um tumor clinicamente ativo (19). Nesse processo de transformação celular, vários estágios são transpostos até a formação tumoral.

O primeiro é o estágio de iniciação, onde as células sofrem os efeitos dos agentes carcinógenos, os quais provocam mutações em alguns de seus genes, transformando-as em células geneticamente modificadas. Em um segundo estágio, o estágio de promoção, as células geneticamente modificadas, ou também chamadas iniciadas, sofrem ação dos denominados oncopromotores (agentes cancerígenos). A

célula iniciada, então, é transformada em célula neoplásica, de forma lenta e gradual. Em um terceiro estágio, o de progressão, tais células neoplásicas multiplicam-se desordenadamente. É quando surgem as manifestações do câncer clinicamente ativo (19).

O modelo de evolução clonal da carcinogênese, descrito por Peter Nowell em 1976, resume tais eventos carcinógenos (28). A neoplasia inicia-se quando, através de uma modificação genética específica, uma única célula adquire uma vantagem seletiva sobre seus pares. Essa célula, então, multiplica-se e cria um clone de células anormais, processo esse que é repetido várias vezes, gerando cada vez clones mais agressivos. Várias mutações e seleções clonais asseguram tumores cada vez mais anormais (não-diferenciados) e agressivos, levando ao desenvolvimento tumoral (28,29).

O modelo de Nowell possui três elementos principais em relação à neoplasia: ela é um processo evolucionário, clonal e uma patologia genética (28).

As células tumorais apresentam algumas características próprias: elas dividem-se mais rapidamente, os níveis de apoptose (morte celular) estão diminuídos, podem reproduzir-se em um número infinito de vezes, possuem a capacidade de invadir tecidos e metastatizar e, em casos de neoplasia, têm a capacidade de induzir angiogênese (29).

A questão do câncer ser uma patologia genética tornou-se o centro das pesquisas sobre carcinogênese (29).

Análises genéticas freqüentemente demonstram que as mutações em certos genes são essenciais para o desenvolvimento tumoral (29), e as que levam à

carcinogênese costumam afetar os genes que controlam a reprodução (ciclo celular) ou a morte celular (apoptose) (30).

Os genes envolvidos na carcinogênese podem ser divididos em duas categorias distintas, conforme exposto acima. Tais genes são: os oncogenes, ou genes promotores, que controlam a proliferação celular, e os genes supressores de tumor, os quais inibem as reações metabólicas que podem levar ao câncer (29,30).

Mutações que promovem uma hiperexpressão de oncogenes criam formas celulares excessivamente ativas, causando uma hiperproliferação celular. No caso dos oncogenes, um só alelo mutante pode afetar o fenótipo da célula, diferentemente dos genes supressores de tumor, onde ambos os alelos precisam ser mutados para que o comportamento da célula mude (30).

Desta forma, a carcinogênese é dependente, geneticamente, de um desequilíbrio entre as funções dos oncogenes e genes supressores tumorais; ou seja, por um excesso de proliferação celular, no caso de uma hiperexpressão de oncogenes, ou por uma falta de controle da apoptose celular, representada por uma expressão gênica diminuída dos genes supressores de tumor (30).

Para uma célula se transformar completamente de uma célula normal a uma de fenótipo maligno, uma série de mudanças genéticas ocorre, resultando na ativação de proto-oncogenes, transformando-os em oncogenes, e na inativação de genes supressores tumorais (31).

Geralmente mais de um gene deve ser afetado para que o câncer ocorra. Estas mudanças devem ocorrer em uma mesma célula, sendo que a carcinogênese é tipicamente dependente de uma seqüência específica de mutações (32).

O número de mutações necessárias para causar uma neoplasia é variável e é dependente do tipo de tumor (32).

Como visto, a carcinogênese não está completamente desvendada. Embora muito se saiba sobre esse processo, os caminhos percorridos por uma célula normal até sua transformação neoplásica são ainda, em alguns pontos, obscuros.

### **1.2.3 Fatores de risco**

Embora as causas específicas da gênese da neoplasia prostática, assim como de sua progressão não sejam, ainda, totalmente conhecidas, muitas evidências mostram que, tanto fatores genéticos, quanto ambientais apresentam um papel determinante neste quadro, como foi anteriormente comentado (13).

O estudo dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer prostático tem sido um grande enfoque de pesquisas nos últimos anos, visando a uma prevenção primária desses tumores, já que os fatores de risco bem definidos, como idade, histórico familiar e etnia não são passíveis de intervenção que objetive tal tipo de prevenção (15,33).

Conforme discutido anteriormente, com idade mais avançada, o indivíduo incorre em um maior risco de desenvolvimento e mortalidade por neoplasia prostática (13,14,18,19,25).

A hereditariedade é também um fator de risco de extrema relevância, de tal sorte que indivíduos com um membro da família, em primeiro grau, que tenha sido acometido por câncer de próstata têm o dobro de risco de desenvolver essa neoplasia, quando comparado com outro indivíduo sem histórico familiar dessa

patologia. Da mesma maneira, tais indivíduos tendem a desenvolver a doença em idades mais precoces (34,35).

Homens com dois ou três familiares em primeiro grau afetados pela neoplasia têm um risco 5 a 11 vezes maior de desenvolver a doença. Quanto mais jovem for o familiar acometido, aparentemente maior o risco (34,35).

Estudos dos padrões das famílias afetadas por neoplasia prostática (36) sugerem que tal fato deve-se mais provavelmente por raros alelos autossômico-dominantes herdados. No caso, os resultados obtidos mostram que os portadores de tais alelos mutantes apresentaram um risco acumulado de 88% de desenvolvimento de neoplasia prostática, enquanto que, em não portadores, esse risco foi de somente 5%. Os autores estimaram que somente 9% dos cânceres prostáticos seriam transmitidos dessa forma. Porém, podem responder a até 43% das neoplasias em homens diagnosticados com menos de 55 anos (36).

Apesar da relativa baixa frequência de cânceres de próstata desencadeados por fatores genéticos herdados, a genética também pode contribuir para a gênese dessa doença, via poligenes.

Poligenes são genes comuns, múltiplos e de baixa penetrância que têm sido crescentemente associados a diversos tipos de patologias, entre as quais as neoplasias, inclusive a prostática (34,35,36).

Como já foi dito, indivíduos de etnia afroamericana têm uma maior incidência de neoplasia prostática, quando comparados aos seus pares caucasianos (14,15,23). Da mesma maneira, indivíduos de etnias asiáticas apresentam índices menores desta neoplasia. Tal fato demonstra que o fator étnico também é preponderante

entre os fatores de risco, embora mudanças ambientais possam modificar sobremaneira tais perfis de incidência. O fator genético poderia ser explicado pela presença de variantes genéticas, polimorfismos genéticos, os quais influenciariam rotas metabólicas associadas à etiologia do câncer de próstata (14,15,25,29).

Os fatores de risco até agora expostos - e que são até o momento os mais aceitos e estudados - não são passíveis de manipulação para fins de prevenção primária do câncer prostático. Em virtude disso, diversos estudos têm sido feitos no intuito de serem identificados fatores de risco manipuláveis para tal prevenção. Um exemplo ilustrativo é o maior espaço dado a tal questão na última edição, datada de 2002, do livro mais consultado na urologia mundial (13). Ao se comparar à sua edição anterior, lançada há quatro anos (37), verifica-se uma grande mudança na discussão deste tema.

Uma das associações mais estudadas na atualidade é a interação entre câncer de próstata e dieta, um fator de risco passível de intervenção. Estima-se que entre 30 a 50% dos neoplasmas malignos humanos podem estar relacionados a fatores dietéticos (38).

Assim como em diversas neoplasias, estudos em populações de imigrantes sugerem que fatores ambientais desempenham um importante papel no desenvolvimento da neoplasia prostática clinicamente ativa. Imigrantes japoneses e poloneses, nos Estados Unidos, têm uma maior incidência de câncer de próstata, quando comparados a seus familiares que permanecem em seus países de origem (39,40,24).



Evidências crescentes mostram que a dieta é um importante fator para o controle ou desenvolvimento da neoplasia prostática clinicamente ativa (17,38,41,42,43,44). Tais dados, com estudos futuros, podem vir a influenciar dramaticamente a abordagem, quanto à prevenção tumoral, progressão e tratamento (38).

Abordagens nutricionais para prevenção e terapia do câncer têm sido consideradas. Talvez em nenhuma outra neoplasia o potencial desta intervenção nutricional tenha mais valor que no câncer prostático, principalmente em virtude do paradoxo entre câncer prostático latente e clinicamente evidente (45).

A distribuição da neoplasia prostática latente, ao contrário da clinicamente evidente, ou ativa, é muito semelhante nas diversas regiões geográficas do mundo (46). Esse dado sugere que outros fatores sejam gatilhos que transformem a neoplasia de latente em clinicamente ativa.

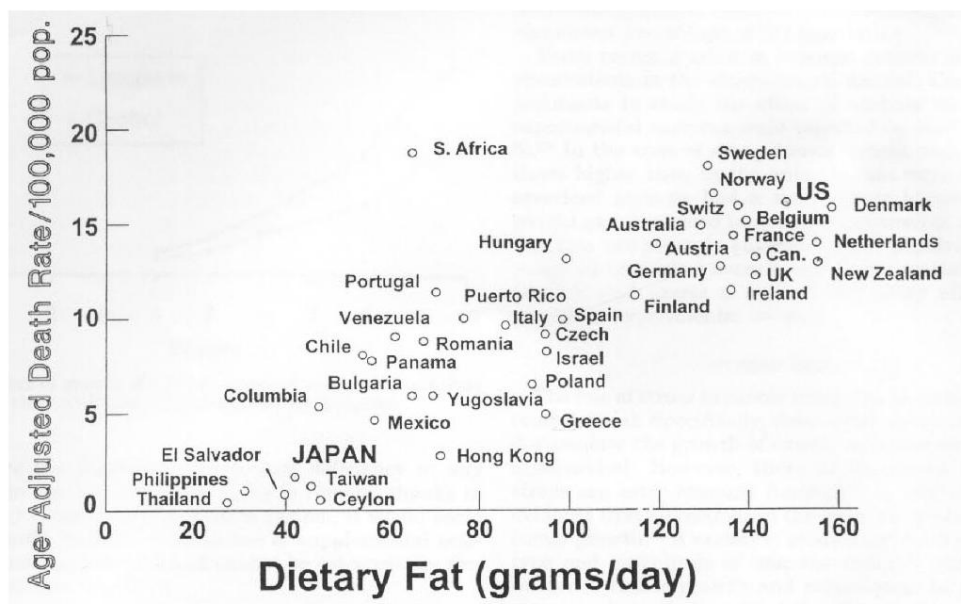
Dados mostram que aproximadamente um terço dos homens com mais de 30 anos apresentam câncer prostático microscópico, ou latente, em autópsias, o que é um número extremamente alto quando consideradas as taxas de mortalidade por essa neoplasia (47). Obviamente, um terço dos homens não morre de câncer prostático, e a discrepância marcada entre neoplasia prostática microscópica focal e clinicamente evidente é o centro de qualquer discussão sobre o manejo desta neoplasia.

Evidências bastante contundentes sugerem que fatores ambientais estão envolvidos na modificação de neoplasia latente para clinicamente ativa, sendo talvez, a mais importante delas a nutrição (45).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado uma forte associação entre ingestão de gordura na dieta e neoplasia prostática. Ou seja, quanto maior a ingestão de gordura na dieta, principalmente gordura saturada de origem animal, representada em grande parcela pela carne vermelha, maior a incidência e a mortalidade por câncer de próstata (48,49,50,51,52).

Embora esta associação tenha sido demonstrada em diversos estudos, alguns com um número muito significativo de indivíduos e um seguimento longo, como é o caso do estudo apresentado por Giovannucci e colaboradores da Universidade de Harvard, com uma amostra de mais de 47.000 homens que foi seguida por mais de quatro anos, a associação entre gordura na dieta e neoplasia prostática não ficou totalmente clara, já que outros estudos falharam em demonstrar tal associação (53,54,55,56,57).

Já na década de 70, Carroll e colaboradores apresentaram dados, comparando a ingestão de gordura na dieta e a mortalidade por neoplasia prostática em diversos países. Tais dados mostraram uma tendência à maior mortalidade por câncer de próstata em países com uma ingestão superior de gordura, conforme representado na figura 2 (58).



**Figura 2 - Relação entre ingestão de gordura e mortalidade por neoplasia prostática**

Fonte: Carroll e Khor (58)

Vários são os mecanismos pelos quais a gordura poderia aumentar a incidência e mortalidade do câncer prostático, sendo as três teorias mais aceitas as de que: 1) uma dieta com maior quantidade de gordura animal, saturada, altera os níveis de androgênios circulantes, dos quais, como se sabe, a neoplasia prostática é muito dependente; 2) a gordura pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumentando a peroxidação lipídica e, conseqüentemente, causando um maior dano ao DNA celular, tanto nuclear, quanto mitocondrial, predispondo à carcinogênese prostática e 3) metabólitos pró-inflamatórios das gorduras, tais como o ácido aracdônico e outros, são candidatos à estimulação de células prostáticas cancerosas (13,38,50,52,59).

Embora seja conhecida de longa data a relação entre hormônios androgênicos e neoplasia prostática, o que será alvo de revisão mais detalhada em outra sessão desta tese, tal relação não é, até o momento, completamente compreendida.

Existem fortes evidências de que a ingestão de gordura altera os níveis de androgênios (60,61).

Em um estudo de 1979, Hill e colaboradores demonstraram que homens que ingeriam uma menor quantidade de gordura em sua dieta apresentavam uma menor taxa de testosterona sérica e urinária (60). Da mesma maneira, outros estudos mostraram que os níveis de testosterona aumentam com uma dieta rica em gorduras (44,61).

Em relação à primeira hipótese, de que a ingestão de gorduras estaria associada à gênese do câncer de próstata, existe uma série de estudos realizados nos últimos anos (60,62,63,64,65,66,67). Isso faz com que o dano oxidativo a biomoléculas seja um dos mais importantes focos das pesquisas atuais em carcinogênese (67). Tal relação será abordada de forma mais extensa em seção própria neste trabalho.

O dano oxidativo é representado pelo desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a proteção contra as mesmas, o que pode ocorrer em todas as biomoléculas, tais como lipídios, proteínas e DNA. As modificações ocorridas no DNA pelo dano oxidativo realizado pelas ROS podem gerar mutações, assim como alterar a função de genes resultando em carcinogênese (67,68).

Diversos estudos têm demonstrado que uma dieta rica em gordura, especialmente gordura saturada, aumenta os níveis de ROS e, conseqüentemente, de dano oxidativo, fazendo deste mecanismo um dos principais possíveis

responsáveis pelo aumento de incidência e mortalidade por câncer de próstata em indivíduos com esse tipo de dieta (52,67,69).

Alguns nutrientes têm sido relacionados, em diversos estudos, com a incidência e mortalidade por neoplasia prostática. Cálcio e zinco, quando ingeridos em maior quantidade, têm sido associados a uma maior incidência de neoplasia prostática (13,70). Da mesma maneira, uma dieta rica em nutrientes, tais como o Licopeno, Selênio, Vitamina E, Vitamina D e Isoflavonas de soja têm sido associadas a uma menor incidência de tal neoplasia.

A seguir, serão comentados alguns estudos sobre a ação destes antioxidantes na incidência do câncer de próstata.

Licopeno: vários estudos têm demonstrado uma relação inversa entre a ingestão, na dieta, de licopeno, e uma menor incidência de câncer prostático (42,71,72).

O licopeno é um carotenóide, potente antioxidante, presente em grandes quantidades no tomate e em frutas, como a goiaba e a pitanga. Em um estudo publicado recentemente, Giovannucci e colaboradores seguiram uma amostra de mais de 47.000 homens por um período de 12 anos. Os autores demonstraram que indivíduos com uma dieta rica em licopeno incorreram em um menor risco de desenvolvimento de neoplasia prostática (42). A hipótese mais aceita é a de que este efeito protetor do licopeno deva-se fundamentalmente às suas propriedades antioxidantes; ou seja, impedindo ou atenuando a ação das ROS ao DNA celular (42,71,72). Além de um papel na prevenção do aparecimento do câncer prostático, alguns estudos têm focado a possibilidade do licopeno ser auxiliar no tratamento dessa neoplasia (73,74).

Selênio: Outro nutriente bastante estudado em relação ao câncer de próstata. Publicações demonstram o seu possível papel protetor no câncer de próstata. Selênio é um oligoelemento componente da enzima antioxidante glutathione peroxidase. Além disso, apresenta um importante papel antioxidante nos mecanismos de proteção contra as ROS (13). Nos Estados Unidos, já na década de 70, uma menor taxa de mortalidade para certos tipos de neoplasia foi observada em estados que possuíam uma maior quantidade de selênio no solo (75). Corroborando este dado, Van der Brandt e colaborador demonstraram a ocorrência de uma maior mortalidade por certos tipos de cânceres em estados americanos com taxas baixas de selênio no solo (76). Em um estudo prospectivo, com mais de 30.000 indivíduos em um seguimento de sete anos, Yoshizawa e colaboradores demonstraram que homens com níveis mais baixos de selênio nas unhas dos pés (que se trata de um indicador do nível acumulado de selênio no organismo), apresentavam uma maior incidência de neoplasia prostática avançada (43). Em uma análise duplo-cego, randomizada e controlada por placebo, a suplementação com 200mcg de selênio diários, na forma de suplementos alimentares, diminuiu significativamente a incidência de neoplasia prostática (77). Em outro estudo, publicado recentemente, um baixo nível de selênio plasmático foi associado a um aumento de quatro a cinco vezes do risco de desenvolvimento de neoplasia prostática (78).

Vitamina E: Importante antioxidante, principalmente no processo de peroxidação lipídica de membranas celulares, tem sido apontada como tendo um possível papel protetor contra a neoplasia prostática (13). Talvez a evidência mais contundente do efeito protetor da vitamina E em relação ao câncer de próstata venha de um estudo finlandês, em que 29.000 homens, com um seguimento de cinco a oito anos, foram estudados. Esses homens foram divididos em três grupos e analisados para

incidência de diversos tipos de neoplasias. Homens que receberam vitamina E sob a forma de alfa-tocoferol, de maneira isolada ou em associação com beta-caroteno, apresentaram uma incidência 32% menor de neoplasia prostática (79). Estudos experimentais têm demonstrado, da mesma maneira, um possível papel protetor da vitamina E, inclusive através da observação de retardo no crescimento de linhagens de células prostáticas neoplásicas, *in vitro*, em presença de vitamina E (17).

Vitamina D: Esta vitamina tem um potente efeito antiproliferativo em vários tipos de tecidos tumorais (13). Alguns estudos têm demonstrado um efeito inibidor da vitamina D no câncer de próstata (80,81).

Isoflavonas de soja: Estudos têm sugerido que as isoflavonas de soja podem estar associadas a um menor risco de neoplasia prostática (82,83,84). O interesse no estudo das isoflavonas de soja vem do fato dessa ser uma das grandes diferenças entre a dieta consumida na Ásia, em países com baixa incidência de câncer prostático clinicamente ativo, conforme discutido anteriormente, e a dieta ocidental. Em um estudo publicado por Aldercreutz e colaboradores, foi demonstrado que a concentração de isoflavonas na urina, de japoneses que consomem a dieta tradicional japonesa, era 30 vezes maior, quando comparada a finlandeses que consumiam uma dieta típica ocidental. No caso, os índices de isoflavonas plasmáticos chegaram a ser 110 vezes maiores no grupo de japoneses estudados (85).

Em um estudo experimental, a genisteína e a daidzeína, duas das principais isoflavonas conhecidas, foram estudadas quanto à sua ação em linhagens de células prostáticas LNCaP neoplásicas. A genisteína inibiu o crescimento de tais células (86).

Os fatores de risco discutidos, associados à dieta, são de grande importância, na medida em que podem representar instrumentos de intervenção para prevenção primária, visto que os fatores bem definidos são imutáveis.

Embora as evidências de efeitos protetores ou promotores dos nutrientes em relação ao câncer de próstata sejam bastante contundentes, estudos adicionais são necessários para um melhor entendimento de seu mecanismo de ação nesta neoplasia.

#### **1.2.4 Diagnóstico**

O manejo para o diagnóstico da neoplasia prostática modificou sobremaneira nas últimas décadas, principalmente após o início da utilização, em larga escala, da dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA) no final da década de 80.

A recomendação da literatura clínica na década de 50 para o diagnóstico da neoplasia prostática era: *“Pense em carcinoma da próstata em qualquer paciente com mais de 50 anos com dor lombar constante. Pense em carcinoma de próstata em qualquer paciente com mais de 65 anos com sintomas de prostatismo”* (87). Hoje, os critérios diagnósticos são diferentes, podendo-se observar as modificações ocorridas no transcurso desse tempo.

Atualmente, o exame de toque retal (TR) e a dosagem sérica do PSA são utilizados como testes diagnósticos, tal como preconizado pela Organização Mundial da Saúde, Associação Americana de Urologia e a Sociedade Brasileira de Urologia (41,88). A combinação entre dosagem de PSA e TR é a melhor opção disponível, nos dias atuais, como exames de primeira linha para evidenciar a possibilidade da presença de neoplasia prostática (89).



Em casos de suspeita de neoplasia prostática, seja por alteração de PSA ou TR, o exame considerado como “padrão ouro” para amostragem do tecido prostático para análise anátomo-patológica é a biópsia transretal, orientada por ultrassom transretal (TRUS), para fins de tentativa de um diagnóstico definido (13).

Novas avaliações estão em estudos, principalmente no intuito de determinar quais pacientes devem ser submetidos à biópsia prostática.

Quando há um PSA alterado, principalmente se tal resultado encontra-se com um aumento marginal, com um PSA entre 4 e 10 ng/ml, a exclusão de neoplasia prostática torna-se difícil sem o uso da biópsia prostática. Entretanto, um percentual entre 70 e 75% dos pacientes que são submetidos a tal procedimento não apresentam neoplasia (27). Na tentativa de orientar mais precisamente a indicação de biópsia transretal, tem-se utilizado artifícios tais como a densidade do PSA - que é a relação entre o valor do PSA e o tamanho estimado da próstata, por ultrassonografia transretal - a velocidade do crescimento do PSA, que relaciona a dosagem recente de PSA a dosagens anteriores, através de cálculo referente à sua velocidade de progressão; e, por fim, a razão entre PSA total e PSA livre (41).

Levando-se em conta que a biópsia prostática não é um procedimento isento de riscos, relativamente dispendioso e também desconfortável para o paciente, diversos estudos têm sido feitos no intuito de selecionar com maior exatidão os prováveis portadores de câncer prostático e não submeter um número significativo de pacientes, sem neoplasia, a biópsias. Na esteira de tais trabalhos científicos, foi recentemente publicado um estudo sobre a relação do padrão proteico sangüíneo e a possibilidade de neoplasia prostática, onde foi encontrada uma especificidade de 71% para neoplasia prostática em pacientes com PSA entre 4 e 10 ng/ml, o que

pode representar um grande avanço em tais casos, se tal teste for validado em séries futuras (90).

Embora campanhas de detecção precoce do câncer prostático, com a realização de exames de PSA e TR em homens assintomáticos, sejam difundidas, o seu papel na diminuição da mortalidade por neoplasia prostática ainda é controverso (91,92). De tal sorte que o uso rotineiro de rastreamento com TR e PSA e/ou TRUS não é recomendado pelo *United States Preventive Services Task Force* (13).

A recomendação da Associação Americana de Urologia, quanto ao rastreamento do câncer prostático, em indivíduos assintomáticos, é a de que os riscos e benefícios da detecção precoce desta neoplasia, assim como de seu tratamento, sejam discutidos com o paciente (93), cujo preceito é endossado pela *American Cancer Society* e o *American College of Physicians* (13).

Ainda que a questão do uso rotineiro do rastreamento não esteja, até o momento, bem definida, alguns dados indicam um provável benefício deste procedimento. Aparentemente, populações rastreadas para neoplasia prostática podem ter uma mortalidade diminuída, quando comparadas a populações não rastreadas (94). Nos Estados Unidos, a comparação das taxas de mortalidade por câncer de próstata em 1997, com as de 1986, época anterior à utilização em larga escala do PSA, demonstrou que as primeiras taxas diminuíram significativamente (95).

Dois grandes estudos, um americano denominado *The prostate, lung, colon, ovary trial of the national cancer institute*; e outro na Europa, o *European randomized study of screening for prostate cancer*, estão em andamento e devem, em um futuro

próximo, definir com maior exatidão o papel do rastreamento da neoplasia prostática nas taxas de mortalidade (13).

Apesar da eficácia do PSA como marcador de patologias prostáticas, estudos adicionais estão sendo conduzidos com a perspectiva de identificação de outros marcadores, incluindo polimorfismos genéticos associados à suscetibilidade ao câncer de próstata. O provável papel das avaliações genéticas, especialmente as de genes polimórficos, seria de rastreamento de pacientes de alto risco para o aparecimento de neoplasia prostática.

### **1.2.5 Tratamento**

Consideráveis avanços ocorreram, nas últimas décadas, no tratamento da neoplasia prostática.

Segundo dados da literatura da década de 50, um percentual muito pequeno dos pacientes alcançava cura do câncer prostático; muitos desses, a partir de tratamentos que inicialmente eram destinados à patologia benigna prostática, sob forma de diagnóstico incidental de pequenas lesões prostáticas neoplásicas ressecadas “incidentalmente” no ato cirúrgico (87). Àquela época, apesar da orquiectomia bilateral, da radioterapia realizada e da prostatectomia radical perineal precoce, as taxas de cura eram “um pouco melhores que zero” (87).

Nesse período, a prostatectomia radical, preferencialmente por via perineal, era a única chance de tratamento curativo, embora a cura fosse alcançada somente em 3 a 5% dos pacientes, já que em poucas ocasiões a neoplasia prostática era identificada em um estágio inicial, sem extensão pericapsular ou extraprostática. Além disso, um número muito pequeno e seleto de urologistas realizava esse tipo de

procedimento. A radioterapia externa era considerada paliativa, e o implante de sementes radioativas de ouro foi abandonado, sendo a orquiectomia ou a estrogenerioterapia os tratamentos de escolha para palição (87).

Em uma revisão do *Johns Hopkins Hospital*, centro de referência mundial no tratamento desse tipo de neoplasia, publicada por Jewett, em 1956, 39% de 132 pacientes mostravam-se aparentemente livres de neoplasia cinco anos após tratamento com prostatectomia radical perineal (96). Tais resultados, analisados nos dias atuais, provavelmente representariam piores taxas, levando-se em conta o aumento do PSA como fator indicativo de recorrência tumoral.

Ao serem comparados tais dados com os publicados por cinco dos grandes centros americanos de tratamento de câncer prostático, incluindo dados recentes do próprio *Johns Hopkins Hospital* e ainda dados do *Baylor College, Washington University, Mayo Clinic* e *University of California Los Angeles (UCLA)*, onde a taxa média de cinco anos sem evidência de recorrência de neoplasia prostática passou a ser de 79,4% (41), observa-se um grande avanço na cura da neoplasia prostática.

O tratamento da neoplasia prostática, nos dias atuais, pode ser dividido em dois tipos: o tratamento com o intuito curativo, realizado em pacientes com tumores prostáticos clinicamente localizados, e o tratamento paliativo, utilizado em pacientes nos quais o tratamento curativo não é indicado, geralmente por uma impossibilidade de cura desses pacientes, devido ao estágio avançado de sua doença (41).

O tratamento de eleição para o câncer prostático avançado é representado, em primeira linha, pelo bloqueio androgênico, visto que a neoplasia prostática é fundamentalmente dependente de androgênios, como já demonstrado desde a

década de 40 (87). Tal bloqueio é realizado cirurgicamente, com o uso da orquiectomia ou, de forma medicamentosa, com a utilização de estrogênios, antiandrogênios, periféricos e/ou centrais ou análogos LH-RH (21). Pacientes com câncer disseminado, quando instituída a terapia antiandrogênica, têm uma resposta clínica entre 70 e 85% dos casos, mantendo essa resposta, em média, por 18 meses (21).

Após um período variado, a neoplasia não responde mais ao bloqueio androgênico, por causas, até então, não completamente compreendidas. Tais pacientes têm um mau prognóstico, pois não existe terapêutica eficaz, até o momento, para esse estágio do câncer de próstata (41). São, então, instituídos tratamentos de segunda linha com diversos protocolos, tais como retirada de antiandrógenos, hormonioterapia secundária com altas doses de estrógenos ou fosfato de estramustina, quimioterapia sistêmica, uso de glicocorticóides, compostos imidazólicos como o cetoconazol, que inibe a enzima citocromo P450, entre outras tentativas de controle tumoral, na grande maioria das vezes sem sucesso, ou com uma resposta por curto período (13).

Diferentemente do tratamento da neoplasia prostática avançada, o tratamento de escolha no câncer prostático clinicamente localizado, com intuito curativo, não é, até a presente data, um consenso. As duas principais opções terapêuticas são a prostatectomia radical ou a radioterapia, externa ou sob forma de braquiterapia.

Segundo o I Consenso Brasileiro de Câncer de Próstata de 1998, não existe, até o momento, concordância na literatura sobre qual seria a melhor opção terapêutica. Em uma metanálise realizada pela Associação Americana de Urologia, em 1995, foram revisados 12.501 artigos sobre tratamento de neoplasia prostática, sendo

considerados aceitáveis, do ponto de vista metodológico, apenas 165 deles. Conforme tal revisão, as duas opções de tratamento são aceitas e suas vantagens e desvantagens devem ser discutidas com o paciente a receber a terapia (41).

A terapia expectante, ou seja, a observação dos pacientes com neoplasia prostática sem intervenção terapêutica, é também uma opção.

Revisão da literatura, com análise de 144 trabalhos, tentou comparar os três tipos de tratamento: prostatectomia radical, radioterapia e conduta expectante. Os autores concluíram que os parâmetros de seleção e descrição de tais estudos eram muito diferentes, o que dificultou sobremaneira a comparação das três estratégias terapêuticas no manejo do câncer de próstata, órgão confinado (97).

Em outra revisão da literatura, em pacientes com tumores palpáveis e clinicamente localizados, os autores encontraram um melhor controle da doença nos pacientes submetidos à prostatectomia radical, ocorrendo uma sobrevida de 10 anos em 93% dos casos, quando comparados aos que receberam tratamento radioterápico, onde foi observada uma taxa de 75% de sobrevida em 10 anos (98).

A braquiterapia tem sido utilizada em diversos centros, geralmente em pacientes com tumores iniciais, estágios T1 e T2. Tais pacientes são selecionados por condições tumorais favoráveis, incluindo baixo escore de Gleason, baixo PSA e estágios iniciais da doença. Mais informações, novos estudos e maior tempo de seguimento são necessários para melhor se definir o efeito da moderna braquiterapia no controle da doença e qualidade de vida dos pacientes a ela submetidos, assim como o valor da seleção de pacientes como maneira de avaliar os resultados finais desta terapêutica (99).

Os pacientes assintomáticos, com idade avançada ou com doenças concomitantes são candidatos à conduta expectante, especialmente aqueles com tumores de baixo grau de Gleason, assim como tumores em estágios iniciais (100,101).

Segundo diretrizes da Sociedade Brasileira de Urologia, expressas no I Consenso Brasileiro de Câncer de Próstata, a Prostatectomia Radical está indicada em pacientes com expectativa de vida superior a 10 anos e que não apresentem contraindicações clínicas para a cirurgia. A Radioterapia está indicada para pacientes com expectativa de vida suficientemente longa, a fim de que o tratamento do paciente se justifique, em pacientes que apresentem contra-indicações ao tratamento cirúrgico e naqueles que não possuam patologia colo-retal que contra-indique a irradiação. A conduta expectante pode ser uma opção em pacientes com sobrevida menor de 10 anos, com histologia favorável, ou seja, baixo escore de Gleason. Deve-se ressaltar a extrema importância da participação do paciente na decisão terapêutica, sendo apresentadas todas as formas de terapia disponíveis, assim como suas vantagens e desvantagens (41).

### 1.3 POLIMORFISMO GENÉTICO

O genoma humano é bastante variável. Além de polimorfismos que produzem variações genéticas benignas, tais como a cor dos olhos, entre outras, o genoma contém centenas de mutações denominadas polimorfismos.

Um gene polimórfico é aquele no qual os alelos variantes são comuns o suficiente para serem úteis como marcadores genéticos (102).

Pesquisas recentes têm relacionado o polimorfismo genético a diversas patologias, tais como o câncer (103,104), a concentração de lipídios plasmáticos (105), cardiopatia isquêmica (106), aterosclerose (107) e dosagem sérica de lipoproteína A, sendo essa última fator de risco isolado para desenvolvimento de doenças cardiovasculares (108) e, inclusive, patologias como a fibromialgia (109).

Embora somente algo em torno de 10% dos tumores prostáticos sejam creditados a heranças genéticas de genes raros e altamente penetrantes, é provável que múltiplos genes comuns e de baixa penetrância contribuam para o desenvolvimento da neoplasia prostática. Tais genes podem predispor ao câncer prostático, modulando a resposta do indivíduo a fatores ambientais e interagindo com outros genes através de polimorfismos genéticos (13).

Estudos têm analisado a relação entre a expressão genética, perfil oxidativo e neoplasias, entre estas, a prostática. Tais estudos, entre outros, observam a associação entre o polimorfismo genético de enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), a capacidade antioxidante de nosso organismo e patologias (64,110,111). Tais polimorfismos fazem com que as defesas endógenas contra as espécies reativas de oxigênio (ROS) sejam abaladas, fazendo com que o DNA celular fique mais suscetível ao ataque de tais substâncias, aumentando a possibilidade de carcinogênese (110).

Sabe-se que os hormônios androgênicos desempenham um papel importante na gênese e manutenção da neoplasia prostática (112,113).

A relação entre a regulação genética da síntese de hormônios androgênicos e a incidência de neoplasias tem sido intensamente estudada. Tais análises visam



correlacionar os polimorfismos genéticos existentes nestes genes, tais como o gene da enzima citocromo p-450c 17 alfa, CYP17, e a suscetibilidade ao aparecimento de neoplasias, tais como a prostática, o que faria com que indivíduos portadores de certos alelos incorressem em um maior risco de desenvolvimento de neoplasia prostática (112,113,114,115 ,116,117,118).

#### 1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, DANO OXIDATIVO, NEOPLASIA PROSTÁTICA E ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE MANGANÊS-DEPENDENTE (MNSOD OU SOD2)

Desde a época do biólogo alemão Paul Ehrlich (1854-1915), sabe-se que os animais necessitam de oxigênio para viver. Nesse ínterim, muito se descobriu sobre os aspectos bioquímicos da utilização do oxigênio pelos animais, especialmente pelos humanos. Porém, só mais recentemente se deu atenção ao estudo de seus metabólitos (119).

Uma das descobertas realizadas por esses estudos foi a de que o metabolismo do oxigênio pelo organismo humano resulta em formação de substâncias tóxicas às células, as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS), ou simplesmente radicais livres (119), o que resulta em um paradoxo, pois, ao mesmo tempo em que o oxigênio é vital ao organismo, pode ser danoso ao mesmo.

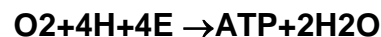
Conceitualmente, uma ROS ou radical livre é um átomo, ou molécula, que possui um elétron desapareado em sua órbita mais externa da eletrosfera. A presença de tal elétron, na órbita externa, torna este átomo ou molécula extremamente instável e reagente em uma tentativa de se parear e assim atingir a estabilidade (110,119,120). Tal fato faz com que reaja com outras moléculas e átomos, em reações de oxi-

redução (REDOX), oxidando tais substâncias e gerando um processo em cascata, resultando em novas ROS.

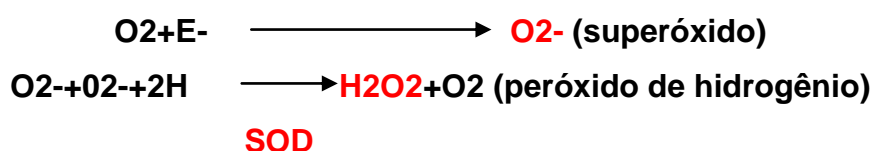
Os radicais livres atacam virtualmente todas as biomoléculas de membranas citoplasmáticas e de organelas à estrutura de DNA, podendo gerar mutações (110,119).

Porém, já que tais substâncias tóxicas derivam do metabolismo normal do oxigênio, o organismo humano possui meios de neutralizar tais metabólitos nocivos através de enzimas endógenas com ação antioxidante (102).

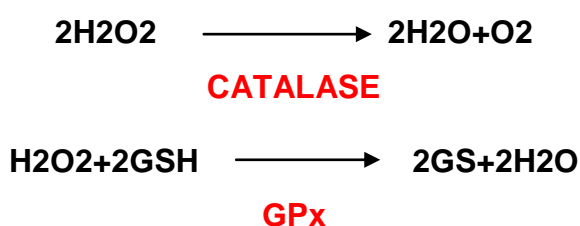
No metabolismo normal, a quase totalidade do oxigênio é metabolizado, em nível mitocondrial, em Adenosina Trifosfato (ATP) e água, através de uma reação de redução tetravalente, na qual os grandes doadores de hidrogênio e elétrons são NADH, FADH e Coenzima Q, como representado esquematicamente abaixo (121):



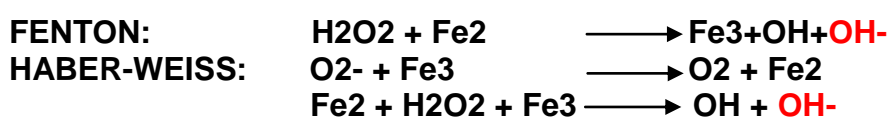
Entretanto, uma parcela menor, de 2 a 5%, deste oxigênio, sofre, em condições metabólicas normais, uma reação de redução univalente, formando a primeira forma de ROS, a qual é denominada de superóxido ( $O_2^-$ ). A mesma é inativada pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) e transformada em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que, do ponto de vista conceitual, não é um radical livre, por não possuir um elétron desapareado na última órbita da eletrosfera. Porém, o  $H_2O_2$ , por ser extremamente instável e fonte de deletérias formas de ROS, como o radical hidroxila, também é considerado um radical livre (110,120,121).



O peróxido de hidrogênio é inativado por duas rotas distintas: pelas enzimas antioxidantes catalase e pelas glutathion peroxidase (GPx). Na primeira rota, via catalase, o resultado dessa inativação é oxigênio e água, enquanto que, na inativação via glutathion peroxidase, o resultado é água e glutathion oxidado, conforme pode ser visto abaixo (110,119,121,122).



Porém, uma parcela do peróxido de hidrogênio não é inativado e, através das reações não enzimáticas de Fenton e Haber-Weiss, combina-se com ferro livre circulante, formando a que talvez seja a forma mais nociva das ROS, e para a qual não possuímos enzima antioxidante específica, denominada radical hidroxila (OH<sup>-</sup>), segundo as reações que seguem (110,119,122).



Como a superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima em nossa linha antioxidante, pode-se observar que alterações em suas funções transtornam sobremaneira todo nosso sistema de defesa contra as ROS, já que a ação das demais enzimas antioxidantes fica prejudicada, pois estas agem a partir de substratos das reações da SOD, como exposto anteriormente.

A teoria do dano oxidativo, por radicais livres derivados do oxigênio, teve em Denham Harman, da Universidade de Nebraska, seu principal proponente, embora a base desta idéia tenha sido introduzida inicialmente por R. Gerschman, em 1954. Harman propôs o que chamamos de teoria dos radicais livres para o envelhecimento, a qual é sustentada pela descoberta de que as ROS, além de formarem os pigmentos da idade, produzem ligações cruzadas em algumas moléculas e podem danificar o DNA celular (123).

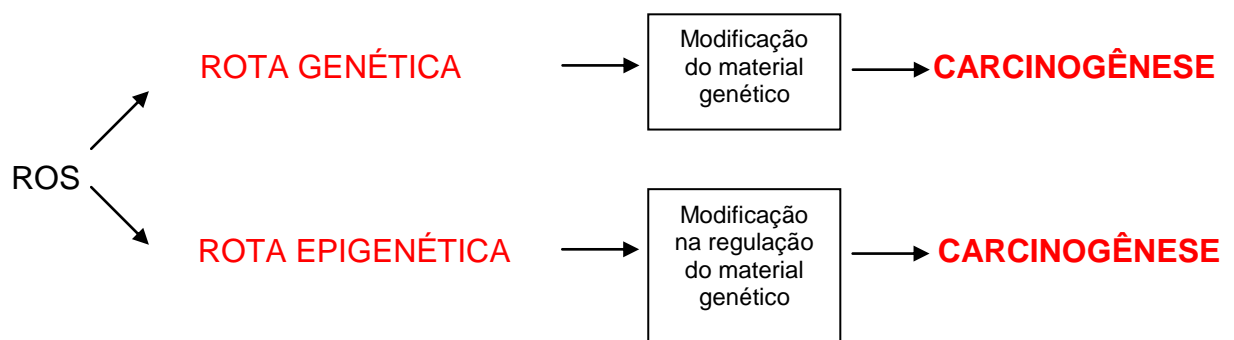
Diversas mudanças ocorrem em nosso metabolismo corporal com o envelhecimento, como é o caso da modificação do perfil oxidativo (122), o qual é a relação, o equilíbrio, entre a produção de ROS, oriundas de nosso metabolismo (assim como radicais livres exógenos), e as defesas contra estes danos, representadas por enzimas antioxidantes, conforme exposto acima, bem como antioxidantes exógenos que são ingeridos (59,62,110,122,124,125,126,127,128).

Dano oxidativo, por sua vez, é o desequilíbrio entre essas substâncias, seja por um aumento de substâncias oxidantes (ROS ou radicais livres exógenos), por uma diminuição das substâncias antioxidantes (enzimas endógenas ou antioxidantes exógenos) ou ambos (64,110,119,122, 123,129).

Com a modificação do perfil antioxidante, seja pela diminuição de enzimas antioxidantes com o envelhecimento (129), seja pela redução da capacidade antioxidante de determinada enzima (64,110,111), como pode ocorrer, entre outras razões, devido ao polimorfismo genético destas, a proteção do DNA contra as ROS pode ficar comprometida (130,131).

As ROS provavelmente induzem ao surgimento de neoplasias por duas rotas: causando dano na estrutura do DNA propriamente dita, o que leva à deleção, adição ou substituição de bases nitrogenadas, mutando o DNA - a denominada rota genética - ou modificando a expressão de um determinado gene, principalmente inibindo-o ou silenciando-o, fenômeno esse que pode ocorrer, por exemplo, se um gene de supressão tumoral for silenciado ou tiver sua expressão gênica diminuída através da indução, pelas ROS, de mecanismos regulatórios existentes no desenvolvimento humano. Tal via de indução tumoral denomina-se rota epigenética (26). É o que ocorre no caso da hipermetilação induzida por ROS, ou seja, um silenciamento genético maior que o desejado (130).

As rotas estão expressas na figura 3 (diagrama das rotas genética e epigenética).



**Figura 3 - Representação esquemática das rotas pelas quais as ROS levam à carcinogênese**

Metilação é um processo no qual existe um silenciamento genético, ou seja, uma regulação gênica negativa, diminuindo dessa maneira a expressão de alguns genes. Parece fazer parte normal do desenvolvimento humano, já que genes de desenvolvimento, tais como os necessários para o crescimento intrauterino e outros, não mais são necessários nos demais períodos da vida, sofrendo então processo de metilação para inativá-los ou, ao menos, diminuir sua expressão genética. A função precisa da metilação em células animais ainda não está completamente entendida. Imagina-se que a mesma exerça um papel principal na expressão gênica, regulando-a. Tal fato é de extrema importância, visto que um dos mecanismos de lesão genética promovida pelas ROS é o aumento do processo de metilação; ou seja, uma hipermetilação, como mencionado anteriormente. Se tal reação ocorrer em um gene de supressão tumoral, o mesmo terá sua expressão gênica diminuída, favorecendo os oncogenes e, assim, elevando de maneira significativa a possibilidade de desenvolvimento de neoplasias (26).

Diversos estudos têm sido apresentados, relacionando variáveis genéticas, perfil oxidativo e neoplasia prostática. Estes estudos podem ser divididos em quatro grandes grupos, conforme o seu enfoque. O primeiro grupo de trabalhos trata da rota genética; é aquele que aborda as modificações estruturais do DNA realizadas por dano oxidativo (59, 64,132,133,134,135). O segundo grupo relaciona-se à rota epigenética, a qual diz respeito aos artigos referentes à regulação gênica dos genes supressores do desenvolvimento de neoplasia prostática, como é o caso do gene p53, entre outros (65,66,115,136,137).

Da mesma forma, há estudos mostrando que alterações cromossômicas, como a perda de um alelo, podem estar associadas à formação de neoplasias mais agressivas (138).

Um quarto grupo de estudos, relacionando expressão genética, perfil oxidativo e neoplasia é um dos alvos deste estudo e correlaciona-se com o polimorfismo genético e a capacidade antioxidante do organismo (63,110,111).

Pesquisas recentes têm relacionado o polimorfismo genético a patologias como o câncer (103,104), a concentração de lipídios plasmáticos (105), cardiopatia isquêmica (106), aterosclerose (107), dosagem sérica de lipoproteína A, sendo essa última fator de risco isolado para desenvolvimento de doenças cardiovasculares (108) e, inclusive, patologias como a fibromialgia (109).

A enzima MnSOD tem mostrado ser de grande relevância na prevenção do desenvolvimento de neoplasias, de tal sorte que seu gene regulador tem sido apontado por pesquisadores como gene de supressão tumoral (63,110,111). Sendo assim, um funcionamento inadequado desta enzima pode, talvez, contribuir como fator de risco para o desenvolvimento de uma neoplasia.

Diferentemente da superóxido dismutase citosólica ou Cobre/Zinco SOD (CuZnSOD), somente um número muito limitado de mutações foi descrita na superóxido dismutase mitocondrial (MnSOD ou SOD2) (111). Especial atenção tem sido direcionada para o seu polimorfismo, principalmente devido ao fato de estudos atuais terem relacionado este polimorfismo a uma maior incidência de neoplasias, particularmente de mama (110), e também pela crescente importância ao

metabolismo mitocondrial, estando esse relacionado à regulação da apoptose celular (139,140,141).

Uma associação bastante significativa entre polimorfismo genético da MnSOD e incidência de neoplasia da mama tem sido encontrada, dependente de interações ambientais (110).

A neoplasia de mama, assim como a de próstata, tem sua incidência aumentada com a idade. Sabendo-se, também, que tem havido uma associação crescente, relacionando fatores geradores destas duas neoplasias, nasce a questão da possibilidade de uma relação entre polimorfismo genético da MnSOD e neoplasia prostática.

#### 1.5 ANDROGÊNIOS, NEOPLASIA PROSTÁTICA E ENZIMA CITOCROMO P450C17 $\alpha$ (CYP17)

As primeiras observações de que a neoplasia prostática tem relação com hormônios androgênicos vem de longa data. Tais observações foram bem descritas por Huggins e Hodges já em 1941. Sabia-se, já naquela época, que, com a eliminação da secreção testicular de androgênicos, ocorria regressão da neoplasia prostática (142).

Em um estudo datado de 1946 (87), Nesbit e Plum demonstraram que pacientes com neoplasia prostática, não tratados, tinham uma sobrevida de cinco anos não superior a 10%, em contraste com uma série de casos publicada por Nesbit e Baum, em que esta taxa de sobrevida foi de 44% em pacientes tratados com castração cirúrgica associada à estrogênio terapia com 5 mg de dietilestilbestrol (87).



Sabe-se, da mesma maneira, há décadas, que eunucos raramente desenvolvem câncer de próstata (143).

A maneira de ação dos hormônios androgênicos na gênese e progressão da neoplasia prostática continua obscura, da mesma maneira como permanece ainda sem entendimento quando e por qual motivo as células do câncer prostático tornam-se hormônio-independentes após algum tempo de evolução tumoral (144).

Dados de que o câncer de próstata relaciona-se com a testosterona são irrefutáveis e demonstrados em dezenas de estudos. Porém, como essa relação se processa é algo ainda a ser completamente esclarecido. Enquanto a estimulação androgênica é necessária para o crescimento e desenvolvimento prostático, uma relação direta entre níveis de androgênicos e câncer de próstata não pode ser feita, pois inúmeras hipóteses nesse sentido não foram comprovadas (144).

A próstata é uma glândula regulada hormonalmente. Hormônios esteróides, como a testosterona e o estrogênio, exercem um importante papel no controle da proliferação celular de seus órgãos alvo; e, como se sabe, o aumento da proliferação celular é ponto chave na carcinogênese humana (31,145).

Levando-se em conta tal ponto de vista, poder-se-ia hipotetizar que, quanto maiores os níveis de hormônios androgênicos, maior a proliferação celular em seus órgãos-alvo, neste caso, o tecido prostático; e, quanto maior a proliferação celular, maior a probabilidade de desenvolvimento de neoplasia nesse órgão. Corroborando para tal hipótese, temos um grande número de estudos, como o realizado por Ross e colaboradores, na tentativa de desvendar a causa da maior incidência de câncer de próstata em afroamericanos (146). Neste estudo, restou demonstrado que

homens afroamericanos – os quais, como já se sabe, possuem incidência maior de neoplasia prostática - apresentavam níveis 15% maiores de testosterona circulante, quando comparados a controles brancos, pareados por idade, o que reforçou a idéia de uma relação diretamente proporcional entre câncer de próstata e níveis circulantes de testosterona.

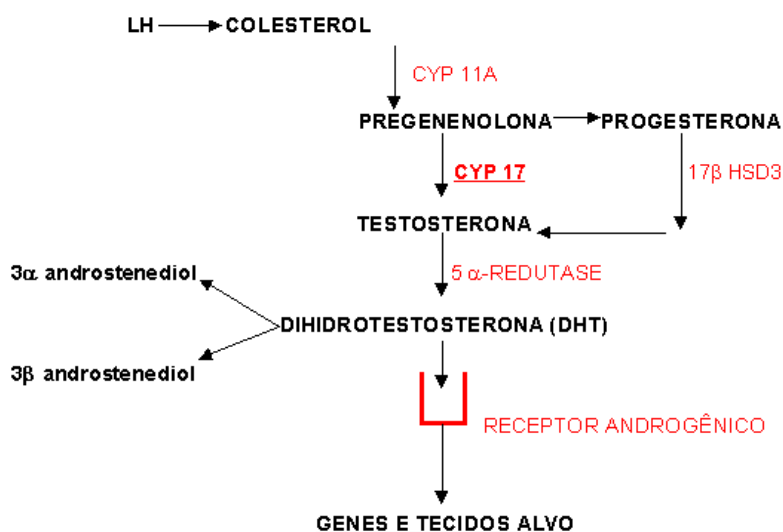
Tais hipóteses de direta relação androgênios-câncer prostático têm procurado desvendar as diferenças de incidência de neoplasia prostática clinicamente ativa entre etnias diversas. Como se sabe, japoneses e chineses, mesmo residentes nos Estados Unidos, apresentam menores taxas de incidência desta neoplasia, quando comparados a caucasianos e afroamericanos. Da mesma forma, alguns estudos têm demonstrado uma menor expressão da enzima 5 alfa redutase, em asiáticos, a qual é responsável pela conversão da testosterona em dihidrotestosterona (DHT), que é o mais potente androgênio intraprostático, o que vem ao encontro da hipótese da relação direta androgênios-câncer de próstata (31).

Porém, outras pesquisas não demonstraram uma relação linear entre hormônios androgênicos e câncer de próstata. Em estudos prospectivos diversos, Guess e Barrett-Connor demonstraram não haver relação entre níveis de hormônios androgênicos e risco de desenvolvimento de neoplasia prostática, assim como também não demonstraram relação entre o aparecimento desta neoplasia e globulina transportadora de testosterona ou atividade da enzima 5 alfa redutase (147,148).

Alguns autores, ao contrário do que foi exposto até o momento, postulam que a neoplasia prostática estaria associada tanto a baixos níveis de hormônios androgênicos, quanto às alterações nas taxas hormonais que ocorrem no decorrer

da vida do indivíduo, como no caso das baixas dosagens de androgênios que ocorrem com o envelhecimento. Em um estudo publicado em 2000, por Hoffman e colaboradores, pacientes com câncer de próstata apresentaram taxas diminuídas de testosterona livre, quando comparados a controles sem neoplasia, sendo que aqueles demonstraram doença mais extensa e, dentre os mesmos, todos os pacientes com tipos histológicos com escore de Gleason maior ou igual a oito apresentaram baixa testosterona livre (144). Da mesma maneira, Prehn demonstrou que as baixas taxas de testosterona séricas estariam associadas a um maior risco de desenvolvimento de câncer prostático e, além disso, que a reposição hormonal com testosterona, em homens com deficiência androgênica, poderia diminuir os riscos de neoplasia prostática, além de ter verificado que a administração de androgênios poderia prevenir o desenvolvimento de neoplasia prostática hormônio-independente (149).

O metabolismo da testosterona, conforme esquematizado a seguir, é bastante complexo, dependendo de diversas enzimas e regulações ambientais e genéticas para se processar, sendo esse talvez um possível fator de confusão em estudos realizados com este hormônio, tendo em vista que sempre se estuda parte da rota do metabolismo androgênico.



**Figura 4 - Representação esquemática simplificada da produção de hormônios androgênicos a partir da molécula de Colesterol**

Tal como observa-se na representação esquemática acima, várias são as etapas para a produção de hormônios androgênicos, assim como para sua ação em nível celular, e pequenas alterações nestas rotas podem representar grandes mudanças hormonais.

Embora existam evidências de que a secreção e o metabolismo hormonal podem ser influenciados por alterações ambientais, o controle dos padrões hormonais é, direta ou indiretamente, regulado geneticamente (31).

Genes específicos controlam a produção e a expressão das enzimas responsáveis pelo metabolismo dos hormônios sexuais, assim como regulam o receptor androgênico, além de possuírem outras funções relacionadas a este metabolismo (31).

Polimorfismos genéticos no gene da CYP17, que controla a enzima citocromo p450c17 $\alpha$ , responsável pela transformação de pregnenolona em testosterona ou estrogênio, têm sido associados ao desenvolvimento de neoplasia prostática, assim como de neoplasia mamária (112,113,115,116,117,118,151).

O gene CYP17, localizado no cromossomo 10, regula a enzima citocromo p450c17 $\alpha$ , a qual cataliza esteróides em pontos chaves, na biosíntese de testosterona, tanto em nível testicular quanto supra-renal (150).

Em se considerando a importância da enzima citocromo p450c17 $\alpha$  na biosíntese de testosterona e, sabendo-se da relação deste hormônio com a neoplasia de próstata, polimorfismo no CYP17 que altere ação biológica da enzima citada pode ser crucial no desenvolvimento desta neoplasia (112).

Um polimorfismo pontual do tipo T para C, Timina para Citosina, ou seja, a mudança de apenas uma base nitrogenada, forma 2 alelos possíveis A1(T) ou A2(C), com genótipos tipo A1A1, A2A2 e A1A2. Os indivíduos portadores do alelo A2, em alguns estudos, têm demonstrado um nível mais elevado de hormônios sexuais (151,152).

Quanto à neoplasia prostática, existe controvérsia sobre qual seria o alelo, A1 ou A2, associado a um maior risco de desenvolvimento deste tipo de câncer, embora a maioria dos estudos aponte para o alelo A2 como fator de risco, mesmo que estudos prospectivos e bem desenhados do ponto de vista epidemiológico reconheçam o alelo A1 como associado a essa neoplasia. Na neoplasia mamária, tal risco estaria associado ao alelo A2 (112,113,114,115,116,117,153).

O CYP 17 está envolvido na biosíntese de androgênios e estrogênios. Sabe-se que tanto o câncer de próstata, quanto o de mama, são dependentes de hormônios: o primeiro, dos androgênios; e o segundo, dos estrogênios. Talvez, como hipótese, estes resultados contraditórios representem simplesmente que cada alelo é responsável pela produção de um tipo de hormônio, sendo o alelo A1 mais androgênico, e o A2 mais estrogênico (112).

Embora não se saiba a razão para estes resultados contraditórios, no que tange ao câncer de próstata, um genótipo CYP17 idêntico pode, aparentemente, exercer um efeito protetor ou promotor de neoplasia, dependendo de interações com o meio ambiente e outras cargas genéticas (112).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 GERAIS**

Descrever as freqüências alélicas e genóticas dos polimorfismos da SOD2 e CYP17, na população referida, e a associação de tais polimorfismos genéticos e neoplasia prostática maligna.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

Em indivíduos com neoplasia prostática e em indivíduos sem indicativos dessa patologia, bem como na população aleatória, descrever e comparar:

- Freqüências alélica e genóticas da SOD2 e CYP17 da população aleatória e os resultados com a literatura pertinente.
- Freqüências alélicas e genóticas da SOD2 e CYP17 do grupo de afetados por neoplasia prostática e controle de tais resultados.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 DELINEAMENTO**

O delineamento foi executado a partir do referencial teórico epidemiológico descrito em Pereira (2000) e Jorde *et al* (1996) (154). O estudo proposto foi do tipo transversal, individuado e descritivo-analítico.

#### **3.2 PERÍODO DO ESTUDO**

A coleta do material de pesquisa foi feita entre setembro de 2000 e novembro de 2002.

#### **3.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA**

Foram estudados indivíduos que procuraram o ambulatório do Serviço de Urologia do Hospital São Lucas da PUCRS com o intuito de consulta para tratamento ou prevenção de patologias prostáticas, os quais foram diagnosticados com neoplasia prostática maligna ou não.



Fazem parte da amostra, da mesma maneira, pacientes da clínica privada do autor, diagnosticados ou não para câncer de próstata.

A população aleatória, ou grupo controle aleatório, foi composta por participantes do Projeto Gravataí do Instituto de Geriatria e Gerontologia (IGG) da PUCRS, destinado à terceira idade.

Este estudo foi realizado em 2 etapas: em uma primeira, determinou-se as freqüências alélicas e genóticas da SOD2 e CYP17 em uma população aleatória, já referenciada, representativa da população residente no Rio Grande do Sul, para fins de descrever tais freqüências e compará-las às da literatura. Em uma segunda etapa, foram avaliados indivíduos com e sem neoplasia de próstata, a fim de se determinar as freqüências alélicas e genóticas dos genes em estudo em tais grupos e compará-las.

A amostra foi dividida em 3 grupos:

- **Grupo 1** – Grupo controle aleatório, denominado de população aleatória, para genotipagem da enzima Superóxido Dismutase Dependente de Manganês (SOD2) e da enzima Citocromo P450 17 $\alpha$  (CYP17). Tal população foi composta de indivíduos com mais de 50 anos, homens ou mulheres, com ou sem qualquer tipo de patologia diagnosticados, escolhidos aleatoriamente, levando-se em conta somente a idade, oriundos do município de Gravataí, integrantes do Projeto Gravataí, do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- **Grupo 2** – Grupo de casos ou afetados. Pacientes com neoplasia prostática, diagnosticados por biópsia, que tenham ou não sido submetidos a qualquer

tipo de tratamento, seja cirúrgico, radioterápico ou bloqueio hormonal para esta neoplasia. Foram incluídos os pacientes com neoplasia prostática, independentemente do estágio clínico em que se encontravam no momento da consulta, bem como do fato de terem sido submetidos a algum tipo de tratamento ou não.

- **Grupo 3** – Grupo de controles. Pacientes considerados sem indícios de câncer de próstata; ou seja, toque retal não suspeito de neoplasia e PSA menor de 4 ng/ml. Foram excluídos pacientes com PSA maior de 4ng/ml, mesmo que esses tenham apresentado toque retal não suspeito de neoplasia e que tenham se enquadrado em critérios de baixa probabilidade de câncer prostático, levando-se em conta a densidade do PSA, a velocidade de aumento do mesmo, assim como a razão PSA livre/PSA total. Foram incluídos neste grupo pacientes portadores de hiperplasia prostática, sintomática ou não, que se enquadraram nos parâmetros já descritos acima.

Os grupos de afetados e controles foram pareados por idade e etnia.

O cálculo do tamanho amostral para estimar a relação entre genótipo e neoplasia prostática foi feito conforme descrito em Pereira (2000) (154), página 351, onde o cálculo do tamanho amostral é obtido pela fórmula:  $n=pq/E^2$

Sendo que:

n= tamanho da amostra

p= estimativa de proporção “p” de homem > de 50 anos com câncer de próstata = 1/8 = 0,125.

q= estimativa de proporção “q” de homem > de 50 anos sem câncer de próstata = 0,875.

E= erro padrão calculado a partir de uma precisão estimada em torno de prevalência de 3%. Portanto, erro padrão  $E=1,5\%= 0,015$ .

O número total de voluntários investigados foi de 270 indivíduos.

### 3.4 ANÁLISE CLÍNICA

Foi realizada através de anamnese médica e exame de toque retal por urologista treinado nesta área.

### 3.5 ANÁLISE LABORATORIAL

1. **Bioquímica:** Através da dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA) no soro destes pacientes. Foi utilizado o teste de PSA IMX *system* 1D85 da Abbott Laboratórios Ltda., com valores normais de 0 a 4 ng/ml.
2. **Biomolecular:** Foi feita através de análise de DNA dos genes das enzimas SOD2 e CYP17, coletada através de sangue total. Foram analisadas fundamentalmente a mudança de bases, polimorfismo genético, na posição 9 da seqüência de proteínas que formam a SOD2 (MnSOD), visto que uma mudança da Valina para Alanina nesta posição (GTT para GCT) pode fazer com que a capacidade antioxidante desta enzima seja diminuída, predispondo a DNA celular a um maior dano oxidativo pelos radicais livres, visto que menos protegido por esta enzima degradante da primeira espécie reativa de oxigênio (ROS), que é o Superóxido, fazendo então um dano neste DNA e o predispondo à formação de células neoplásicas.

Os possíveis genótipos encontrados são denominados AA, AB e BB, conforme Ambrose *et al* (110).

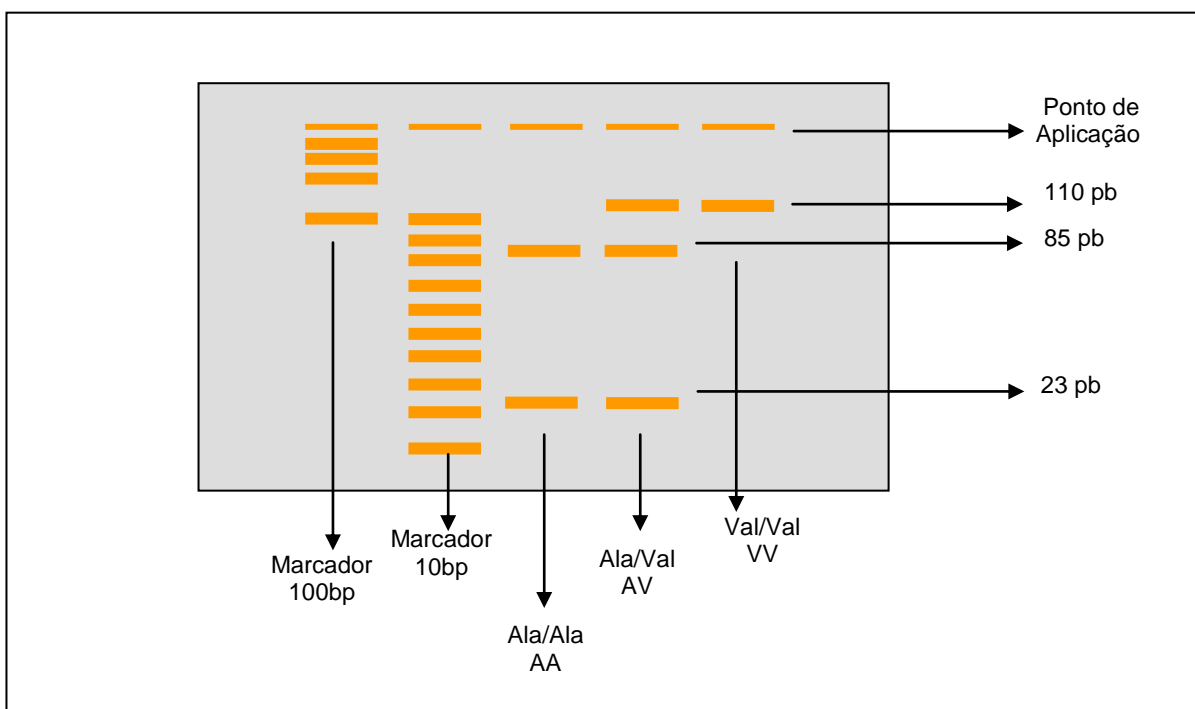
Foi avaliado, da mesma maneira, o polimorfismo genético da enzima citocromo P450c17 $\alpha$  (CYP17), o polimorfismo no cromossomo 10, na região 5', uma mudança

de bases de Timina para Citosina e uma modificação do tipo T-C, fazendo 2 alelos possíveis A1(T) e A2(C). Sendo os genótipos possíveis A1A1, A2A2, A1A2.

Para extração de DNA para Genotipagem da SOD2 e CYP17, foram realizadas coletas de sangue, utilizando-se o sistema de venóclise com aparato descartável a vácuo. De cada voluntário, foi coletado 5ml de sangue em tubo, contendo EDTA 0,1% para extração do DNA nuclear. O DNA nuclear foi extraído através do kit de purificação de DNA, *GFX Genomic Blood DNA Purification (Amersham Biosciences, USA)*, e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior genotipagem.

A genotipagem da SOD2 por PCR/RFLP (*polymorphism chain reaction/restriction fragments length polymorphism*) foi realizada segundo Taufer *et al.* (155) e é descrita a seguir:

1. PCR- A amplificação da seqüência do gene da MnSOD, contendo o polimorfismo em questão, foi realizada, utilizando-se 40 pmol dos primers (sense 5'GCCCAGCCTGCGTAGACGGTCCCGC3' e anti-sense 5'TGCCTGGAGCCCAGATACCCCAAG3'), Taq polimerase (1,25unidades) e dNTPs, utilizando tampão de reação [10mn tampão Tris-HCl (pH8,3), 50mM KCl e 1,0mM  $\text{MgCl}_2$ ].
2. RFLP- O produto amplificado, contendo 110pb, foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. Após, a genotipagem foi realizada por RFLP, onde o produto amplificado foi digerido pela endonuclease de restrição *Hae* III (Invitrogen, USA), utilizando-se 15U a  $37^{\circ}\text{C}$  por seis horas. Os fragmentos digeridos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio (Figura 5).

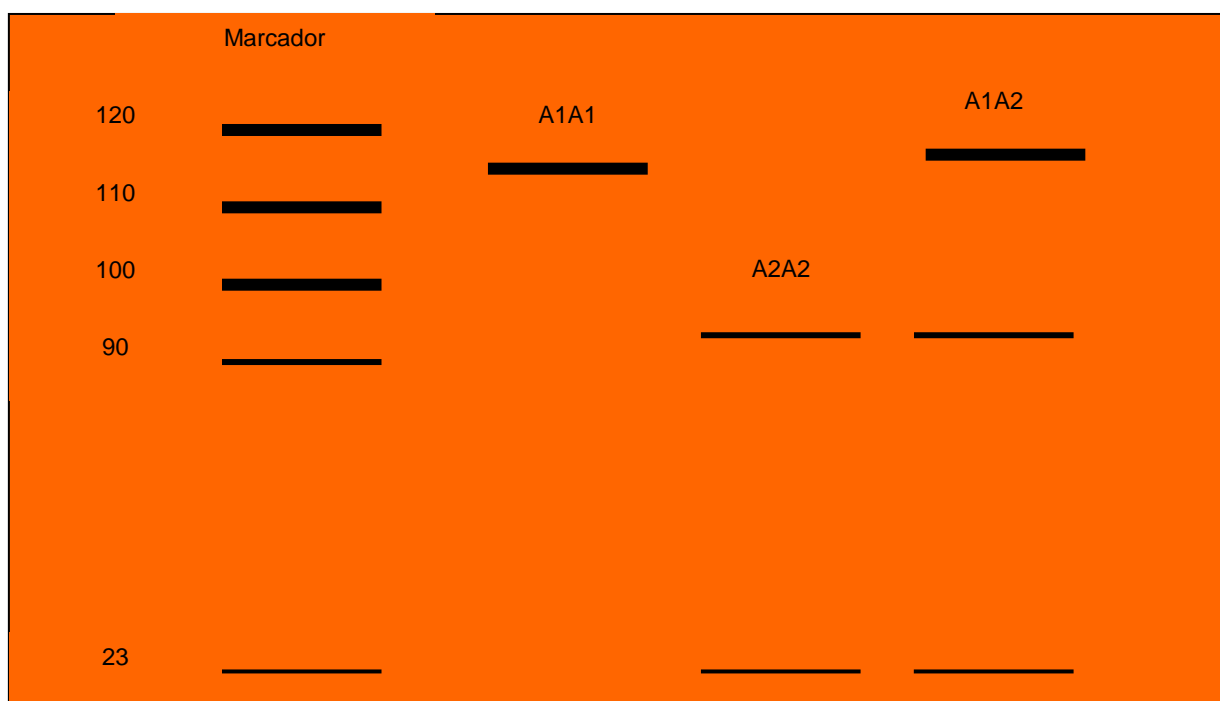


**Figura 5 - Esquema da visualização, em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio, dos fragmentos do gene da enzima MnSOD digeridos pela endonuclease de restrição Hae III, gerando os três genótipos possíveis**

Para o diagnóstico molecular do polimorfismo do CYP17, foi utilizada a técnica geral descrita em Heather *et al.* e Carey *et al.* (150). As amostras de DNA genômico foram obtidas conforme descrito anteriormente. A amplificação da região polimórfica do CYP17 foi feita por técnica de *polymerase chain reaction* (PCR), usando os primers: CYP-1, 5'GCCACAGCTCTTCTACTCCAG3', e CYP-2, 3'CCTTCTCTTGGGCCAAAACAAATA'. A reação de PCR foi realizada em alíquotas de 25- $\mu$ l, contendo 50 ng de DNA genômico, 50 pmol de cada primer, 1X reação tampão, 100  $\mu$ M desoxinucleotideo trifosfato, e uma unidade de Taq polimerase. A amplificação tem 30 ciclos com desnaturação de 94° C por um minuto, anelamento a

57° C por um minuto, e extensão a 72° C por um minuto. O primeiro passo é a desnaturação inicial de 5 minutos a 94° C e extensão final a 72° C por 5 minutos.

No tocante à digestão e visualização do polimorfismo, o produto do PCR foi digerido durante 3 horas a 37° C em banho-maria, a enzima de restrição usada foi a *HhaI* (*Haemophilus haemolyticus*). A visualização foi efetivada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio, a fim de identificar as bandas do amplicon com 118 pb dividido em fragmentos, identificando o tamanho destes e a associação com os alelos do polimorfismo, A1A1 com 118pb, A1A2 com 118pb, 95pb e 23pb, e A2A2 com 95pb e 23pb. Abaixo, encontra-se a representação da visualização (Figura 6).



**Figura 6 - Esquema representativo da visualização em gel de agarose 4%, dos fragmentos do gene da enzima CYP17 digeridos pela endonuclease HhaI, gerando os três genótipos possíveis**

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram plotados em planilha eletrônica EXCEL e estatisticamente analisados através de *software* SPSS versão 9.0.

O cálculo das freqüências alélicas e genóticas, e a comparação das mesmas entre os grupos foi feita, utilizando-se a fórmula de HARDY-WEINBERG (freqüência genotípica =  $p^2+2pq+q^2$  , freqüências gênicas, como  $p+q=1$ ) e o cálculo de desequilíbrio de ligação, avaliado através do teste não paramétrico de qui-quadrado. Com o qui-quadrado significativo, confirma-se a hipótese de associação genótipo-neoplasia. A partir daí, foi calculada a razão de chances (odd ratio – OR), que foi obtida através do cálculo da razão dos produtos cruzados (calculado em tabela 2X2)  $OR= ad/bc$ . No caso, o OR informa qual a chance de um indivíduo com um determinado alelo do SOD2 e/ou CYP17 possuir neoplasia prostática. Para exclusão de possíveis variáveis de confusão, que potencialmente falseariam os resultados, foi utilizada análise multifatorial de regressão logística, avaliando a possível associação entre neoplasia prostática e idade, perfil socioeconômico-cultural, etnia entre indivíduos com neoplasia (toque+PSA+biópsia) e sem neoplasia.

O modelo foi testado, inicialmente, agrupando-se todas as variáveis. Após, uma a uma das variáveis foram retiradas do modelo, e a significância da relação entre neoplasia e genótipo ou neoplasia e alelo foi observada. Caso houvesse modificação que tornasse a associação significativa ou não significativa entre neoplasia prostática maligna e genótipo/alelo, quando alguma variável fosse retirada do modelo de regressão, o resultado seria considerado independente ou dependente das variáveis testadas. O poder da amostra foi de 80%, e o p-alta considerado significativo, quando menor que 0,05.

## 4 RESULTADOS

Um total de 270 indivíduos foi incluído no presente estudo com uma idade média de  $65.45 \pm 7.94$  anos (mínimo = 50, máximo = 84). Desses, 169 (62.6%) participaram da análise das freqüências alélicas e genótípicas dos polimorfismos da SOD2 e 152 (56,3%) da CYP17, representando a população em geral, aleatória, com idade igual ou superior a 50 anos, independente de sexo e condição de saúde.

A análise das freqüências alélicas e genótípicas da população em geral é descrita na Tabela 1.

**Tabela 1 - Freqüências alélicas e genótípicas dos polimorfismos da SOD2 e CYP17 em uma amostra geral da população com idade  $\geq$  50 anos**

Gene	Alelos	n (%)	Genótipos	n (%)
SOD2	A	157 (46)	AA	31 (18.3)
	B	181 (54)	BB	43 (25.4)
			AB	95 (56.3)
CYP 17	A1	187 (63)	A1A1	57 (36.3)
	A2	111 (37)	A2A2	16 (10.7)
			A1A2	79 (53.0)

SOD2= superóxido dismutase dependente de manganês; CYP17= citocromo p450c 17 $\alpha$ ; n= tamanho da amostra;



Ao ser comparada com as freqüências genóticas esperadas para o polimorfismo da SOD2, a amostra populacional testada estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg, já que seria esperado uma freqüência dos genótipos AA=21%, BB=29% e AB=50%, e não houve diferenças significativas em relação às freqüências observadas.

Além disso, comparando com as freqüências genóticas esperadas para o polimorfismo da CYP 17, a amostra populacional testada também se apresentava em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Isso porque seria esperado uma freqüência dos genótipos A1A1=39%, A2A2=14% e A1A2=47% e não houve diferenças significativas em relação às freqüências observadas.

Dos demais 101 indivíduos, 54 (53.5%) eram afetados por câncer de próstata e 47 (46.5%) foram utilizados como grupo controle. Os indivíduos deste último grupo foram rastreados para câncer de próstata e não apresentaram alterações nos níveis de PSA e/ou exame de toque retal.

Uma vez que em quatro indivíduos do grupo afetado (7%) e em três indivíduos do grupo controle (6%) não foi possível a obtenção de todos os dados, os mesmos foram excluídos da análise. Em três indivíduos (5.55%) do grupo de afetados, somente foi possível a obtenção da genotipagem para SOD2, sendo os mesmos genotipados apenas para CYP17, resultando, então, em 50 casos e 44 controles, para genotipagem da SOD2, e 47 casos e 44 controles para genotipagem da CYP17 e para análise da interação gene-gene entre SOD2 e CYP17.

A idade média dos indivíduos afetados por câncer de próstata foi de  $66.47 \pm 8.01$ ; enquanto que a idade média do grupo controle foi de  $64.27 \pm 7.79$ , não havendo

diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $t=1.376$ ,  $p=0.172$ ), uma vez que foi feita correção para a idade no grupo controle em relação ao grupo afetado pelo câncer de próstata.

Os níveis de PSA entre os dois grupos, como se esperava, apresentaram diferenças significativas. O nível médio do PSA no grupo afetado foi de  $21.54 \pm 45.99$  ng/dL (mínimo=2.84, máximo= 285 ng/dL); enquanto que o nível médio do PSA no grupo controle foi de  $1.76 \pm 1.34$  ng/dL (mínimo=0.20, máximo=4.00 ng/dL) ( $t=2.81$ ,  $p=0.03$ ).

A comparação nas freqüências alélicas e genótípicas dos polimorfismos da SOD2 entre o grupo afetado por câncer de próstata e o grupo controle apresentou diferenças significativas. A Tabela 2 ilustra as freqüências alélicas e genótípicas encontradas nos dois grupos.

**Tabela 2 - Comparação entre as freqüências alélicas e genótípicas dos polimorfismos da SOD2 em indivíduos afetados e não afetados por câncer de próstata**

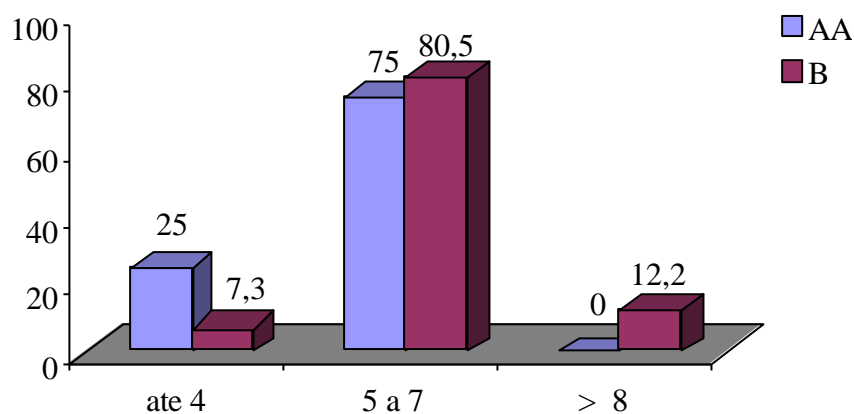
Grupo	Alelo A*	n (%)	Genótipos*	n (%)
Afetado	A	8 (16)	AA	8 (16)
	BB ou AB	42 (84)	BB	10 (20)
			AB	32 (64)
Controle	A	1 (2.3)	AA	1 (2.2)
	BB ou AB	43 (97.7)	BB	12 (26.7)
			AB	32 (71.1)

\*  $p < 0.05$

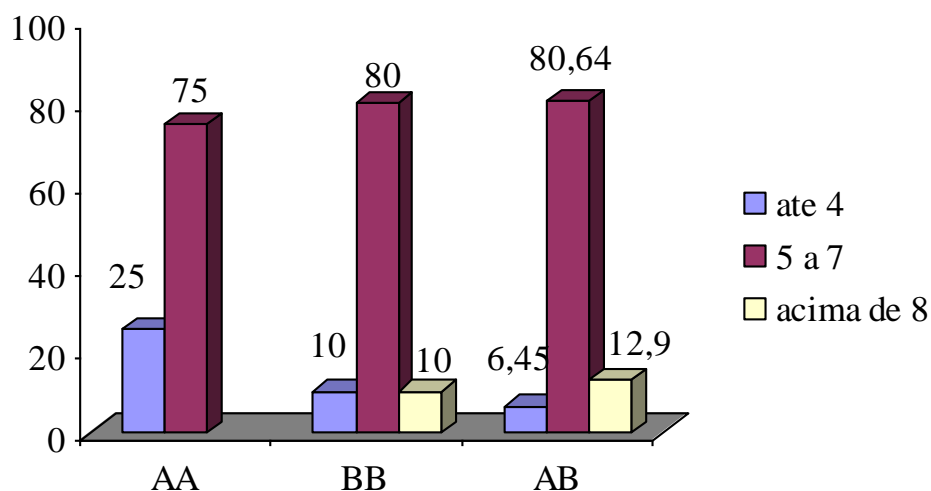
O grupo controle apresentou uma freqüência genotípica menor de indivíduos com o genótipo AA do que o grupo afetado ( $\chi^2=5.378$ ,  $p=0.04$ ). A comparação das freqüências alélicas entre os dois grupos mostrou um maior número de indivíduos com pelo menos um alelo B no grupo controle em relação ao grupo afetado por

câncer de próstata ( $\chi^2=5.860$ ,  $p=0.03$ ). O cálculo da razão de chance mostrou que portadores de pelo menos um alelo B teriam uma razão de chance de ter câncer de próstata de 0.86 (0.76-0.97). Neste caso, tal alelo estaria funcionando com um fator protetor.

A agressividade tumoral também foi avaliada entre os genótipos e alelos do polimorfismo da SOD2, não apresentando diferenças significativas (Figuras 7 e 8). Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre agressividade tumoral e diferentes genótipos da SOD2.



**Figura 7 - Comparação nos níveis de agressividade tumoral, pelo escore de Gleason, entre indivíduos afetados por câncer de próstata com dois alelos A e pelo menos um alelo B do polimorfismo da SOD2**



**Figura 8 - Comparação nos níveis de agressividade tumoral, pelo escore de Gleason, entre indivíduos afetados por câncer de próstata com diferentes genótipos do polimorfismo da SOD2**

A comparação nas freqüências alélicas e genóticas dos polimorfismos da CYP 17 entre o grupo afetado por câncer de próstata e o grupo controle também apresentou diferenças significativas. A Tabela 3 descreve as freqüências alélicas e genóticas encontradas nos dois grupos.

**Tabela 3 - Comparação entre as freqüências alélicas e genóticas dos polimorfismos da CYP17 em indivíduos afetados e não afetados por câncer de próstata**

Grupo	Alelos*	n (%)	Genótipos*	n (%)
Afetado	A1	12 (25.5)	A1A1	12 (25.5)
	A2A2 ou A1 A2	35 (74.5)	A2A2	4 (8.5)
			A1A2	31 (66.0)
Controle	A1	22 (50)	A1A1	22 (50)
	A2A2 ou A1 A2	22 (50)	A2A2	4 (9.1)
			A1A2	18 (40.9)

\* p<0.05

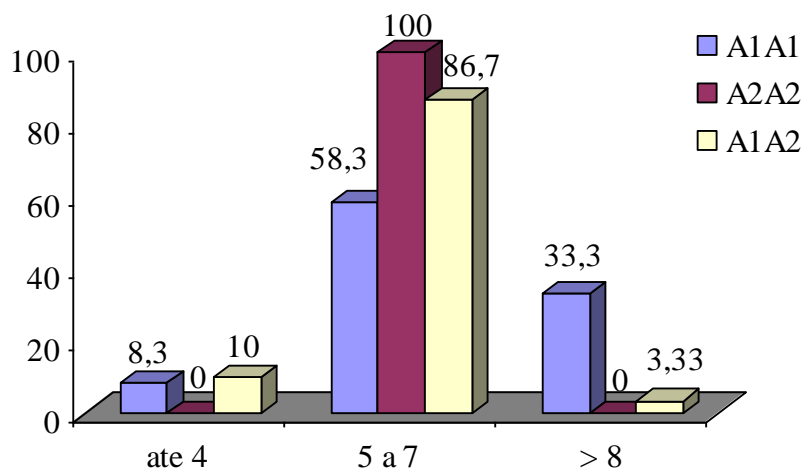
O grupo controle apresentou uma freqüência genotípica maior de indivíduos com o genótipo A1A1 em relação ao grupo afetado ( $\chi^2=6.298$ ,  $p=0.043$ ). A comparação das freqüências alélicas entre os dois grupos mostrou um maior número de indivíduos com o alelo A1 no grupo controle em relação ao grupo afetado por câncer de próstata. ( $\chi^2=4,815$   $p=0.02$ ). Os portadores do genótipo A1A1 apresentaram uma razão de chance menor de possuir câncer de próstata, que foi de 0.51 (0.28-0.90). Assim, tal genótipo também poderia estar funcionando com um fator protetor.

Para testar se a presença de um único alelo A2 poderia ser risco potencial para o desenvolvimento de neoplasia prostática, foi feita uma análise adicional comparando-se homens com e sem câncer de próstata, possuidores dos genótipos A1A1 e A1A2; ou seja, excluiu-se desta análise os indivíduos A2A2 com genótipos A2A2. Os resultados demonstraram uma associação significativa entre o porte de um alelo A2 e o aumento de freqüência de neoplasia prostática ( $\chi^2=6,367$ ,  $p=0,012$ ).

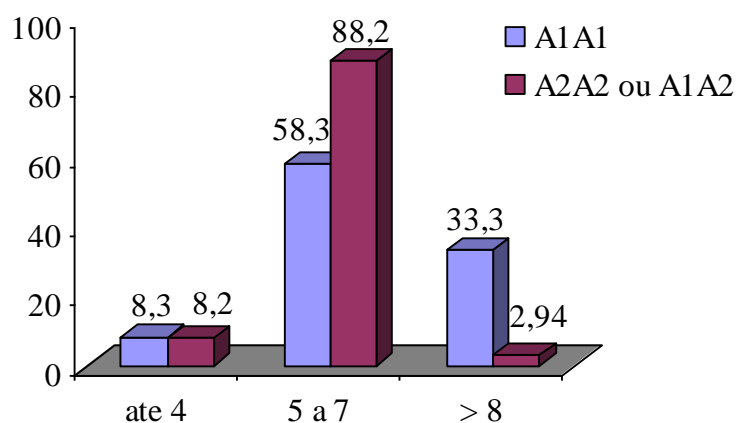
Neste estudo, 66% dos indivíduos do grupo afetado por câncer de próstata apresentavam genótipo A1A2, enquanto que somente 40,9% dos indivíduos do grupo controle possuíam tal genótipo. O cálculo da razão de chance para o desenvolvimento de câncer de próstata em indivíduos portadores de pelo menos um alelo A2 foi de 3,16 (1,27-7,87) vezes.

O inverso ocorreu nos indivíduos com genótipo A1A1. Apenas 25,5% dos portadores de neoplasia prostática apresentavam tal genótipo; enquanto que 50% dos que não eram afetados o possuíam.

A agressividade tumoral também foi avaliada entre os genótipos e alelos do polimorfismo da CYP17 (Figuras 9 e 10).



**Figura 9 - Comparação nos níveis de agressividade tumoral, pelo escore de Gleason, entre indivíduos afetados por câncer de próstata com diferentes genótipos do polimorfismo do CYP17**



**Figura 10 - Comparação nos níveis de agressividade tumoral, pelo escore de Gleason, entre indivíduos afetados por câncer de próstata com dois alelos A1 e pelo menos um alelo A2 do polimorfismo da CYP17**

A comparação da agressividade tumoral entre os genótipos do CYP 17 não mostrou diferença estatística, ainda que tenha ficado no limite da significância

( $\chi^2=8.479$ ,  $p=0.07$ ). Entretanto, quando a agressividade tumoral foi comparada entre indivíduos com genótipo A1A1 em relação aos demais genótipos, ocorreu significância estatística. Indivíduos com tal genótipo, afetados por câncer de próstata, apresentaram uma agressividade tumoral alta (escore de Gleason  $\geq 8$ ), como pode ser observado na Figura 8 ( $\chi^2=7.401$ ,  $p=0.02$ ).

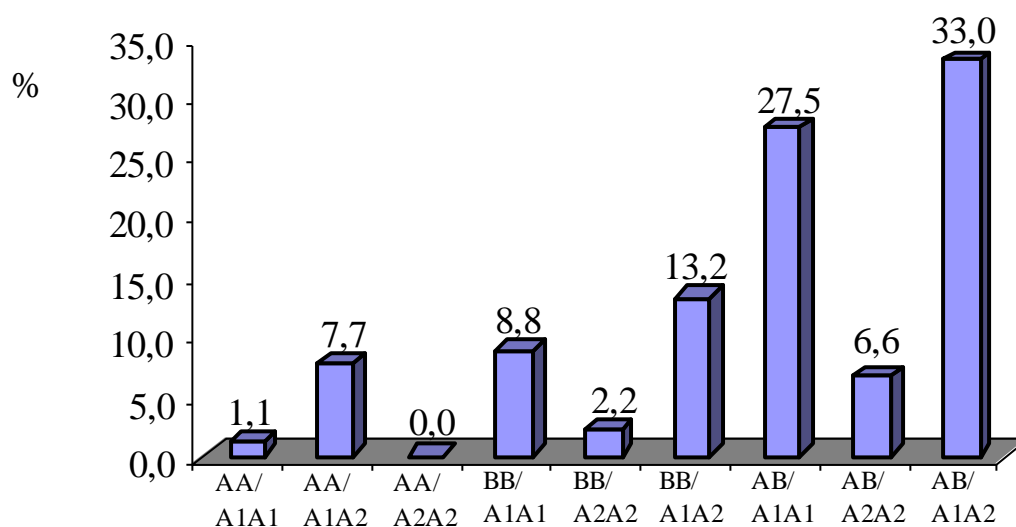
A análise da associação entre os polimorfismos da SOD2 e CYP17 com câncer de próstata, por regressão logística, foi significativa. Tal resultado demonstra que estes polimorfismos podem estar relacionados com as frequências desta neoplasia (Tabela 4).

**Tabela 4 - Regressão logística da associação entre os polimorfismos da SOD2 e CYP17 com câncer de próstata**

Variável	$\chi^2$	$p$	$R^2$
Cyp 17	5.358	0.0206	0.16
SOD2	4.515	0.0336	0.14
Idade	2.244	0.1341	0.04

$\chi^2$ = escore do teste qui-quadrado;  $p$ = nível de significância estatística;  $r^2$ = coeficiente de correlação. Graus de liberdade=1.

A fim de verificar as possíveis interações polimórficas existentes, as frequências genóticas combinadas dos dois polimorfismos foram calculadas na população aleatória e são apresentadas na Figura 11.

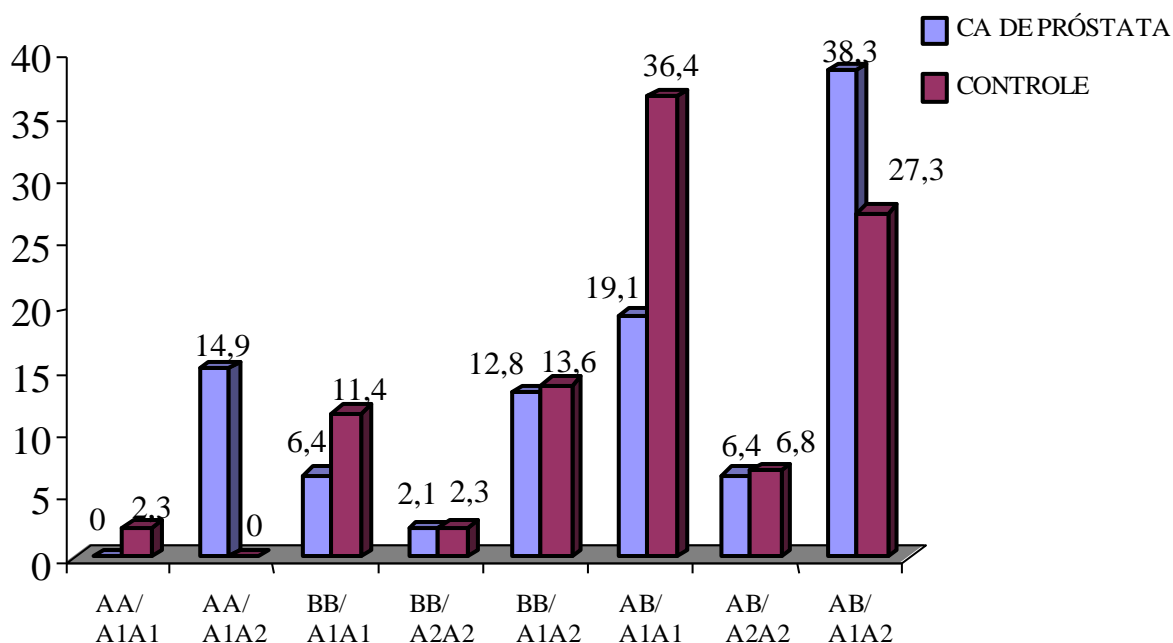


**Figura 11 - Frequências genóticas dos polimorfismos SOD2 e CYP17 na amostra investigada (população aleatória de Gravataí)**

A combinação genotípica menos freqüente (0%) foi a AA/A2A2 e a mais freqüente foi a AB/A1A2 (33.3%), seguida pela combinação AB/A1A1.

A análise da distribuição das freqüências das combinações genóticas dos polimorfismos da SOD2 e CYP17 entre os indivíduos afetados e não afetados por câncer de próstata são mostradas na Figura 12.



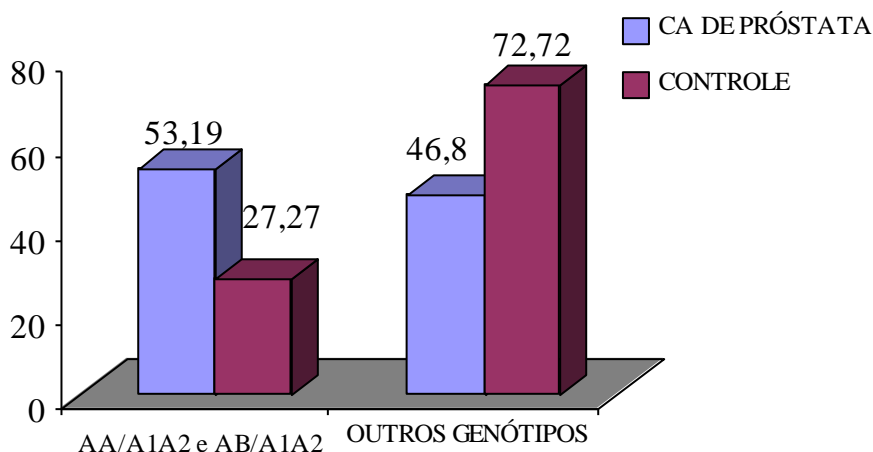


**Figura 12 - Distribuição das freqüências das combinações genótípicas dos polimorfismos da SOD2/CYP17 em indivíduos afetados e não afetados por câncer de próstata.**

Através da análise da Figura 12, é possível observar uma tendência de maior freqüência das seguintes combinações genótípicas no grupo afetado por câncer de próstata: AA/A1A2 e AB/A1A2. Por sua vez, as combinações genótípicas mais freqüentes no grupo controle foram: BB/A1A1 e AB/A1A1.

Para testar a força da interação entre estes genótipos específicos e sua associação com a neoplasia de próstata, duas análises adicionais foram feitas: a primeira, agrupando as combinações aqui denominadas de risco potencial (AA/A1A2 e AB/A1A2); e a segunda, agrupando as combinações genótípicas aqui denominadas de potencialmente protetoras (BB/A1A1 e AB/A1A1).

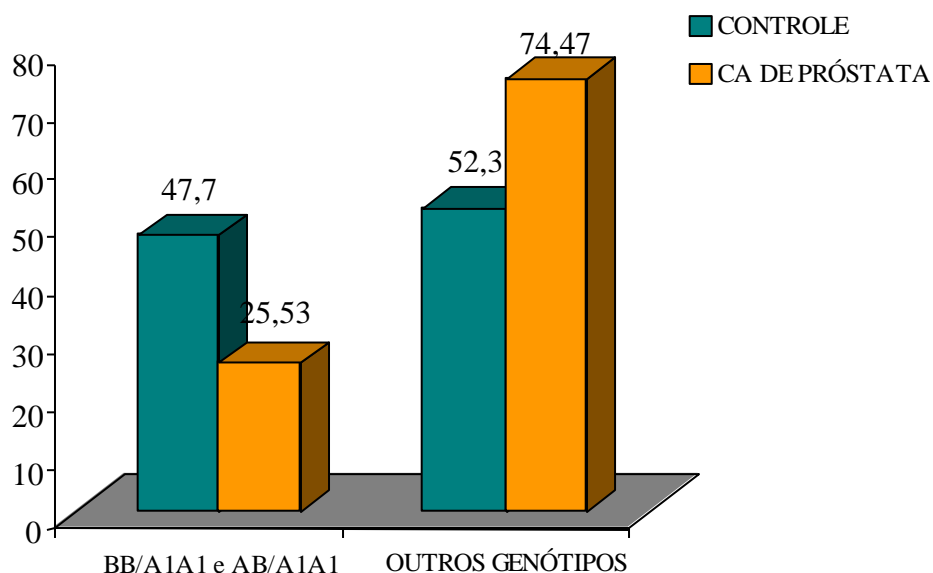
A análise estatística, comparando a distribuição de freqüências entre as combinações genóticas SOD2/CYP17 (AA/A1A2 e AB/A1A2) e as demais combinações, mostrou que as mesmas diferiram significativamente entre os grupos afetado e controle ( $\chi^2= 6.430$ ,  $p=0.01$ ) (Figura 13). No caso dos 47 indivíduos com câncer de próstata, 25 possuíam uma das duas combinações genóticas, enquanto que somente 12 dos 44 indivíduos controles apresentaram uma das duas combinações genóticas. A razão de chance de indivíduos com câncer de próstata apresentarem uma destas combinações genóticas foi de 3.03 (1.26-7.28) vezes maior em relação aos indivíduos do grupo controle.



**Figura 13 - Frequência da combinação dos genótipos SOD2/CYP17 AA/A1A2 e AB/A1A2 em indivíduos com e sem câncer de próstata**

Além disso, o estudo estatístico, o qual compara a distribuição de freqüências entre as combinações genóticas SOD2/CYP17, aqui denominadas potencialmente protetoras (BB/A1A1 e AB/A1A1), e as demais combinações, mostrou que as

mesmas também diferiram entre os grupos afetado e controle ( $\chi^2=4.88$ ,  $p=0.02$ ) (Figura 12). Nesta análise, dos 47 indivíduos com câncer de próstata, apenas 12 possuíam uma das duas combinações genóticas, enquanto que 21, dos 44 indivíduos controles, apresentaram tais combinações. A razão de chance de indivíduos sem câncer de próstata, grupo controle, apresentarem um das combinações genóticas foi 2.66 (1.10-6.44) vezes maior em relação aos indivíduos afetados por câncer de próstata.



**Figura 14 - Frequência da combinação dos genótipos SOD2/CYP17 (BB/A1A1 e AB/A1A1) em indivíduos com e sem câncer de próstata.**

Portanto, a análise das combinações dos polimorfismos dos genes da SOD2 e CYP17 indicou presença de associação entre essas e neoplasia prostática. Entretanto, tais interações genóticas foram diferenciais, podendo estar relacionadas tanto a uma maior, quanto a uma menor frequência de tal neoplasia.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo descreveu as freqüências alélicas e genóticas dos polimorfismos da SOD2 e CYP17, bem como a associação significativa destes polimorfismos com neoplasia prostática em indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos.

Para analisar as freqüências alélicas e genóticas dos polimorfismos da SOD2 e CYP17, uma amostra aleatória e não referenciada de indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos foi utilizada. Segundo revisão da literatura, os resultados quanto às freqüências alélicas e genóticas do gene da SOD2 são os primeiros a serem descritos para uma população brasileira.

Além da descrição das freqüências em uma população aleatória, foi feita uma outra abordagem, utilizando uma amostra controle, a qual foi comparada com outra, composta de indivíduos afetados por câncer de próstata. Tais amostras foram controladas para outros fatores que poderiam interferir nas freqüências genéticas obtidas, visto que existem descrições na literatura de associação dos polimorfismos

estudados com outras patologias, condição que poderia interferir nos resultados obtidos.

Assim, foi realizada a exclusão de indivíduos afetados por tais doenças. Entretanto, em que pese a amostra investigada ter sofrido uma redução, o que poderia representar um fator limitante neste estudo, foram encontradas diferenças estatísticas significativas, o que sugere que o tamanho amostral, ao fim diminuído, não tenha interferido de modo negativo.

A neoplasia prostática, tratando-se de doença multifatorial, beneficiar-se-ia, provavelmente, de um grupo controle mais uniforme, à medida que o mesmo tende a ser mais informativo e confiável, por apresentar uma menor chance de desvios de frequências genéticas causadas pela associação com outras patologias.

Atualmente, existem uma série de estudos teóricos e de discussão, quanto ao tamanho amostral que deve ser utilizado em estudos de caso-controle, envolvendo análise de marcadores genéticos. Muitos autores, inclusive, postulam que a estratificação da amostra em vários subgrupos populacionais poderia ser problemática e levar a um viés de interpretação dos resultados. Thomas & Witte, em um artigo recente, publicado na revista *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, discutem este tema e comentam ser tal tópico uma questão metodológica em aberto. Portanto, no presente estudo, apesar do número pequeno de indivíduos, a maior uniformidade da amostra pode ser considerada um aspecto positivo na validade dos resultados obtidos (156).

Vencidas as considerações preliminares sobre o delineamento do estudo, passa-se, a seguir, à abordagem dos principais achados referentes ao estudo realizado.

## 5.1 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DAS ENZIMAS SOD2 E CYP 17 EM UMA POPULAÇÃO ALEATÓRIA

Existem relativamente poucos estudos descrevendo frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da SOD2 e CYP17 na literatura nacional e internacional.

Concernente ao polimorfismo da SOD2, Van Landeghem *et al.* (111) realizaram uma metanálise das frequências genéticas dos polimorfismos da SOD2. Compararam as frequências em quatro diferentes populações: lituanos, finlandeses, suecos e chineses. A frequência genotípica AA foi maior nos finlandeses (35%) e muito pequena entre os chineses (1%). A população que apresentou uma frequência de AA mais próxima à observada em Gravataí, representada pela população aleatória (18,3%), foi a sueca (21%). Quanto à frequência do alelo A, a mesma variou entre 0.61 (finlandeses) a 0.30 (chineses). A amostra de Gravataí apresentou uma frequência (0.46) que também se aproximou às frequências do alelo A encontradas nos suecos (0.41).

Um outro estudo, realizado por Shimoda-Matsubayashi *et al.* (157) na população japonesa, descreveu uma frequência do alelo A de 12.3% em 140 japoneses sem relação parental. Tal valor foi cerca de 6% inferior ao observado na amostra aqui investigada.

Com exceção de estudos caso-controle, não foram encontradas na literatura, até o momento da redação deste estudo, relato de frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo da SOD2 para populações de outras etnias, como as africanas ou

latinas. Da mesma forma, relatos de tais freqüências em populações brasileiras não foram encontrados, possivelmente ainda não tendo sido descritos.

As freqüências alélicas e genotípicas da CYP17 foram previamente relatadas em população brasileira para o sexo masculino. Ribeiro *et al.* (158) estudaram amostras populacionais de duas cidades do interior do estado de São Paulo, Campinas e São José do Rio Preto. Em ambas amostras, não foi feito nenhum controle de neoplasias ou outras doenças. A amostra foi constituída de 82 indivíduos com idade média de  $39.0 \pm 9.1$  anos, em São José do Rio Preto, e 118 indivíduos com idade média de  $36.7 \pm 9.8$  na cidade de Campinas.

As freqüências genotípicas para A1A1 foram 43,2% em Campinas e 41,5% em São José do Rio Preto. Diferentemente, na amostra populacional aqui estudada, tal freqüência foi de 36,3%, sendo mais baixa que a relatada por Ribeiro *et al.* Já as freqüências para A2A2 observadas no presente estudo, 10,7%, foram mais próximas às descritas no estudo citado (11,9% em Campinas e 9,8% em São José do Rio Preto). Uma possível explicação para as diferenças nas freqüências necessariamente inclui: (1) diferenças étnicas que poderiam existir entre a população sulina e a do sudeste estudada; (2) a inclusão na amostra aqui investigada de indivíduos do sexo feminino; ainda que, teoricamente, as freqüências devessem ser as mesmas. Como existe descrição de associação entre o polimorfismo da CYP17 e câncer mama, muito freqüente no Rio Grande do Sul, não pode ser excluída a possibilidade de que tal fato possa exercer influência nas freqüências genéticas aqui estudadas na população aleatória, pois a mesma não excluiu qualquer tipo de patologia.

As informações obtidas na literatura sugerem que a amostra populacional investigada neste estudo apresenta, no caso do genótipo AA da SOD2, similaridades com determinados grupos étnicos europeus e, no caso da CYP17, com as frequências do genótipo A2A2 nas amostras de Campinas e São José do Rio Preto.

Questão importante a ser considerada, e que também poderia representar uma limitação no presente estudo, diz respeito ao tamanho amostral para a determinação das frequências genéticas populacionais. Apesar da amostra populacional aleatória aqui analisada ter sido relativamente pequena (n=169), uma série de estudos genéticos populacionais que envolvem descrição de frequências alélicas e genotípicas usam números próximos a 100 indivíduos (preferencialmente não menores de 100). No caso da metanálise realizada por Landeghem *et al.*, o tamanho amostral das populações investigadas variou de 135 (suecos) a 38 indivíduos (chineses). Dentro deste contexto, levando-se em conta a abordagem metodológica utilizada em genética populacional, acredita-se que as frequências genéticas descritas no presente estudo são representativas da população investigada.

## 5.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA SOD2 E NEOPLASIA PROSTÁTICA

Na segunda etapa do estudo, que envolveu investigação caso-controle da associação de neoplasia prostática e os polimorfismos da SOD2 e da CYP17, foi observada associação entre polimorfismos e câncer de próstata.

No que tange ao polimorfismo da SOD2, os resultados demonstraram uma diminuição na frequência do genótipo AA e do alelo A no grupo controle. Essa caiu



de uma frequência de 16% do genótipo AA, observada no grupo de afetados por câncer de próstata, e de 18% na amostra populacional para 2.3% no grupo controle.

Portanto, quando se comparou o grupo de indivíduos com neoplasia prostática e indivíduos da população aleatória (que foi utilizada para o cálculo das frequências do polimorfismo da SOD2 na população), a diferença de frequência do genótipo AA não foi estatisticamente significativa. Porém, quando o grupo de afetados e o grupo controle foram comparados, uma diferença extremamente significativa ocorreu.

Uma hipótese para tal achado pode estar relacionada ao uso dos critérios de inclusão dos indivíduos que compuseram o grupo controle. Além da exclusão de indivíduos com níveis de PSA maiores de 4 ng/ml e/ou toque retal suspeito de neoplasia, foram também excluídos indivíduos com doenças, cuja literatura descreve associação com polimorfismo da SOD2 estudado. É o caso de doenças, como o Parkinson (que é mais freqüente em indivíduos com idade superior a 60 anos) (157,159), esclerose lateral amiotrófica (160), cardiomiopatia idiopática dilatada (161), *diabetes mellitus* (162) e outras neoplasias como o câncer de mama (110,163,164).

As duas últimas patologias citadas, neoplasias e diabetes, são bastante prevalentes em indivíduos com idade igual ou superior a 50 anos. Na população gaúcha, um estudo epidemiológico realizado por 14 universidades sobre o perfil do idoso do Rio Grande do Sul, junto ao Conselho Estadual do Idoso (165), descreveu, a partir de auto-relato dos participantes, uma prevalência de 10.5% de diabéticos em indivíduos com idade igual ou superior a 60 anos. Na mesma população aleatória investigada, estudo prévio realizado por Flores (166) descreveu uma prevalência de 12.5% de diabéticos, diagnosticados por exames clínicos e bioquímicos. Quanto a

neoplasias em geral, o estudo no Rio Grande do Sul (165) demonstrou uma prevalência de 2.74% na população idosa, valor próximo ao também descrito por Flores (166) para a população aqui investigada (3.01%). Esses resultados corroboram a idéia de que tais doenças poderiam contribuir para o desvio das freqüências genéticas observadas entre o grupo controle e a população em geral (aleatória).

Considerando o somatório apenas destas duas últimas patologias, 18.5% da amostra foram excluídas da análise na seleção do grupo controle.

Portanto, a existência de um viés de seleção seria no sentido de que o controle de outras variáveis poderia mascarar os resultados obtidos. Como o grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis ou com doenças que não se manifestaram clinicamente ou que aparentemente não possuíam uma relação metabólica com o polimorfismo da SOD2, a diminuição nas freqüências alélicas e genotípicas, em relação à amostra populacional aleatória, poderia ser explicada.

Por conseqüência de tais fatores ou não, a questão é que, comparando indivíduos com idade e perfil geral similar, o grupo de indivíduos afetados apresentou uma freqüência do genótipo AA cerca de oito vezes maior do que o grupo controle, sugerindo uma provável associação entre esse genótipo e neoplasia prostática.

Existem relativamente poucos estudos de associação entre o polimorfismo da SOD2 e neoplasias, ainda que exista uma razoável quantidade de estudos, mostrando associação entre a expressão de enzimas antioxidantes, destacando-se

a SOD2, e neoplasias. Tais estudos têm levado autores como Bravard *et al* (167) a sugerirem que a SOD2 seria um gene de supressão tumoral.

Investigações sobre deleções genéticas em células transformadas ou células neoplásicas insinuam o envolvimento de genes de supressão tumoral na etiologia desta doença. Tem sido demonstrada uma diminuição na expressão da SOD2 em células transformadas e neoplásicas (168). Sugere-se que existiria uma cascata de eventos, onde a expressão da SOD2 estaria inversamente relacionada com a proliferação celular. O desbalanço regulatório deste gene, quer por mutações em genes regulatórios que influenciam a sua expressão, quer por mutações no próprio gene da SOD2, poderia desencadear eventos potencialmente neoplásicos (167).

No caso do polimorfismo investigado neste estudo, a alteração genética afeta o transporte da SOD2. A SOD2 é sintetizada no citoplasma celular e posteriormente modificada e transportada para a mitocôndria, onde tal enzima é biologicamente disponível, inativando a primeira forma de espécie reativa de oxigênio (ROS), que é o superóxido (157,169), conforme já descrito anteriormente.

Assim, indivíduos portadores de pelo menos um alelo A polimórfico apresentam um defeito no transporte da SOD2 do citoplasma para a mitocôndria. Tal alteração faz com que a mesma fique mais sujeita ao dano oxidativo realizado pelo superóxido, já que sua defesa antioxidante encontra-se defectiva em virtude da má distribuição celular da SOD2, que é produzida adequadamente no citoplasma, porém não é transportada de maneira eficiente para o interior da mitocôndria (170).

Esta diminuição da ação antioxidante da SOD mitocondrial (SOD2), caso não haja nenhum outro fator antioxidante exógeno atuando sobre os radicais livres

formados, leva ao acúmulo do radical superóxido, acarretando em aumento do dano oxidativo na mitocôndria. Esta organela possui um papel crucial no controle do ciclo celular e na manutenção da capacidade energética que garante a realização das funções celulares (110).

Estudos têm demonstrado que a depleção do DNA mitocondrial pode afetar fenótipos tumorigênicos de vários tipos de neoplasias, incluindo o câncer de próstata (171).

Desta maneira, pode-se dizer que tal polimorfismo genético que ocorre na SOD2 afeta sua expressão celular, diminuindo-a, já que fica com sua capacidade antioxidante prejudicada (110,170).

A adequada expressão da SOD2 diminui o fenótipo maligno de vários tipos de câncer, incluindo a neoplasia de mama (172,173), assim como aumenta a apoptose celular (174), ficando essas funções prejudicadas com a ocorrência do polimorfismo descrito. Tais alterações poderiam justificar o aumento da frequência de genótipos AA no grupo de indivíduos afetados, quando comparados aos controles, como foi aqui descrito.

Visto que tais indivíduos apresentam uma menor defesa antioxidante, ficando mais vulneráveis ao dano oxidativo, mutações de DNA tornam-se conseqüentemente mais frequentes, e uma maior incidência de neoplasias, dentre elas a prostática, pode ocorrer.

Até o momento da redação deste estudo, não foram encontrados estudos de associação entre o polimorfismo da SOD2 e câncer de próstata, sendo que o relato

preliminar dos resultados aqui obtidos foi aceito para apresentação no *98th Annual Meeting of the American Urological Association-AUA* (Anexo).

Embora estudos, demonstrando relação entre polimorfismo genético da SOD2 e neoplasia prostática, não tenham sido publicados, ao menos pelo que se sabe através de extensas buscas, estudos que analisam a expressão da SOD2 em neoplasias, incluindo a prostática, têm sido descritos. Oberley demonstrou, em um de seus trabalhos (173), uma baixa atividade (expressão) da SOD2 em células prostáticas neoplásicas. Xu e colaboradores demonstraram que alterações na expressão gênica podem diminuir a atividade desta enzima antioxidante (63). Em conjunto, tais dados levam a uma lógica de que alterações genéticas modificam mecanismos antioxidantes, predispondo ao aparecimento de neoplasia, tais como a prostática. Os resultados obtidos neste estudo corroboram para esta tese.

Conforme descrito anteriormente, os países escandinavos apresentam uma alta taxa de mortalidade por neoplasia prostática. A Noruega, por exemplo, apresenta uma taxa de mortalidade de 24/100.000, conforme já apresentado, taxa essa bem mais elevada que a média nacional brasileira, a qual é estimada em 9,14/100.000.

Porém, sabe-se que Porto Alegre é a capital brasileira com maior taxa de mortalidade por neoplasia prostática, 20,57/100.000, semelhante às taxas de mortalidade escandinavas, ao menos à norueguesa, de acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer, já apresentadas em outro capítulo da presente tese.

Dados sobre a distribuição nacional dos genótipos da SOD2 não são disponíveis até o momento. Entretanto, a análise dos genótipos dos 169 indivíduos, estudados como população aleatória, indica um perfil semelhante ao apresentado por Van

Landeghem (111), em um estudo com 135 indivíduos suecos, para o genótipo AA. A amostra aleatória do presente estudo, representativa por proximidade geográfica, hábitos alimentares e etnia, da população da capital gaúcha, demonstrou 18,3% de genótipos AA; enquanto que o estudo em suecos demonstrou 21% do mesmo genótipo.

Embora não seja possível a obtenção de dados nacionais sobre esta genotipagem para uma comparação com taxas de genótipo AA em outras regiões do país, a fim de estabelecer se estas taxas são mais elevadas no RS, levanta-se aqui uma hipótese de que uma maior frequência de genótipos AA poderia contribuir para o aumento da incidência e mortalidade por essa neoplasia nessa região. Entretanto, a fim de que se possa, efetivamente, averiguar a veracidade da referida hipótese, estudos posteriores são necessários.

Observando-se as frequências alélicas do alelo B nos grupos de afetados e controles, pode-se constatar que existiu uma maior ocorrência deste alelo no grupo controle. Tal fato, em um primeiro momento, poderia representar um possível papel protetor do alelo B em relação à neoplasia prostática. Porém, como em diversos estudos revisados, não foi demonstrada relação deste alelo com alterações da expressão da SOD2, tampouco foi demonstrado papel protetor algum de tal alelo em qualquer patologia, resultado que mais provavelmente representa, não uma maior frequência de alelo B no grupo controle, mas sim uma menor frequência do alelo A neste grupo, como já discutido anteriormente. De qualquer forma, atenção deve ser dada a tal fato em futuros estudos, a fim de melhor caracterizar se tais frequências do alelo B podem influenciar a neoplasia prostática de modo protetor.

Outro resultado estudado, quanto ao polimorfismo da SOD2, foi a relação entre o genótipo e agressividade tumoral. Não foi observada correlação significativa entre agressividade tumoral e qualquer dos genótipos da SOD2 estudados. Tal resultado sugere que o polimorfismo da SOD2 poderia estar envolvido no desencadeamento da transformação celular e posterior evolução para a neoplasia, mas não necessariamente no grau de agressividade do tumor, uma vez que a neoplasia esteja estabelecida no organismo.

Em síntese, tomando o conjunto dos resultados aqui obtidos, associados às evidências descritas na literatura sobre a associação de maior dano oxidativo com aumento de incidência de neoplasias, inclusive a prostática e polimorfismos da SOD2, diminuída sua capacidade antioxidante, pode-se concluir que: 1) os resultados demonstram uma maior freqüência de neoplasia prostática em indivíduos com genótipo AA para SOD2, quando comparados a grupos de afetados e controle; 2) os resultados apontam na mesma direção de trabalhos anteriores, reforçando a idéia de que o dano oxidativo exerce um importante papel no desenvolvimento da neoplasia prostática.

Embora a amostra populacional do presente trabalho ainda seja pequena, em se considerando os grupos de casos e controles, os resultados apresentados são encorajadores e podem, em futuro próximo, juntamente com outros estudos, demonstrar que a análise do polimorfismo da SOD2 pode servir como possível identificação de indivíduos de alto risco para o desenvolvimento de câncer de próstata, visando a novas políticas de prevenção para tal neoplasia.

### 5.3 ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO DO GENE DA ENZIMA CYP 17 E NEOPLASIA PROSTÁTICA

Como bem relatado nas últimas décadas, hormônios androgênicos desempenham um papel fundamental, embora ainda não bem esclarecido, na gênese e desenvolvimento da neoplasia prostática (142,143,148).

Referidos hormônios são regulados, tanto por fatores genéticos, quanto por ambientais (153).

Um polimorfismo no gene CYP17 tem sido apontado como possível fator de risco para o surgimento de neoplasia prostática, embora exista contradição quanto a qual alelo seria de risco: A1 ou A2 (153).

Foi relatado na literatura que portadores do alelo A2 possuem risco aumentado de calvície, se forem homens, e de ovários policísticos se forem mulheres, patologias essas ligadas aos hormônios sexuais (150).

A maioria dos trabalhos publicados aponta para o alelo A2 como sendo o possível alelo de risco para o desenvolvimento de neoplasia prostática (116,153,176). Sá e colaboradores, em um estudo inicial, reportaram uma maior ocorrência de neoplasia prostática entre portadores do alelo A2 (177). Entretanto, em um estudo de Habuchi e colaboradores, realizado em japoneses, uma associação foi encontrada entre o alelo A1 e maior frequência de câncer de próstata (112). Da mesma forma, Wadelius e colaboradores, em um estudo sueco, demonstraram associação entre genótipo A1A1 e maior ocorrência de neoplasia prostática (113).



O gene CYP17 regula a atividade da enzima Citocromo p450c17 $\alpha$ , a qual media a atividade tanto da 17 $\alpha$ -hidroxilase, quanto da 17,20-liase, funcionando como um passo fundamental na produção dos hormônios sexuais humanos (117).

Na rota da biosíntese da testosterona, a partir da molécula de colesterol, o primeiro passo é dado pela enzima CYP11A1, que degrada o colesterol em pregnenolona. A pregnenolona, por sua vez, é convertida em 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona e, posteriormente, em dehidroepiandrostenediona (DHEA), essa, por sua vez, precursora de testosterona, via enzima Citocromo p450c17 $\alpha$ , controlada geneticamente pelo gene CYP17 (153).

Gann e colaboradores demonstraram que taxas elevadas de testosterona, mesmo dentro dos limites de normalidade, constituem fator de risco para o desenvolvimento de câncer de próstata. Da mesma maneira, baixos níveis da proteína que se liga à testosterona, com conseqüente aumento da testosterona livre, porção ativa da mesma, aumentam os riscos de aparecimento dessa patologia (175).

Como a enzima controlada pelo CYP17 é uma das responsáveis pela biosíntese da testosterona, e esse hormônio tem uma relação estreita com a neoplasia prostática, o elo mais plausível e explorado, demonstrado em alguns estudos, é que os portadores do alelo de risco, mais provavelmente o A2, produziram uma quantidade maior de testosterona e, por esta razão, estariam mais propensos ao aparecimento de neoplasia prostática. Na esteira dessa hipótese, Haiman e colaboradores, da universidade de Harvard, estudaram prospectivamente mais de 1300 homens e não encontraram relação significativa entre ser portador do alelo A2 e níveis mais elevados de testosterona circulante (118), embora tenham encontrado

associação, mesmo que pequena, entre o alelo A2 e neoplasia prostática. Allen e colaboradores, da mesma maneira, não encontraram associação entre a presença do alelo A2 e um nível endógeno mais elevado de androgênios (178). Tais dados, em conjunto com outros mais, levam à hipótese de que a relação entre polimorfismo da CYP17 e câncer de próstata não se dê exclusivamente em razão direta com as concentrações de testosterona circulantes. Isso porque pode haver interações genético-ambientais e gene-gene, tanto com genes da rota da biosíntese e biodisponibilidade da testosterona, quanto com a interação com genes de outras rotas metabólicas, o que será abordado *a posteriori*.

Quando foram analisados os três possíveis genótipos em conjunto (A1A1, A2A2 e A1A2), os resultados obtidos não demonstraram uma maior incidência de neoplasia prostática em portadores do genótipo A2A2, quando comparados grupos controle e de afetados. Nestes termos, não houve, nesta pesquisa, relação entre o genótipo A2A2 e uma maior incidência de neoplasia prostática. Entretanto, quando uma análise adicional foi feita, comparando somente indivíduos A1A1 com indivíduos A1A2 (excluindo-se os indivíduos A2A2), os resultados foram diferentes e indicaram associação entre pelo menos um alelo A2 e câncer de próstata. Este resultado é explicado segundo o referencial teórico mendeliano de herança genética, que prevê a ocorrência de dominância de um alelo sobre o outro na manifestação de uma dada característica ou fenótipo. No caso apresentado, pareceria que a simples ocorrência de um alelo A2 já seria suficiente para aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de próstata. Entretanto, a presença de dois alelos A2 (A2A2), necessariamente, não aumentaria esse risco, a ponto de ser estatisticamente significativo. Assim, sugere-se que o polimorfismo A2 da CYP17 teria uma relação de dominância em relação ao A1 para a suscetibilidade ao câncer de próstata.

Em análise referente ao alelo A1, foi encontrada, neste estudo, uma maior frequência tanto desse alelo, quanto de genótipo A1A1 no grupo controle. Resultado semelhante foi demonstrado por Ye e Parry, porém relativo à neoplasia mamária, onde apresentaram um possível papel protetor do genótipo A1A1 contra esse tipo de neoplasma (179).

Com tais resultados, não descritos em estudos anteriores, relativamente à neoplasia prostática, pode-se levantar duas hipóteses. Em uma primeira análise, existe a possibilidade deste genótipo (A1A1) estar funcionando como fator protetor contra o aparecimento de câncer de próstata. Pode-se pensar em tal hipótese, na medida em que a razão de chance dos portadores do genótipo A1A1 desenvolverem neoplasia prostática foi de 0,51; ou seja, tal grupo apresentou aproximadamente a metade da frequência de câncer prostático, quando comparado a grupos com outros genótipos do CYP17. Da mesma maneira, pode-se levantar outra hipótese: a de que tal genótipo apresentou maior frequência no grupo controle, não por ser protetor contra a neoplasia prostática, mas pelo fato de indivíduos que apresentam pelo menos um alelo A2 serem mais suscetíveis a essa neoplasia.

A partir da análise da relação entre agressividade tumoral e polimorfismo da CYP17, restou demonstrada uma maior frequência de tumores de alto grau (Gleason  $\geq 8$ ) em portadores do genótipo A1A1. Em um estudo preliminar desse resultado, parece contraditório o fato de se encontrar um maior número de tumores mais agressivos no grupo de indivíduos portadores de um genótipo com possibilidade de ser, segundo os resultados obtidos, protetor contra neoplasia prostática. Porém, como se sabe, o câncer de próstata é uma doença multifatorial e, conforme alguns, de origem multigênica (180). Com isso, pode-se levantar a hipótese de que tais

indivíduos, portadores de neoplasia prostática e com genótipo A1A1, poderiam apresentar em sua genotipagem genes promotores de câncer de próstata de alto grau ainda não identificados, fazendo com que esta dita proteção conferida pelo genótipo A1A1 seja transposta, e a neoplasia se instale. Como o genótipo A1A1 conferiria uma proteção contra neoplasia prostática, somente em associação com genes agressivos é que se formaria tal neoplasma e aí, então, de alto grau. Essa hipótese é, até o dado momento, apenas uma especulação que explicaria, em parte, tal resultado. Porém, estudos posteriores podem elucidar de maneira mais definida tal questão.

Os resultados aqui encontrados, demonstrando uma provável interação entre o polimorfismo genético do gene da enzima CYP17 e neoplasia de próstata, seja o alelo A2, aumentando a frequência desta neoplasia, ou o genótipo A1A1, protegendo contra tal tipo de câncer, demonstram que tal polimorfismo pode representar um auxiliar em protocolos de prevenção contra neoplasma maligno da próstata, identificando indivíduos de alto risco para esta neoplasia bastante freqüente.

#### 5.4 INTERAÇÃO GENÉTICA ENTRE OS POLIMORFISMOS DOS GENES SOD2 E CYP17 E SUA ASSOCIAÇÃO COM NEOPLASIA PROSTÁTICA

Interações genéticas podem se processar de diversas formas, tais como interferindo de maneira a silenciar genes (metilação), potencializar atividades desses e outras diversas formas.

Alguns estudos, como o publicado por Xue e colaboradores, têm demonstrado uma possível origem multigênica da neoplasia prostática (180); ou seja, interações entre genes, no caso polimórficos, levando a um desfecho em comum (doença).

Como se sabe, os hormônios androgênicos desempenham um papel fundamental na gênese e progressão do neoplasma maligno da próstata, como já abordado anteriormente. Porém, os mecanismos pelos quais se processa tal relação não são bem compreendidos. A relação mais explorada é a de estimulação direta das células prostáticas pela testosterona. Porém, uma rota metabólica diferenciada tem sido proposta. Estudos como o de Ripple e colaboradores demonstram que os hormônios androgênicos aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a um maior dano oxidativo, o que, como já discutido anteriormente, aumenta a probabilidade de carcinogênese por mutações no DNA (181). Em um outro estudo, experimental, Ripple demonstra que hormônios androgênicos, em células de neoplasia prostática, aumentam consideravelmente o dano oxidativo (182). Sun e colaboradores evidenciaram que o antígeno prostático específico (PSA) estimula a geração de ROS em células tumorais prostáticas (183).

Não está bem definido de que forma a testosterona estimula a produção de ROS, aumentando assim o dano oxidativo. No estudo de Sun e colaboradores, é demonstrado que o PSA pode acelerar o dano oxidativo (183). Como se sabe que a testosterona estimula a produção de PSA, pode-se aventar que a resposta de aumento de ROS à testosterona seja mediada, ao menos parcialmente, pelo PSA (183).

A observação de tais dados - e levando-se em conta que o gene CYP17 é um dos responsáveis pela produção de hormônios androgênicos e que o gene da SOD2 é responsável pela expressão genética da primeira enzima antioxidante, que é a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD ou SOD2) – conduz à idéia de que uma interação entre tais genes resulte em um impacto significativo no

aparecimento de neoplasia prostática. Entretanto, não existem, até o momento, relatos de tal interação e sua relação com neoplasia de próstata.

O gene CYP17 regula a produção de hormônios androgênicos, que podem aumentar a produção de ROS, causando um maior dano oxidativo, como foi apresentado. O gene da SOD2 regula geneticamente a expressão de tal enzima, ou seja, polimorfismos nesse gene diminuem a capacidade antioxidante da SOD2, tornando as células e moléculas mais suscetíveis à ação das ROS. Desta maneira, também, um maior dano oxidativo ocorre.

Interação genética polimórfica destes genes pode resultar em aumento das ROS e diminuição da capacidade antioxidante da SOD2, ou seja, tal interação pode agir, aumentando os fatores agressores à célula (ROS) e diminuindo a capacidade de defesa antioxidante da mesma, podendo gerar, assim, um grande dano celular.

Neste estudo, quando analisados os resultados, pôde-se observar uma associação entre os alelos A da SOD2 e A2 da CYP17, quando combinados, aumentando a freqüência de neoplasia prostática. Associações entre o alelo A ou genótipo AA da SOD2 com o alelo A2 da CYP17 foram mais freqüentes no grupo de afetados pelo câncer de próstata, excetuando-se a associação AB/A2A2, onde a diferença não foi estatisticamente significativa. Desta maneira, uma interação SOD2/CYP17 do tipo A/A2 poderia aumentar significativamente o dano oxidativo e, conseqüentemente, a carcinogênese.

Um dado a ser discutido é o fato de não ter sido encontrado nenhum indivíduo com interação genotípica do tipo AA/A2A2, que representaria a interação de maior risco, tanto no grupo controle quanto no grupo de afetados. Tal fato pode se dever

exclusivamente ao efeito de tamanho amostral, pois genótipos homozigotos são menos freqüentes. Portanto, espera-se também uma menor freqüência de indivíduos duplamente homozigotos na população. Em contrapartida, outra especulação pode ser feita em torno deste resultado; a presença de duplos homozigotos não foi encontrada no grupo controle, pois tais indivíduos não apresentavam patologias associadas a tais genes. Embora, na análise de relação entre agressividade neoplásica e polimorfismos dos genes estudados, não tenha sido evidenciada associação significativa, quando analisados os genes isoladamente, exceto na relação tumor de alto grau e genótipo A1A1, tal fato pode ter ocorrido no caso da interação AA/A2A2. Na amostra estudada, 88,9% dos indivíduos do grupo dos afetados apresentavam, no momento do diagnóstico, neoplasia prostática órgão confinada, sendo candidatos a tratamento curativo. Tal fato pode ter contribuído para não se encontrar associação do tipo AA/A2A2 no grupo de casos, visto que essa interação poderia, em tese, aumentar a agressividade tumoral, fazendo com que esses indivíduos, no momento do diagnóstico, apresentassem doença avançada, já com disseminação extraprostática. Incorreria, então, este estudo em um viés de seleção do grupo dos casos.

Já em relação aos controles, onde também não foi observada a presença de duplos homozigotos, isso poderia ter ocorrido por ser tal grupo previamente selecionado para outras doenças associadas aos polimorfismos estudados. O referido fato deve ser esclarecido em estudos posteriores, comparando-se tais interações genéticas entre indivíduos com neoplasia prostática confinada e avançada.

Quando analisados dados referentes a interações do genótipo A1A1 da CYP17 com diversos genótipos da SOD2, reforça-se a idéia de que tal genótipo da CYP17 aja como protetor, visto que todas as associações de genótipos SOD2, inclusive AA, com o genótipo A1A1, foram mais freqüentes no grupo controle.

Na comparação da interação BB/A1A1 entre casos e controles, pôde-se observar uma freqüência 78,1% maior no grupo controle. Em análise da interação A1A1/AB, a diferença é mais evidente, sendo 90% mais freqüente no grupo controle.

Considerados os resultados encontrados e discutidos no estudo, sugere-se serem os polimorfismos genéticos da SOD2 e do CYP17, bem como a interação entre os mesmos, candidatos a marcadores de suscetibilidade do câncer de próstata na população investigada. Estudos complementares poderão indicar o quanto esses resultados poderão ter impacto na clínica urológica.



## CONCLUSÃO

O presente estudo representa a primeira descrição de freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene da enzima SOD2 em populações da América Latina. Da mesma forma, representa a primeira descrição de freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo do gene da enzima CYP17, em população do sul do país.

Os resultados obtidos, a partir da análise dos grupos de casos e controles, permitiram concluir que, em se analisando o polimorfismo da SOD2, o grupo de afetados apresentou o genótipo AA com uma freqüência de 7,2 vezes maior que o grupo controle, demonstrando uma significativa associação entre esse genótipo e a neoplasia prostática. De forma semelhante, o grupo controle apresentou uma concentração 14% maior de alelos B, quando comparados ao grupo de casos, sugerindo um eventual papel protetor desse alelo, em se tratando de câncer de próstata. Não foi demonstrada qualquer relação entre agressividade tumoral e qualquer dos alelos ou genótipo da SOD2.

Os mesmos resultados, levando-se em conta o polimorfismo do gene da enzima CYP17, demonstraram uma associação entre ser portador de pelo menos um alelo A2 e uma maior frequência de neoplasia protática.

Quando analisado o genótipo A1A1, observou-se que tal genótipo foi mais freqüente no grupo controle. Indivíduos com este genótipo apresentaram a metade da frequência de neoplasia prostática, quando comparados ao grupo de casos, demonstrando um provável papel protetor deste genótipo. Porém, quando os portadores de câncer de próstata apresentaram genótipo A1A1, uma maior taxa de tumores de alto grau de agressividade (escore de Gleason  $\geq 8$ ) foi encontrada.

A análise, através de regressão logística, da relação entre os polimorfismos de SOD2 e CYP17 e neoplasia prostática, demonstrou associação significativa de ambos os polimorfismos com essa neoplasia.

A apreciação estatística, visando à avaliação das interações genéticas entre SOD2 e CYP17 e a relação dessas com a neoplasia prostática, demonstrou que as combinações genótípicas do tipo AA/A1A2 e AB/A1A2 estavam associadas a uma maior frequência desta neoplasia. O que sugere que indivíduos com tais combinações genótípicas apresentem maior risco de serem acometidos por neoplasia da próstata.

Os indivíduos do grupo controle apresentaram uma maior frequência das interações genótípicas do tipo BB/A1A1 e AB/A1A1. Tais resultados sugerem que interações deste tipo possam conferir, a seus portadores, algum grau de proteção contra neoplasia prostática.

Os resultados, em conjunto, demonstraram haver uma significativa associação entre polimorfismos dos genes das enzimas SOD2 e CYP17, separadamente ou em conjunto, e neoplasia prostática maligna. Esse fato faz com que tais polimorfismos sejam vistos como possíveis marcadores de fatores de risco genéticos para câncer de próstata e possam, desta maneira, ser utilizados em novas políticas de prevenção para este tipo de neoplasia maligna da próstata.

## REFERÊNCIAS

1. Anuário estatístico do Brasil. Fundação IBGE, Rio de Janeiro; 1981.
2. Anuário estatístico do Brasil. Fundação IBGE, Rio de Janeiro; 1982.
3. Veras RP, Ramos RL, Kalache A. Crescimento da população idosa no Brasil: transformações e conseqüências na sociedade. Ver Saúde Pública, São Paulo 1987; 21:225.
4. Referência eletrônica da página oficial do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)
5. Chaimowicz, F. A saúde do idoso brasileiro às vésperas do século XXI: Problemas, projeções e alternativas. Rev. de Saúde Pública, 1997;31(2):184-200.
6. Azevedo AC. Isquemia miocárdica silenciosa. Arq Bras Cardiol 1988;51:61
7. Doll R. An epidemiological perspective on the biology of cancer. Cancer Res 1978; 38:3573.

8. Ershler WB, Yabro JW. Introduction: geriatric oncology relation to age. (editorial) *Semin Oncol* 1989; 16:1.
9. Satler LF, Green CE, Wallace RB, Rachley CE. Coronary artery disease in the elderly. *Am J Cardiol* 1989; 63:245.
10. Holmes FF. Clinical evidence for a change in tumor aggressiveness with age. *Semin Oncol* 1989; 16:34.
11. Miller DG. On the nature of susceptibility to cancer. *Cancer* 1980; 46:1307.
12. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics in 1992. *Cancer* 1992; 42:19-39.
13. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ. *Campbell's Urology* 8<sup>th</sup> Edition. Saunders New York, 2002.
14. Demers RY, Swanson GM, Weiss LK, Kau TY. Increasing incidence of cancer of the prostate. *Arch Intern Med* 1994;154:1211-1216.
15. Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics in 1995. *Cancer J Clin* 1995;45:8-3.
16. Hanley BF, Feuer EJ, Clegg LX et al: Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer incidence, mortality and survival rates. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1017.
17. Fleshner N, Fair WR, Huryk R, Heston WDW. Vitamin E inhibits the high fat diet promoted growth of established human prostate LNCaP tumors in nude mice. *J of Urol* 1999;161:1651.

18. Scardino PT, Weaver R, Hudson MA. Early detection of prostate cancer. *Human Pathol* 1992;23:211-22.

19. Referência eletrônica da página oficial do Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde em [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br).

20. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA : Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999;49:8

21. Srougi M, Simon SD. Câncer urológico. São Paulo, Platina, 1990.

22. Glover FE Jr., Coffey DS, Douglas LL. et al: The epidemiology of prostate cancer in Jamaica. *J Urol* 1998a;159:1984.

23. Osegbe DN: Prostate cancer in Nigerians: Facts and nonfacts . *J Urol* 1997;157:1340. In: Campbell 2002.

24. Shimizu H, Ross RK, Bernstein L et. al. Cancer of the prostate and breast among japanese and white immigrants in Los Angeles county. *Br J Cancer* 1991;63:963. In: Campbell's Urology 8<sup>th</sup>. Ed. 2002.

25. Muir CS, Nectoux J, Staszewski J: The epidemiology of prostate cancer. Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol.* 1991;30:133.

26. Griffiths A J F, Miller J H, Suzuki D T, Lewontin R C, Gelbart W M. Introdução à Genética. 6<sup>o</sup> Edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1996. 856p.

27. Referência eletrônica da página oficial do National Cancer Institute dos Estados Unidos da América em [ww.nci.nih.gov](http://ww.nci.nih.gov).

28. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194:23-8.
29. Costa LFT. Return of de-differentiation: why cancer is a developmental disease. *Curr Opin Oncol* 2001;13:58-62.
30. Strachan T, Read A P. *Genética do Câncer*. In: Strachan T, Read A P (eds). *Genética Molecular Humana 2º edição*, Artmed. Porto Alegre, 2002. 427-444.
31. Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, Reichardt JKV, Yu MC, Feigelson H, Stanczyk FZ, Kolonel LN, Henderson BE. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Research* 1998;58:4497-4504.
32. Referência eletrônica da página oficial do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nova Iorque, Estados Unidos da América em [www.mskcc.org](http://www.mskcc.org).
33. Pienta KJ, Esper PS. Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med* 1993;118:793-802.
34. Carter BS, Bova GS, Beaty TH. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol* 1993;150:797.
35. Carter BS, Steinberg GD, Beaty TH. Familial risk factors for prostate cancer. *Cancer Surv* 1991;11:5.
36. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3367.
37. Walsh PC. *Campbell's Urology 7<sup>th</sup>. Edition*. Saunders-New York, 1998.

38. Fair WR, Fleshner NE, Heston W: Cancer of the prostate: A nutritional disease? *Urology* 1997,50(6):840-8.
39. Staszewski W, Haenszel W: Cancer mortality among Polish born in the United States. *J Natl Cancer Institute* 35:291-7,1965.
40. Armstrong B, Doll R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. *Int J Cancer* 15:617-31, 1975.
41. Sociedade Brasileira de Urologia. I Consenso Brasileiro sobre Câncer de Próstata. São Paulo, maio de 1998.
42. Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willet WC : A prospective study of tomato products, Lycopene and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* Mar 2002, 94(5) 391-8.
43. Yoshizawa K, Willet WC, Morris SJ, Stampfer MJ, Spigelman D, Rimm EB, Giovannucci E. Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* Aug 1998 90(16) 1219-24.
44. Tymchuk CN, Barnard RJ, Heber D, Aronson WJ. Evidence of an inhibitory effect of diet and exercise on prostate cancer cell growth. *J Urol* Sep 2001;166:1185-9.
45. Fair W. Back to the future-the role of complementary medicine in urology. *J Urol* 1999;162:411-20.
46. Breslow N, Chan CW, Dhom G: Latent carcinoma of the prostate of autopsy in seven areas. *Int J Cancer*, 20:680, 1977.



47. Sark W, Aas G, Cassin B, Pontes J, Crissman J: The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. *J Urol*, 20:680, 1993.
48. Fair W, Snowdon DA, Philips RL: Diet, obesity and risk of fatal prostate cancer. *Amer J Epidemiol* 120:244, 1984.
49. Clinton SK, Palmer SS, Springgs CE, Visek WJ. Growth of Duning transplantable prostate adenocarcinomas in rats fed diets with various fat contents. *J Nutr* 1998;118:908.
50. Giovanucci E, Rimm EB, Colditz GA: A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993<sup>a</sup>;85:1571.
51. LeMarchand L, Kolonel LN, Wilkens LR: Animal fat consumption and prostate cancer: A prospective study in Hawaii. *Epidemiology* 1994;5:276.
52. Marzo AM, Coffey DS, Nelson WG. New concepts in tissue specificity for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urology* 1999;53 (Suppl 3A):29-40.
53. Veierod MB, Laake P, Thelle DS. Dietary fat intake and the risk of prostate cancer: A prospective study of 25.708 Norwegian men. *Int J cancer* 1997;73:634.
54. Zhou JR, Blackburn GL. Brindging animal and human studies: What are the missing segments in dietary fat and prostate cancer? *Am J Clin Nutr* 1997;66:1572S.
55. Hirayama T. Epidemiology of prostate cancer with special reference to the role of diet. *Natl Cancer Inst Monogr* 1979;53:149-55.
56. Anderson SO, Wolk A, Bergstrom R. Energy, nutrient intake and prostate cancer risk: A population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer* 1996;68:716.

57. Hsing AW, McLaughlin JK, Schuman LM. Diet, tobacco use and fatal prostate cancer: results from the Lutheran Brotherhood cohort study. *Cancer Res* 1990;50:6836-40.
58. Carroll KK, Khor HT. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Prog Biochem Pharmacol* 1975; 10:308.
59. Fleshner NE, Klotz LH. Diet, androgens, oxidative stress and prostate cancer susceptibility. *Cancer Metastasis Rev* 1998-99;17(4):325-30.
60. Hill P, Wynder EL, Garbaczewski L. Diet and urinary steroids in black and white north american men and black south african men. *Cancer Res* 1979;39:5101.
61. Hamalainen E, Aldercreutz H, Puska P, Pietin P. Diet and serum sex hormones in healthy men. *J Steroid Biochem* 1984;20:459-64.
62. Hietanen E, Bartsch H, Bereziat JC, Camus AM, McClinton S, Eremin O, et al. Diet and oxidative stress in breast, colon and prostate cancer patients: a case-control study. *Eur J Clin Nutr* 1994 Aug;48(8):575-86.
63. Xu Y, Krishnan A, Wan XS, Majima H, Yeh CC, Ludewig G, et al. Mutations in the promoter reveal a cause for the reduced expression of the human manganese superoxide dismutase gene in cancer cells. *Oncogene* 1999;18(1):93-102.
64. Biri H, Ozturk HS, Kacmaz M, Karaca K, Tokucoglu H, Durak I, Activities of DNA turnover and free radical metabolizing enzymes in cancerous human prostate tissue. *Cancer Invest* 1999;17(5):314-19.

65. Wang Z, Zheng R, Fu S, Chen Y, Duan G, Qin D, et al. Role of superoxide anion on the proliferation and c-Has-ras or p53 expression in prostate cancer cell line PC3. *Urol Res* 1998;26(5):349-53.
66. Li N, Oberley TD, Oberley LW, Zhong W. Overexpression on manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. *Prostate* 1998;35(3):221-33.
67. Fleshner NE, Kucuk O. Antioxidant dietary supplements: rationale and current status as chemopreventive agents for prostate cancer. *Urology* 2001;57(4A):90-4.
68. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994;344:721-24.
69. Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:414.
70. Giovannucci E, Rimm EB, Wolk A. Calcium and fructose intake in relation to prostate cancer. *Cancer Res* 1998;58:442.
71. Gann PH, Ma J, Giovannucci E, Willet W, Sacks FM, Hennekens CH, Stampfer MJ. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: Results of a prospective analysis. *Cancer Res* 1999;59,1225-30.
72. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC. Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(23):1767-76.

73. Chen L, Sapuntzakis MS, Duncan C, Sharifi R, Ghosh Luna, van Breemen R, Ashton D, Bowen PE. Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1872-9.
74. Matlaga BR, Hall MC, Stindt D, Torti FM. Response of hormone refractory prostate cancer to lycopene. *J Urol* 2001;166:613.
75. Shamberger RJ, Tytko SA, Willis CE. Antioxidants and cancer. Part IV. Selenium and age-adjusted human cancer mortality. *Arch Environ Health* 1976;31:231-5.
76. Van der Brandt PA, Goldbohm RA, van't Veer P. A prospective cohort study on toenail selenium levels and risk of gastrointestinal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:224.
77. Clark LC, Combs Jr. GF, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional prevention of cancer study group. [published erratum appears in *JAMA* 1997;277:1520]. *JAMA* 1996;276:1957-63].
78. Brooks JD, Metter EJ, Chan DW, Sokoll LJ, Landis P, Nelson WG, Muller D, Andres R, Carter HB. Plasma selenium level before diagnosis and the risk of prostate cancer development. *J Urol* 2001;166:2034-8.
79. The alfa-tocoferol BCCPSG: The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New Engl J Med* 1994;330:1029.

80. Skowronski RJ, Peehl DM, Feldman D. Vitamin D and prostate cancer: 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptors and actions in human prostate cancer cells lines. *Endocrinology* 1993;132:1952.
81. Getzenberg RH, Light BW, Lapco PE. Vitamin D inhibition of prostate adenocarcinoma growth and metastasis in the Dunning rat prostate model system. *Urology* 1997;50:999.
82. Kennedy AR. The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J Nutr* 1995;125:733S-43S.
83. Barnes S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr* 1995;125:777S-83S.
84. Peterson G, Barnes S. Genistein and biochanin A inhibit the growth of prostate cancer cells, but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. *Prostate* 1993;22:335-45.
85. Aldercreutz H, Markkannen H, Watanabe S. Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet* 1993;339:1209-10.
86. Onozawa M, Fukuda K, Ohtani M, Akaza H, Sugimura T, Wakabayashi K. Effects of soybean isoflavones on cell growth and apoptosis of the Human Prostatic cancer cell line LNCaP. *Japanese J Clin Oncol* 1998;28(6):360-3.
87. Campbell MF. *Principles of Urology*. WB Saunders Company. Philadelphia, 1957.
88. Pienta KJ. Etiology, epidemiology and prevention of carcinoma of the prostate. In: *Campbell's Urology* 7<sup>th</sup> Ed. 1998, 2489:2496.

89. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: Results of a multicenter clinical trial of 6630 men. *J Urol* 1994b;151:1283.
90. Petricoin EF, Ornstein DK, Pauzeletz CP, Ardekali A, Hackett PS, Hitt BA, Velasco A, Trucco C, Wiegand L, Wood K, Simone CB, Leure PJ, Linehan WM, Ennert-Buck MR, Steinberg SM, Kohn EC, Liotta LA. Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;90:1576-8.
91. Houston TP, Elster AB, Davis RM, Deitchman SD. The US preventive services task force guide to clinical preventive services, 2<sup>nd</sup>. Ed. AMA council on scientific affairs. *Am J Prev Med* 1998;14:374.
92. Smith RA, Mettlin CJ, Davis KJ, Eyre H. American cancer society guidelines for early detection of cancer. *CA Cancer J Clin* 2000;50:34.
93. Thompson I, Carroll P, Coley C. Prostate specific antigen (PSA) best practice policy. American Urological Association. *Oncology* 2000;14:267.
94. Gann PH. Interpreting trends in prostate cancer incidence and mortality. *Epidemiology* 1997;8:117.
95. Tarone RE, Chu KC, Brawley OW. Implications of stage-specific survival rates in assessing recent declines in prostate cancer mortality rates. *Epidemiology* 2000;11:167.
96. Jewett HJ. Significance of palpable prostatic nodules. *JAMA* 1956;160:838-9.

97. Wasson JH, Cushman CC, Bruskewitz RC. A structured literature review of treatment for localized prostate cancer. *Arch Fam Med* 1993;2:487-93.
98. Adolfsson J, Steineck G, Withmore WF. Recent results of management of palpable clinically localized prostate cancer. *Cancer* 1993;72(2):310-22.
99. Ragde H, Blasko JC, Grimm PO. Interstitial iodine-125 radiation without adjuvant therapy in the treatment of clinically localized prostate carcinoma. *Cancer* 1997;80(3):442-53.
100. Chodak CW, Thisted RA, Gerber GS. Results of conservative management of clinically localized prostate cancer. *New Engl J Med* 1994;330(4):242-8.
101. Whitmore WF. Expectant management of clinically localized prostate cancer. *Seminars in oncology* 1994;21(5):560-8.
102. Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica Ilustrada 2ª Edição*-Porto Alegre, Artes Médicas 1996.
103. Quinones L, Berthou F, Varela N, Simon B, Gil L, Lucas D. Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphism between french caucasian and chilean populations. *Cancer Lett* 1999;141(1-2):167-71.
104. Kamataki T, Nunoya K, Sakai Y, Kushida H, Fujita K. Genetic polymorphism of CYP2A6 in relation to cancer. *Mutat Res* 1999;428(1-2):125-30.
105. Gomez-Coronado D, Alvarez JJ, Entrala A, Olmos JM, Herrera E, Lasuncion MA. Apolipoprotein E polymorphism in men and women from spanish population:

allele frequencies and influence on plasma lipids and apolipoproteins.

*Atherosclerosis* 1999;147(1):167-76.

106. Wang XL, Duarte N, Cai H, Adachi T, Sim AS, Cranney G, et al. Relationship between total plasma homocysteine, polymorphism of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. *Atherosclerosis* 1999;146(1):133-40.

107. Mikkelsen J, Perola M, Kauppila LI, Laippala P, Savolainen V, Pajarinen J, et al. The GPIIIa P19A polymorphism in the progression of abdominal aortic atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1999;147(1):55-60.

108. Alenti K, Aveyrier E, Leaute S, Laporte F, Hadjian AJ. Contribution of apolipoprotein(a) size, pentanucleotide TTTTA repeat and C/T(+93) polymorphism of the apo(a) gene to regulation of lipoprotein(a) plasma levels in a population of young European Caucasians. *Atherosclerosis* 1999;147(1):17-24.

109. Offenbacher M, Bondy B, de Jonge S, Glatzeder K, Kruger M, Schoeps P, et al. Possible association of fibromyalgia with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Arthritis Rheum* 1999;42(11):2482-88.

110. Ambrosone CB, Freudenheim JL, Thompson PA, Bowman E, Vepa JE, Marshall JR, et al. Manganese superoxide dismutase (MnSOD) genetic polymorphisms, dietary antioxidants, and risk of breast cancer. *Cancer Res* 1999 Feb;59:602-606.

111. Van Landeghem GF, Tabatabaie P, Kucinkas V, Saha N, Beckman G. Ethnic variation in the mitochondrial targeting sequence polymorphism of MnSOD. *Hum Hered* 1999;49(4):190-93.



112. Habuchi T, Liqing Z, Suzuki T, Sasaki R, Tsuchiya N, Tachiki H, Shimoda N, Satoh S, Sato K, Kakehi Y, Kamoto T, Ogawa O, Kato T. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with a CYP17 gene polymorphism with a gene dosage effect. *Cancer Research* 2000; 60:5710-3.
113. Wadelius M, Andersson AO, Johansson JE, Wadelius C, Rane E. Prostate cancer associated with CYP17 genotype. *Pharmacogenetics* 1999;9(5):635-9.
114. Haiman CA, Hankinson SE, Colditz GA, Hunter DJ, De Vito I. A polymorphism in CYP17 and endometrial cancer risk. *Cancer Research* 2001;61(10):3955-60.
115. 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):1727-31.
116. 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):683-6.
117. Chang B, Zheng SL, Isaacs SD, Wiley KE, Carpten JD, Hawkins GA, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J. Linkage and association of CYP17 gene in hereditary and sporadic prostate cancer. *Int J Cancer* 2001;95(6):354-9.

118. Haiman CA, Stampfer MJ, Giovannucci E, Ma J, Decalo NE, Kantoff PW, Hunter DJ. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(7):743-8 .
119. Bradford RW, Allen HW, Culbert ML. *Oxidology-The study of reactive oxygen toxic species and their metabolism in health and disease*. Published by The Robert W Bradford Foundation, Los Altos, California 1985.
120. Olszewer EK, Flam S, Ellovitch. *Radicais Livres em cardiologia: Isquemia e Reperfusão*. São Paulo: Tecnopress 1997.
121. Li S, Yan T, Yang JQ, Oberley TD, Oberley LW. The role of celular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Research* 2000;60:3927-9.
122. Halliwell B. Antioxidant defence mechanism: from beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31(4):261-72.
123. Hayflick L. *Como e por que envelhecemos*. Trad. Ana Beatriz Rodrigues e Priscilla Marins Celeste. Rio de Janeiro: Ed. Campus. 1996.
124. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996;334:1156-62.
125. Schwenke DC, Behr SR. Vitamin E combined with Selenium inhibits atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits independently of effects on plasma cholesterol concentrations. *Circ Res* 1998;83:366-77.

126. Meydani M, Lipman RD, Han SN, Wu D, Beharka A, Martin KR, et al. The effect of long-term dietary supplementation with antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* 1998 Nov;854:352-60.
127. Klipstein-Grobush K, Geleijnse J, den Breeijen JH, Boieng H, Hofman A, Grobbee DE, et al. Dietary antioxidant and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr* 1999;69:261-66.
128. Zou JG, Huang YZ, Chen Q, Wei EH, Hsieh TC, Wu JM. Resveratrol inhibits copper ion-induced and azo compound-initiated oxidative modification of human low density lipoprotein. *Biochem Mol Biol Int* 1999 Jun;47(6):1089-96.
129. Panssarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Felzani G, Marzatico F. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 1999;27(5-6):617-22.
130. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, et al. Cytine methylation of regulatory sequences near the pi class glutathione s-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:11733-37.
131. Isaacs WB, Bova GS, Morton RA, et al. Molecular genetics and chromosomal alterations in prostate cancer. *Cancer* 1995;75:2004-12.
132. Kong Q, Lillehei KO. Antioxidant inhibitors for cancer therapy. *Med Hypotheses* 1998;51(5):405-09.
133. Malins DC, Polissar NL, Gunselman SJ. Models of DNA structure achieve almost perfect discrimination between normal prostate, benign prostatic hyperplasia

(BPH), and adenocarcinoma and have a high potential for predicting BPH and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(1):259-64.

134. Olinski R, Zastawny TH, Foksinski M, Barecki A, Dizdaroglu M. DNA base modifications and antioxidant activities in human benign prostatic hyperplasia. *Free Radic Biol Med* 1995;18(4):807-13.

135. Menon M, Maramag C, Malhotra RK, Seethalakshmi L. Effect of vitamin C on androgen independent prostate cancer cells (PC3 and Mat-Ly-Lu) in vitro: involvement of reactive oxygen species-effect on cell number, viability and DNA synthesis. *Cancer Biochem Biophys* 1998;16(1-2):17-30.

136. Gionannucci E. Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and the risk of cancer. *Horm Res* 1999;51 Suppl S3:34-41.

137. Li N, Zhai Y, Oberley TD. Two distinct mechanisms for inhibition of cell growth in human prostate carcinoma cells with antioxidant enzyme imbalance. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(11-12):1554-68.

138. Trybus TM, Burgess AC, Kirk JW, Glover TW, Macoska JA. Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer.

139. Wakabayashi T. Structural changes of mitochondria related to apoptosis: swelling and megamitochondria formation. *Acta Biochim Pol* 1999;46(2):223-37.

140. Nomura K, Imai H, Koumura T, Arai M, Nakagawa Y. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* 1999; 274(41):29294-302.

141. Berard M, Mondiere P, Casamayor-Palleja M, Hennino A, Bella C, Defrance T. Mitochondria connects the antigen receptor to effector during B cell receptor-induced apoptosis in normal human B cells. *J Immunol* 1999;163(9):4655-62.
142. Huggins C, Stevens RE, Hodges CV. Studies on prostatic cancer. II-Effect of castration on advanced carcinoma of the prostate. *Arch surg* 1941;43:209.
143. Huggins C, Hodges CV. Studies on prostate cancer: effect of castration, of estrogen, and of androgen injections on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1941;1:293-7.
144. Hoffman MA, DeWolf WC, Morgentaler A. Is low serum free testosterone a marker for high grade prostate cancer? *J Urol* 2000;163:824-7.
145. Pretson-Martin S, Pike MC, Ross RK, Henderson BE. Epidemiologic evidence for the increased cell proliferation model of carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1993;101(Suppl. 5):137-8.
146. Ross R, Bernstein L, Judd H. Serum testosterone levels in healthy young black and white men. *J Natl Cancer Inst* 1986;76:45.
147. Guess HA, Friedman GD, Sadler MC. 5 alpha-reductase activity and prostate cancer: A case-control study using stored sera. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:21.
148. Barrett-Connor E, Garland C, McPhillips JB. A prospective, population-based study of androstenedione, estrogens, and prostatic cancer. *Cancer Res* 1990;50:169).

149. Prehn RT. On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer Res.* 1999;59(17):4161-4.
150. Carey AH, Waterworth D, Patel K, White D, Little J, Novelli P, Franks S, Williamson R. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet* 1994;3:1873-6.
151. Haiman CA, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA, Willet WC, Speizer FE, Kelsey KT, Hunter DJ. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Cancer Res* 1999;59:1015-20.
152. Feigelson HS, Shames LS, Pike MC, Coetzee GA, Stanczyk FZ, Henderson BE. Cytochrome P450c17 $\alpha$  gene (CYP17) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. *Cancer Res* 1998;58:585-7.
153. Kittles RA, Panguluri RK, Chen W, Massac A, Ahaghotu C, Jackson A, Ukoli F, Adams-Campbell L, Isaacs W, Dunston GM. CYP 17 promoter variant associated with prostate cancer aggressiveness in African Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(9):943-7.
154. Pereira MG. *Epidemiologia: Teórica e Prática*. Guanabara e Koogan. Rio de Janeiro 2000.
155. Taufer M, Leal N F, Oliveira G, Gewehr C, Da Cruz I B M. Detecção do polimorfismo valina–alanina no códon 16 do gene SOD 2 por PRC/ARFLP através da enzima de restrição *Hae* III. *Revista Brasileira de Genética (suplemento)*, 2001.

156. Thomas DC, Witte JS. Population stratification: A problem for case-control studies of candidate-gene associations? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2002;11:505-12.
157. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, Nakagawa-Hattori Y, Shuimizu Y, Mizuno Y. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochemical and biophysical research communications* 1996;226:561-5.
158. 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.
159. Farin FM, Hitosis Y, Hallagan SE, Kushlika J, Woods JS, Janssen PS, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Checkoway H. Genetic polymorphism of superoxide dismutase in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2001;16(4):705-7.
160. Tomkins J, Banner SJ, McDermott CJ, Shaw PJ. Mutation screening of manganese superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 2001;12(11):2319-22.
161. Hiroi S, Harada H, Nishi H, Satoh M, Nagai R, Kimura A. Polymorphism in the SOD2 and HLA-DRB1 genes are associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261(2):332-9.
162. Pociot F, Lorenzen T, Nerup J. A manganese superoxide dismutase(SOD2) gene polymorphism in insulin-dependent diabetes mellitus. *Dis Markers* 1993;11(5-6):267-74.

163. Green H, Ross G, Peacock J, Owen R, Yarnold J, Houlston R. Variation in the manganese superoxide dismutase gene(SOD2) is not a major cause of radiotherapy complications in the breast cancer patients. *Radiother Oncol* 2002;63(2):213-6.
164. Malafa M, Margenthaler J, Webb B, Neitzel L, Christophersen M. MnSOD expression is increased in metastatic gastric cancer. *J Surgical Res* 2000;88(2):130-4.
165. RELATÓRIO DE PESQUISA, OS IDOSOS NO RIO GRANDE DO SUL. Estado mutlidimensional de suas condições de vida, 1997. Conselho Estadual do Idoso, Governo Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria do trabalho, cidadania e ação social e unidades conveniadas. Porto Alegre.
166. Flores, GHL. Construção de um modelo de avaliação pluritemática da saúde de idosos socialmente ativos. [Dissertação]. Porto Alegre. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2000.
167. Bravard A, Sabatier L, Hoffschir F, Ricoul M, Luccioni C, Dutrillaux B. SOD2: A new type of tumor-supressor gene? *Int J Cancer* 1992;51:476-80.
168. Kwee JK, Mitidieri E, Affonso OR. Lowered superoxide dismutase in highly metastatic B16 melanoma cells. *Cancer Lett* 1991;57:199-202.
169. Wispe JR, Clark JC, Burnhans MS, Kropp KE, Kofhagen TR, Whitsett JA. Synthesis and processing of the precursor for human mangano-superoxide dismutase. *Biochim Biophys Acta* 1989;994:30-6.
170. Rosenblum JS, Gilula NB, Lerner RA. On signal sequence polymorphisms and diseases of distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4471-3.



171. Cavalli LR, Varella-Garcia M, Liang BC. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth Differ* 1997;8:1189-98.
172. Li JJ, Oberley LW, Clair ST, Ridnour LA, Oberley TD. Phenotypic changes induced in human breast cancer cells by overexpression of manganese-containing superoxide dismutase. *Oncogene* 1995;10:1989-2000.
173. Church SL, Grant JW, Ridnour LA, Oberley LW, Swanson PE, Meltzer PS, Trent JM. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:3113-7.
174. Kinscherf R, Claus R, Wagner M, Gehrke C, Kameneie H, Hou D, Nauen O, Schmiedt W, Kovacs G, Pill J, Metz J, Daigner HP. Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent. *FASEB J* 1998;12:461-7.
175. Gann PH, Hennekens CH, Ma Jing, Longcope C, Stampfer MJ. Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88(16):1118-26.
176. Stanford JL, Noonan EA, Iwasaki L, Kolb S, Chadwick RB, Feng Z, Ostrander EA. A polymorphism in the CYP17 gene and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(3):243-7.
177. Sá GP, Barata HS, Toledo AF, Canto ME, Taufer M, Da Cruz IM. 17-hydroxylase cytochrome p-450 (CYP17) promoter variant associated with prostate cancer in Brazilian multiethnic population. *J Urol* 2002;167(4),Suppl.:146.

178. Allen NE, Forrest MS, Key TJ. The association between polymorphism in the CYP17 and 5 $\alpha$ -reductase (SRD5A2) genes and serum androgen concentrations in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(3):185-9.
179. Ye Z, Parry JM. The CYP17 MspA1 polymorphism and breast cancer: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2002;17(2):119-26.
180. Xue W, Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA, Ingles SA. Susceptibility to prostate cancer: Interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci. *Cancer Res* 2000;60:839-41.
181. Ripple MO, Henry WF, Schwartze SR, Wilding G, Weindruch R. Effect of antioxidants on androgen-induced AP-1 and NF-kappaB DNA-binding activity in prostate carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1999;91(14):1227-32.
182. Ripple MO, Hagopian K, Oberley TD, Schatten H, Weindruch R. Androgen-induced oxidative stress in human LNCaP prostate cancer cells is associated with multiple mitochondrial modifications. *Antioxid Redox Signal* 1999;1(1):71-81.
183. Sun XY, Donald SO, Phang JM. Testosterone and prostate specific antigen stimulates generation of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2001;22(11):1775-80.

---

## *Anexos*