Paula Iughetti

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
ASSOCIADOS COM A SUSCEPTIBILIDADE AO
DESENVOLVIMENTO DO CARCINOMA DE PRÓSTATA
EM PACIENTES BRASILEIROS**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia
do Instituto de Biociências da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de Doutora
em Ciências, na área de Biologia/Genética.

Orientadora: Dra. Maria Rita Passos-Bueno

São Paulo
2001

Aos meus pais, Romano e Isaura pelo amor,
confiança e incentivo em toda minha vida.

Ao Geraldo, que com amor e dedicação
está sempre ao meu lado.

“A gente não faz amigos, reconhece-os.”
Garth Henrichs

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, especialmente:

À Dra. Maria Rita Passos-Bueno pela orientação, preocupação com minha formação e dedicação ao longo de todos estes anos.

À Dra. Mayana Zatz e Dra. Mariz Vainzof pelo apoio e conhecimento fornecidos durante estes anos.

Ao Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves pelo entusiasmo e colaboração em me fornecer as amostras de carcinoma de próstata.

À Dra. Fernanda de Barros Correia Cavalcanti e Dr. Celso di Loreto pela contribuição no fornecimento e classificação das amostras incluídas em blocos de parafina.

Ao Dr. João Carlos Campagnari pelo interesse demonstrado no trabalho e contribuição ao apresentar-me ao Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves.

Ao Prof. Dr. Sérgio Matioli e Prof. Dr. Paulo A. Otto pelo interesse demonstrado nos resultados obtidos e ajuda nas análises estatísticas.

Aos colegas de laboratório Agnes, Alessandra Splendore, Alessandra Starling, Andréa B., Andréa S., Antônia, Camila, Carlos, Cléber, Constância, Cynthia, Daniel, Dinamar, Dra. Rita, Dulci, Elisângela, Eloisa, Emygdia, Fernanda, Flavinha, Flávia, Guilherme, Graziela, Kelly, Kikue, Lúcia, Luciana, Lu, Manuela, Marta, Oscar, Paola, Raquel, Rita V., Telma, Todd, Viviane pela convivência e carinho demonstrados ao longo da realização deste trabalho.

Àquelas pessoas que reconheci como amigas, capazes de demonstrar amizade sem interesse: Agnes, Andréa B., Carlos, Dulci, Elis, Gra, Lu, Manu, Todd, Tóto.

Aos grupos dos Prof. Alberto A.G.F.C. Ribeiro e Prof. Sérgio Bueno pela permissão e ajuda na utilização do micrótomo para a realização dos cortes dos blocos de parafina.

Ao Todd pela disposição e prontidão na ajuda do inglês.

Aos pacientes cuja contribuição foi essencial no desenvolvimento do trabalho.

À todos os professores, pós-graduandos, estagiários e funcionários do Departamento de Biologia pela cooperação e disponibilidade em ajudar a qualquer momento.

Ao CNPq, FAPESP, PADCT, FINEP, PRONEX, HHMI pelo auxílio financeiro.

À turma Alcides, Jayme, Marcos, Valéria, Nicole, Pietro, Ricardo, Nadir, Matheus, Eduardo, Fátima, Laura, Zeila, Reinaldo, Rosana, Arthur que com carinho e amizade sempre me incentivaram.

Aos queridos Edu, Angelo e Renata presença constante em todas etapas importantes de minha vida.

À Dona Rita, Sr. Laércio, Cristina, Henrique, Márcio, Berenice, Matheus, Kal, Silvia, Juninho, João Vítor e Belinha pelo carinho e admiração demonstrados a todo momento.

Ao querido Geraldo do qual nunca faltou incentivo, admiração, carinho, respeito e, sobretudo, amor.

Aos meus pais, Romano e Isaura, por toda dedicação, amor e confiança depositados durante toda minha vida.

Índice

	Página
Capítulo I – Introdução.....	09
Objetivos.....	15
 Capítulo II – Pacientes e Métodos.....	 16
II.1 Pacientes.....	16
II.2 Controles.....	21
II.3 Aspectos éticos.....	21
II.4 Métodos.....	22
II.4.1 Extração de DNA a partir de linfócitos.....	22
II.4.2 Extração de DNA a partir de tecido em parafina.....	23
II.4.3 Determinação da concentração de DNA.....	23
II.4.4 Análise molecular dos genes candidatos.....	24
II.4.4.1 SSCP.....	24
II.4.4.2 Coloração com nitrato de prata.....	25
II.4.4.3 Seqüenciamento de DNA.....	25
II.4.5 Análise estatística.....	26
 Capítulo III – Regiões polimórficas CAG e GGC do gene do receptor de andrógeno estão associadas com a susceptibilidade ao carcinoma de próstata em pacientes brasileiros.....	 27
Abstract/Resumo.....	27
Introdução.....	28
Pacientes e Métodos.....	31
Resultados.....	34
Discussão.....	40
Referências Bibliográficas.....	43
 Capítulo IV – Polimorfismo do gene do receptor de vitamina D não está associado ao desenvolvimento do carcinoma de próstata em pacientes brasileiros.....	 45
Abstract/Resumo.....	45
Introdução.....	46
Pacientes e Métodos.....	49
Resultados.....	52
Discussão.....	54
Referências Bibliográficas.....	56

Capítulo V – Novo polimorfismo do gene da endostatina está associado com uma maior susceptibilidade ao carcinoma de próstata em pacientes brasileiros.....	58
Abstract/Resumo.....	58
Introdução.....	59
Pacientes e Métodos.....	61
Resultados.....	63
Discussão.....	65
Referências Bibliográficas.....	67
 Capítulo VI – Polimorfismos nos genes MXI1 e p53 não estão associados à susceptibilidade ao carcinoma de próstata em pacientes brasileiros.....	 69
Abstract/Resumo.....	69
Introdução.....	70
Pacientes e Métodos.....	72
Resultados.....	75
Discussão.....	78
Referências Bibliográficas.....	80
 Capítulo VII – Sumário e Conclusões.....	 82
Summary and Conclusions.....	84
 Capítulo VIII – Referências Bibliográficas.....	 86
 Anexo.....	 93

Capítulo I

Introdução

Atualmente o carcinoma de próstata é o tipo de câncer mais freqüentemente diagnosticado e a segunda causa de mortes relacionadas a câncer em populações ocidentais (Furuya *et al.*, 1999). Sua incidência tem aumentado muito nos últimos 60 anos com, aproximadamente 200.000 novos casos a cada ano na população americana (Ingles *et al.*, 1998; Ripple & Wilding, 1999; Fleshner *et al.*, 2000). Uma possível explicação para este fato seria o aumento da expectativa de vida na sociedade atual (Rinker-Schaeffer *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1995; Meikle *et al.*, 1995). A previsão da Sociedade Americana do Câncer para o ano de 2001 é que sejam diagnosticados cerca de 198.000 novos casos com, aproximadamente, 32.000 mortes (Greenlee *et al.*, 2001). Na população brasileira a estimativa é de que sejam diagnosticados 21.000 novos casos com 7.000 mortes (Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2001). A incidência do carcinoma de próstata apresenta uma grande variação regional e racial, sendo maior na população negróide americana (Irvine *et al.*, 1995; Whittemore *et al.*, 1995). Por outro lado, na população japonesa, a incidência é cerca de oito vezes menor que em caucasóides norte-americanos.

Apesar de grande parte dos pacientes manifestarem o carcinoma de próstata até os 70 anos de idade, há evidências através de autópsia, da existência de células malignas latentes na próstata de homens acima de 80 anos, que morreram devido a outras causas e não apresentavam nenhum sintoma desta forma de câncer (Ekman *et al.*, 1999). A freqüência da forma sub-clínica ou latente é semelhante em caucasóides americanos e asiáticos (Carter *et al.*, 1990; Egawa *et al.*, 1995; Irvine *et al.*, 1995; Moyret-Lalle *et al.*, 1995; Reichardt *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1995a; Whittemore *et al.*, 1995; Ingles *et al.*, 1997). Estes achados sugerem que a diferença na incidência da forma clínica do carcinoma de próstata pode ser resultante de fatores ambientais, tais como modo de vida e dieta que poderiam influenciar na transformação de uma forma para a outra. Além disso, sugere-se que os tumores latentes que se manifestam nestas populações podem apresentar características moleculares distintas (Whittemore *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1995a; Ingles *et al.*, 1997; Schaid *et al.*, 1998; Ekman *et al.*, 1999).

O tumor da próstata é composto de um parênquima de células epiteliais em proliferação, de um estroma de tecido conjuntivo e de vasos sanguíneos. Sua

progressão é muito variada, havendo tumores benignos, que não se desenvolvem e não trazem conseqüências secundárias ao indivíduo, outros que se desenvolvem lentamente e ainda uma terceira classe de tumores graves que se desenvolvem rapidamente, tornam-se malignos e levam o paciente à morte em pouco tempo (Konishi *et al.*, 1995a). Atualmente, não há nenhum teste que permita a diferenciação entre estas diferentes formas de evolução dos tumores. Assim sendo, é importante que o diagnóstico do câncer seja precoce na tentativa de se obter sucesso no tratamento das formas graves. Quando o tumor é detectado precocemente é mais provável que este tenha uma localização regional e, conseqüentemente, um maior potencial de cura, através de terapia local. Nos estágios precoces há uma grande probabilidade de cura através da cirurgia de retirada da próstata (prostatectomia radical), que pode ser seguida de tratamento de radioterapia e/ou quimioterapia (Taplin *et al.*, 1995; Ripple & Wilding, 1999). Entretanto, este tratamento é ineficaz em casos avançados da doença com a ocorrência de metástases. Nestes casos, a terapia mais usada é a diminuição dos níveis de testosterona e 5 α -dihidrotestosterona, que leva a uma redução da taxa de crescimento das células da próstata (Taplin *et al.*, 1995; Ripple & Wilding, 1999). Porém, em cerca de 25% destes casos, o tumor deixa de responder ao tratamento e, mesmo com baixos níveis de andrógenos, volta a se desenvolver. O mecanismo envolvido neste processo não é ainda conhecido. O tratamento destinado a homens que chegam a este estágio da doença, com tumores hormônio-independentes, é paliativo, voltado à minimização dos sintomas (Taplin *et al.*, 1995; Ripple & Wilding, 1999).

A detecção precoce do carcinoma de próstata se dá principalmente através da determinação da concentração sérica do antígeno específico da próstata (PSA), do exame de toque retal e da análise anátomo-patológica do material de biópsia (Carter & Pearson, 1999). O PSA é uma protease presente em altas concentrações no líquido seminal, sendo secretada por células epiteliais da próstata e das glândulas periuretral e perianal, cuja função está relacionada com a liquefação do sêmen e com a fertilidade masculina (Yu *et al.*, 1995). Com o desenvolvimento do tumor, há um aumento do número de células epiteliais da próstata e, com isto, altos índices de PSA são verificados no plasma sangüíneo dos pacientes (Young *et al.*, 1991).

Na maioria dos casos, os tumores da próstata apresentam uma forte correlação entre sua aparência histológica e a expressão clínica (Gleason, 1992). Portanto, a classificação histológica do tumor, juntamente com a avaliação clínica do paciente é de fundamental importância no tratamento que será ministrado. Geralmente, tumores com baixo grau de diferenciação histológica progridem rapidamente, enquanto que tumores com alto grau de diferenciação apresentam uma

progressão lenta (Gleason, 1992). Porém, deve-se ressaltar que, apenas o conhecimento do estágio histológico do tumor, não permite traçar o prognóstico clínico do paciente, uma vez que este é extremamente variável de indivíduo para indivíduo. A classificação mais utilizada atualmente foi estabelecida por Gleason em 1992 sendo os tumores basicamente divididos em nove diferentes graus (*Gleason score* 1 – *Gleason score* 9). O valor de *Gleason* de um tumor é dado pela soma dos valores dos dois focos neoplásicos mais comuns na amostra do tumor (Gleason, 1992).

Existem várias evidências que sugerem que a manifestação do carcinoma de próstata depende, além de fatores ambientais, de um ou mais componentes genéticos. Uma destas evidências é a ocorrência de casos familiares de carcinoma de próstata, os quais representam cerca de 10% do total de casos da doença. Carter *et al.* (1992) demonstraram que a idade de início precoce e a ocorrência de vários afetados na família são determinantes no risco da recorrência desta forma de câncer em uma genealogia. Um estudo com casos familiares de carcinoma de próstata demonstrou que parentes em primeiro grau de um homem afetado apresentam um risco duas a três vezes maior de desenvolver esse tipo de câncer, independente do grupo racial (Whittemore *et al.*, 1995). Outros estudos demonstraram que quando há mais de um afetado em uma genealogia, o risco para os demais homens aumenta cerca de 1,8 vezes (Steinberg *et al.*, 1990; Glover *et al.*, 1998; Schaid *et al.*, 1998). Keetch *et al.* (1995), Isaacs *et al.* (1995) e Aprikiam *et al.* (1995) observaram que a idade de início precoce de um paciente está associada a um risco aumentado entre seus irmãos.

O modelo de herança é complexo, sendo que alguns estudos sugerem um padrão de herança autossômica dominante (Carter *et al.*, 1992; Schaid *et al.*, 1998). Porém, o modelo multifatorial é o mais aceito para a maioria dos casos de carcinoma de próstata.

Atualmente, podemos dividir os estudos genéticos com o carcinoma de próstata em dois subgrupos: a) identificação de anormalidades cromossômicas e alterações de expressão gênica nas células de tumor de casos isolados ou familiares que podem levar a caracterização dos mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento da neoplasia; b) identificação de genes que estejam associados à susceptibilidade ao carcinoma de próstata.

No primeiro subgrupo podemos destacar as seguintes alterações:

1) Alterações numéricas de diversos cromossomos, tais como monossomia parcial do 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 16, 17, 18 e X, monossomia do 1, 2, 5, 7, 9, 10, 12, 16, 17 e 18, trissomia parcial do 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 17, 19, 20 e X e trissomia do 1, 4, 7, 8, 10, 11, 14, 16, 17, 19, 20, 22 e X (Atkin & Baker, 1985; Brothman *et al.*, 1990; Arps *et al.*, 1993; Cher *et al.*, 1995; Latil *et al.*, 1995; Macoska *et al.*, 1995; Quian *et al.*, 1995;

Bova & Isaacs, 1996; Cher *et al.*, 1996; Konig *et al.*, 1999; Verma *et al.*, 1999; Erbersdobler *et al.*, 1999; Alers *et al.*, 2000);

2) Amplificações gênicas em 1q, 3q, 4, 5, 6q, 7q, 8q, 9p, 12q, 13q e Xq (Koivisto *et al.*, 1995; Visakorpi *et al.*, 1995b; Wallén *et al.*, 1999; Sattler *et al.*, 1999; Alers *et al.*, 2000);

3) Perdas alélicas em 6q, 7q, 8p, 9p, 10q, 13q, 16q, 17q e 18q (Trapman *et al.*, 1994; Emmert-Buck *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1995; Macoska *et al.*, 1995; Murakami *et al.*, 1995; Visakorpi *et al.*, 1995a; Takahashi *et al.*, 1995a);

4) Instabilidade de microssatélites nos cromossomos 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16 e 17 (Egawa *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995; Terrel *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995);

5) Mutações no oncogene *ras* em células tumorais (Konishi *et al.*, 1995a; Moyret-Lalle *et al.*, 1995); no gene PTEN/MMAC1 em células de tumor (Li *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997; Pesche *et al.*, 1998); em genes supressores de tumor como o gene do retinoblastoma (Brooks *et al.*, 1995; Kubota *et al.*, 1995), o *p53* (Konishi *et al.*, 1995a; Konishi *et al.*, 1995b; Moyret-Lalle *et al.*, 1995) e o MXI1 (Eagle *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1995) em células de tumor; e mutações no gene do receptor de andrógeno tanto em células tumorais como em linfócitos (Elo *et al.*, 1995; Klocker *et al.*, 1995; Koivisto *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1995b; Taplin *et al.*, 1995; Visakorpi *et al.*, 1995b; Evans *et al.*, 1996; Wallén *et al.*, 1999; Marcelli *et al.*, 2000);

6) Expressão reduzida do supressor de metástase KAI1 nas células do tumor (Dong *et al.*, 1995; Adachi *et al.*, 1996);

7) Aumento de expressão de três novos genes (P503S, P504S e P510S) identificados a partir de bibliotecas de cDNA de tumores de próstata e de tecido prostático normal com a técnica de *microarray* (Xu *et al.*, 2000);

O segundo subgrupo pode ser dividido em dois: estudos paramétricos de análises de ligação em casos familiares e estudos não paramétricos de análises de associação entre genes candidatos e a ocorrência do tumor, tanto em casos isolados como em casos familiares. Os estudos de análises de ligação permitiram até o presente momento a identificação de seis locos associados com o carcinoma de próstata em casos familiares com padrão de herança autossômica dominante ou ligada ao X:

1) HPC1 em 1q24-25 (Smith *et al.*, 1996);

2) PCAP em 1q42.2-43 (Berthon *et al.*, 1998);

3) CAPB em 1p36 (Gibbs *et al.*, 1999b);

4) HPCX em Xq27-28 (Xu *et al.*, 1998);

5) HPC20 em 20q13 (Berry *et al.*, 2000);

6) ELAC2/HPC2 em 17p11.2 (Tavitigian *et al.*, 2001);

Dentre estes, apenas o gene mapeado em 17p11.2 já foi clonado (Tavitigian *et al.*, 2001). Este gene, ELAC2/HPC2, altamente conservado entre os eucariotos, é responsável pela codificação de uma hidrolase dependente de metal, que pode estar envolvida no processo de reparo ou poliadenilação do DNA. Mutações que levam a formação de codons de parada prematuros foram identificadas em indivíduos afetados, sugerindo que o gene ELAC2/HPC2 pode ter um papel importante na susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma de próstata (Tavitigian *et al.*, 2001). Apesar de alguns estudos independentes não confirmarem a existência de tais locos (McIndoe *et al.*, 1997; Berthon *et al.*, 1998; Eales *et al.*, 1998; Gibbs *et al.*, 1999a; Whittemore *et al.*, 1999; Berry *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001), todos, exceto o gene ELAC2/HPC2, foram confirmados em, pelo menos, dois estudos independentes (Cooney *et al.*, 1997; Lange *et al.*, 1999; Neuhausen *et al.*, 1999; Whittemore *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2000; Xu & Int. Cons. Prostate Cancer Genet., 2000).

Uma vez que os locos identificados até o momento correspondem a cerca de 33% dos casos familiares de carcinoma de próstata (Berry *et al.*, 2000), outros estudos de ligação devem ser realizados em famílias de afetados a fim de identificar outros genes envolvidos na patogênese do carcinoma de próstata familiar.

Além das regiões candidatas acima mencionadas, existem evidências da existência de pelo menos mais cinco regiões candidatas associadas com a susceptibilidade a esta forma de câncer localizadas em 11p, 16q23.2, 5q31.3-33.3, 7q32.3 e 19q12 (Gibbs *et al.*, 2000; Suarez *et al.*, 2000; Witte *et al.*, 2000;). Porém, estes achados não foram ainda confirmados.

Os estudos não paramétricos de análises de associação que até o momento mostraram resultados positivos com uma maior susceptibilidade ao carcinoma de próstata são:

- 1) Variabilidade das regiões polimórficas CAG e GGC do gene do receptor de andrógeno (Irvine *et al.*, 1995; Hardy *et al.*, 1996; Giovannucci *et al.*, 1997; Stanford *et al.*, 1997; Bratt *et al.*, 1999; Edwards *et al.*, 1999);
- 2) Variabilidade de três regiões polimórficas do gene do receptor de vitamina D: a) Poly-A (localizada na região 3' não traduzida); b) Variante localizada no intron 8 do gene VDR identificada por um RFLP (*restriction length polymorphism*) para a enzima de restrição BsmI; c) alteração C1171T (I352I) (Morrison *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1996; Ingles *et al.*, 1997; Ingles *et al.*, 1998; Kibel *et al.*, 1998; Correa-Cerro *et al.*, 1999; Furuya *et al.*, 1999);

3) Associação do haplótipo Leu217/Thr541 de duas regiões polimórficas (Ser217Leu e Ala541Thr) do gene ELAC2 com uma maior susceptibilidade ao carcinoma de próstata (Rebbeck *et al.*, 2000);

Além das alterações acima mencionadas, há também uma série de fatores extrínsecos à célula tumoral que podem influenciar no desenvolvimento do câncer. Uma vez que todo tumor é composto de um parênquima de células em proliferação, um estroma de tecido conjuntivo e vasos sangüíneos, o processo de angiogênese está associado ao seu desenvolvimento e crescimento (Goldman, 1907; Ide *et al.*, 1939; Algire & Chalkley, 1945). A angiogênese que é o processo de formação de novos vasos sangüíneos é resultado de um balanço entre reguladores positivos e negativos. Dentre os reguladores positivos os fatores de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento endotelial e vascular e fatores de permeabilidade vascular (Kandel *et al.*, 1991; O'Reilly *et al.*, 1997). Dentre os reguladores negativos estão a trombospondina, a angiostatina e a endostatina (Good *et al.*, 1990; O'Reilly *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995; Gately *et al.*, 1996; O'Reilly *et al.*, 1997). Portanto, o estudo destes fatores no carcinoma de próstata também poderá trazer contribuições importantes para uma melhor compreensão do mecanismo de desenvolvimento do tumor da próstata.

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

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

A presente tese constituir-se-á na apresentação dos resultados na forma de trabalhos a serem submetidos à publicação. Desta maneira, uma revisão bibliográfica mais detalhada de cada tópico que foi desenvolvido será apresentada em cada um dos próximos capítulos juntamente com os resultados obtidos bem como a discussão dos dados.

Objetivos

O objetivo geral da presente tese constitui-se na identificação de regiões polimórficas do genoma que possam estar associadas com a susceptibilidade ao carcinoma de próstata na população brasileira. Os locos selecionados para a realização deste estudo foram os seguintes:

- 1) Gene do receptor de andrógeno (regiões polimórficas CAG e GGC).
- 2) Gene do receptor de vitamina D (polimorfismo C1171T).
- 3) Gene da endostatina (polimorfismo D104N).
- 4) Gene MXI1 (região polimórfica AAAAC).
- 5) Gene *p53* (polimorfismo Pro72Arg).

Capítulo II

Pacientes e Métodos

Neste capítulo descrevemos de forma detalhada as metodologias utilizadas nos trabalhos apresentados nos próximos capítulos, complementando desta maneira as informações contidas no item Pacientes e Métodos de cada um destes capítulos.

II.1 Pacientes

As amostras de carcinoma de próstata foram averiguadas no Laboratório de patologia CICAP do Hospital Alemão Oswaldo Cruz e nos Ambulatórios de Urologia do Hospital das Clínicas (FMUSP) e do Hospital do Câncer (Instituto Ludwig de Pesquisas para o Câncer).

As amostras coletadas dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas (FMUSP) e no Hospital do Câncer consistem de sangue periférico. As amostras do laboratório CICAP consistem de tecido tumoral da próstata incluído em blocos de parafina.

Um total de 182 amostras de DNA de pacientes com carcinoma de próstata, sendo que 85 correspondem a DNA extraído a partir de linfócitos e 97 a DNA extraído de tecido tumoral incluído em parafina, foram incluídos na presente tese (Tabela 1).

Somente foi possível realizarmos classificação racial dos indivíduos dos quais foi coletado sangue periférico. A classificação em caucasóide e negróide das amostras dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas (FMUSP) foi realizada de acordo com Krieger *et al.* (1965) e Azevedo (1980). Esta classificação é subjetiva, levando em consideração a textura do cabelo, cor da pele, formato do nariz e formato da boca dos indivíduos. De acordo com esta classificação os negróides são subdivididos em mulato claro, mulato médio, mulato escuro e negro. Em relação às amostras provenientes do atendimento do Hospital do Câncer (Instituto Ludwig) não sabemos qual o critério utilizado na classificação racial, uma vez que não vimos os pacientes e as amostras nos foram fornecidas com a classificação racial pronta.

Tabela 1 - Dados dos pacientes com carcinoma da próstata (CP);
Idade em anos; Raça: C- caucasóide; N - negróide.
Os espaços em branco correspondem a dados não obtidos.

Paciente	Diagnóstico	idade	raça	Gleason score	tecido
01	CP	72	C	6	sangue
02	CP	77	N	5	sangue
03	CP	70	N	7	sangue
04	CP	67	C	5	sangue
05	CP	63	C	9	sangue
06	CP	70	C	7	sangue
07	CP	65	C	5	sangue
08	CP	54	N	3	sangue
09	CP	70	C	6	sangue
10	CP	69	C	7	sangue
11	CP	65	C	6	sangue
12	CP	57	C	7	sangue
13	CP	67	N	5	sangue
14	CP	63	N	6	sangue
15	CP	57	N	7	sangue
16	CP	67	C		sangue
17	CP	67	C	7	sangue
18	CP	64	N	4	sangue
19	CP	58	C	2	sangue
20	CP			5	sangue
21	CP	67		7	tumor
22	CP	76	C	4	sangue
23	CP	66	C	3	sangue
24	CP	50		3	sangue
25	CP	64	C	9	sangue
26	CP	76	N	2	sangue
27	CP	58	N		sangue
28	CP	82	C	5	sangue
29	CP	75		9	sangue
30	CP	75		5	sangue
31	CP	82		5	sangue
32	CP			5	sangue
33	CP	68	N	2	sangue
34	CP	73		3	sangue
35	CP	67	C	4	sangue
36	CP	64		4	sangue
37	CP	72	C		sangue
38	CP	68		7	tumor
39	CP	70		4	tumor
40	CP	61		7	tumor
41	CP	72		6	tumor
42	CP	78		7	tumor
43	CP	54		8	tumor
44	CP	60		8	tumor
45	CP			5	tumor
46	CP	63		7	tumor
47	CP	60		5	tumor
48	CP	61		5	tumor

II. Pacientes e Métodos

Paciente	Diagnóstico	idade	raça	Gleason score	tecido
49	CP	64		8	tumor
50	CP	67		7	tumor
51	CP	67		7	tumor
52	CP	73		8	tumor
53	CP	66		5	tumor
54	CP	68		8	tumor
55	CP	72		5	tumor
56	CP	66		6	tumor
57	CP	57		8	tumor
58	CP	73		8	tumor
59	CP	70		7	tumor
60	CP	69		7	tumor
61	CP	66		7	tumor
62	CP	82		9	tumor
63	CP	70		7	tumor
64	CP	87		8	tumor
65	CP	37			tumor
66	CP	63		7	tumor
67	CP	70		7	tumor
68	CP	68		7	tumor
69	CP	62		8	tumor
70	CP	67		7	tumor
71	CP	66		8	tumor
72	CP	70		8	tumor
73	CP	51		4	tumor
74	CP	72		7	tumor
75	CP	71		4	tumor
76	CP	77		9	tumor
77	CP	73		5	tumor
78	CP	72		2	tumor
79	CP	70		5	tumor
80	CP	67		9	tumor
81	CP	85		9	tumor
82	CP	59		7	tumor
83	CP	71	C	6	tumor
84	CP	63		7	tumor
85	CP	70		7	tumor
86	CP	68		5	tumor
87	CP	58		7	tumor
88	CP	83		9	tumor
89	CP	52		8	tumor
90	CP	64		8	tumor
91	CP	64		7	tumor
92	CP	62		6	tumor
93	CP	62		7	tumor
94	CP	63		8	tumor
95	CP	60		8	tumor
96	CP	66		8	tumor
97	CP	52		4	tumor
98	CP	70		7	tumor
99	CP	60		5	tumor
100	CP	63		7	tumor

Paciente	Diagnóstico	idade	raça	Gleason score	tecido
101	CP	61		7	tumor
102	CP	69		7	tumor
103	CP	53		5	tumor
104	CP	67		7	tumor
105	CP	67		7	tumor
106	CP	53		5	tumor
107	CP	65		7	tumor
108	CP	66		8	tumor
109	CP	52		7	tumor
110	CP	62		7	tumor
111	CP	75		8	tumor
112	CP	69		7	tumor
113	CP	74		10	tumor
114	CP	67		10	tumor
115	CP	64		7	tumor
116	CP	47		6	tumor
117	CP	65		7	tumor
118	CP	52		5	tumor
119	CP	57		6	tumor
120	CP	65		7	tumor
121	CP	73		5	tumor
122	CP	66		6	tumor
123	CP	63		6	tumor
124	CP	75		8	tumor
125	CP	74		7	tumor
126	CP	81		8	tumor
127	CP	71		6	tumor
128	CP	68		6	tumor
129	CP	47		8	tumor
130	CP	58		5	tumor
131	CP	73		9	tumor
132	CP	64		6	tumor
133	CP	57		6	tumor
134	CP	62	C	7	sangue
135	CP	66	A	4	sangue
136	CP	50	C	7	sangue
137	CP	65	C	7	sangue
138	CP	49	C	6	sangue
139	CP	63	C	7	sangue
140	CP	82	C	7	sangue
141	CP	66	N		sangue
142	CP	68	A	5	sangue
143	CP	72	C	6	sangue
144	CP	67	N	7	sangue
145	CP	72	N	7	sangue
146	CP	67	C	7	sangue
147	CP	75	C	4	sangue
148	CP	67	C	6	sangue
149	CP	71	C	6	sangue
150	CP	74	C	6	sangue
151	CP	51	C	8	sangue
152	CP	61	C	9	sangue

Paciente	Diagnóstico	idade	raça	Gleason score	tecido
153	CP	68	C	7	sangue
154	CP	69	C	7	sangue
156	CP	78	C	8	sangue
157	CP	70	C	7	sangue
158	CP	65	C	5	sangue
159	CP	57	C	8	sangue
160	CP	62	C	7	sangue
161	CP	72		2	sangue
162	CP	65	C	7	sangue
163	CP	73	C	8	sangue
164	CP	67	C		sangue
165	CP	62	C	6	sangue
166	CP	51	C	6	sangue
167	CP	41	C	5	sangue
168	CP	71	C	7	sangue
169	CP	77	C	6	sangue
170	CP	71	C	7	sangue
171	CP	62	C	6	sangue
172	CP				sangue
173	CP	56	C	7	sangue
174	CP	69	C	8	sangue
175	CP	67	C	6	sangue
176	CP	68	C	7	sangue
177	CP	62	C	7	sangue
178	CP	60	C		sangue
179	CP				sangue
180	CP	67			sangue
181	CP	63	C		sangue
182	CP	58	C	8	sangue

II.2 Controles

O grupo controle utilizado neste estudo é constituído de pais e avôs de pacientes atendidos pelo Laboratório de Miopatias (IBUSP) (n=150) e controles normais do sexo masculino provenientes de Recife (PE) (n=50) e que não apresentam nenhum sinal da manifestação de carcinoma de próstata. A idade dos indivíduos do grupo controle variou entre 38 e 80 anos. A amostra de DNA foi obtida através de linfócitos do sangue periférico.

Este grupo constitui-se de um total de 200 amostras, das quais 106 foram classificadas como caucasóides e 83 como negróides, conforme critério apresentado no item anterior.

Devemos ressaltar que não é possível afirmarmos que estes indivíduos não virão a desenvolver carcinoma de próstata. Assim, em todas as análises realizadas neste trabalho tivemos a cautela de analisar criticamente os resultados apresentados pelo grupo controle. O grupo controle ideal para o tipo de trabalho desenvolvido deveria ser constituído por homens com mais de 75 anos que tivessem um acompanhamento de um urologista e que não apresentassem nenhum sintoma de carcinoma de próstata. Porém, não foi possível o acesso a este grupo de indivíduos.

II.3 Aspectos éticos

Os estudos foram realizados de acordo com aspectos éticos que preservam a privacidade de cada indivíduo, tanto dos controles normais, como dos pacientes. Além disso, estes indivíduos concordaram por escrito, e/ou verbalmente com a coleta do material para fins de pesquisa.

II.4 Métodos

II.4.1 Extração de DNA a partir de linfócitos (Miller et al., 1988)

A extração de DNA foi realizada a partir de 10ml de sangue coletado em tubo com 200µl de anticoagulante (EDTA 5%). As amostras de sangue eram guardadas a 4°C até, no máximo, 3 dias. Esta técnica baseia-se nas seguintes etapas para a obtenção do DNA:

- 1)** Diluir o sangue com 35ml de solução A (1550mM NH₄Cl; 100mM KHCO₃; 10mM EDTA; pH 7,4) em tubo tipo *Falcon*;
- 2)** Manter em gelo por 30 minutos para a obtenção da lise das hemácias;
- 3)** Centrifugar por 10 minutos a 1800rpm;
- 4)** Descartar o sobrenadante e lavar cuidadosamente o tubo e o precipitado com a solução A;
- 5)** Ressuspender o precipitado em 3 ml de solução B (100mM Tris-HCl; 4M NaCl; 20mM EDTA; pH 8,0);
- 6)** Adicionar 100µl de Proteinase K (20mg/ml) e 300µl de SDS 10% e misturar cuidadosamente;
- 7)** Incubar a solução a 37°C por 3-24 horas. A solução ficará clara e viscosa;
- 8)** Após a incubação, adicionar 1 ml de NaCl saturado (6M) e misturar;
- 9)** Centrifugar a solução por 15 minutos a 2500rpm;
- 10)** Transferir o sobrenadante para outro tubo tipo *Falcon* limpo e repetir a etapa 9;
- 11)** Precipitar o DNA adicionando 2 vezes o volume de etanol absoluto e recolher o DNA com um bastão de vidro;
- 12)** Lavar o DNA em uma solução de etanol 70% e diluir em TE⁻⁴ (10mM Tris; 0,1mM EDTA; pH 7,5) em tubo tipo *Eppendorf*;
- 13)** Incubar o DNA a 65°C por 30 minutos para evitar contaminação por DNase e armazená-lo a 4°C.

II.4.2 Extração de DNA a partir de tecido incluído em parafina (Banerjee et al., 1995)

A extração de DNA foi realizada a partir de 2 cortes de 20µm cada. Esta técnica baseia-se nas seguintes etapas para a obtenção do DNA:

- 1) Colocar os cortes em um tubo tipo *Eppendorf* com 400µl de solução tampão (50mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA; Twin 20 0,5%);
- 2) Incubar o material a 70°C em banho-maria até derreter a parafina;
- 3) Centrifugar a solução a 12000rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente;
- 4) Retirar cuidadosamente a parafina que solidifica na superfície da solução;
- 5) Repetir os passos 2, 3 e 4 até a completa retirada da parafina;
- 6) Acrescentar 2µl de Proteinase K (20mg/ml) e incubar em banho-maria a 45°C por 16-20 horas;
- 7) Após a incubação, inativar a proteinase fervendo a amostra por 10 minutos;
- 8) Centrifugar a solução a 6000rpm por 5 minutos;
- 9) Transferir a solução para outro tubo tipo *Eppendorf*;
- 10) Armazenar a amostra a -20°C;

II.4.3 Determinação da concentração de DNA (Sambrook et al., 1989)

A concentração do DNA foi determinada através da leitura da absorbância no comprimento de onda a 260nm. Para a leitura 10µl de DNA foram diluídos em 990µl de solução alcalina (0,3M NaOH; 0,1M NaCl). O rendimento das técnicas acima descritas é de 300 a 400µg de DNA.

II.4.4 Análise molecular dos genes candidatos para os estudos de associação

Para os estudos de associação analisamos polimorfismos já descritos na literatura e em nosso laboratório. As técnicas utilizadas para cada polimorfismo estudado estão descritas nos próximos capítulos.

A procura de mutações em genes conhecidos foi realizada a partir da amplificação de cada exon do gene (descrição detalhada em cada capítulo) e posterior análise pelas técnicas de SSCP e seqüenciamento automático de DNA. As técnicas de SSCP e seqüenciamento estão descritas abaixo:

II.4.4.1 SSCP (*single-strand conformational polymorphism*) (Orita et al., 1989)

Este método é baseado no princípio de que a mobilidade de um fragmento de DNA em fita simples em géis não desnaturantes depende de seu tamanho, de sua seqüência de nucleotídeos e da temperatura de corrida. Assim, uma diferença de apenas um par de base entre dois fragmentos de DNA pode ser detectada pela presença de bandas com migração diferente em gel não desnaturante.

Após a amplificação de cada exon, 5µl do produto de PCR foram diluídos em tampão (*loading buffer*: 95% formamida, 0,02M EDTA, 0,5% xileno-cianol, 0,5% azul de bromofenol), desnaturadas a 95°C por 5 minutos e mantidas em gelo. A seguir as amostras foram submetidas à eletroforese em géis não desnaturantes 0,5x MDETM (FMC Bioproducts), 2,5% glicerol e 0,6x TBE (53,4mM Tris, 53,4mM Ácido Bórico, 1,2mM EDTA, pH 8,0). A eletroforese foi realizada a 8W em tampão 0,6x TBE à temperatura constante, sendo que o tempo de corrida variou entre 16 a 18 horas, de acordo com o tamanho dos produtos de PCR.

Após a eletroforese os produtos foram visualizados nos géis corados com nitrato de prata, de acordo com o descrito a seguir:

II.4.4.2 Coloração com nitrato de prata (Bassam et al., 1991) com modificações

- 1) Mergulhar o gel em solução 10% etanol por 8 minutos para fixar o DNA;
- 2) Transferir o gel para solução 1% ácido nítrico por 3 minutos;
- 3) Lavar o gel em água destilada por cerca de 20 segundos;
- 4) Mergulhar o gel em solução de nitrato de prata (0,2% AgNO_3 ; 0,055% formaldeído) por 20 minutos;
- 5) Lavar o gel em água destilada por cerca de 20 segundos;
- 6) Revelar o gel, mergulhando-o na solução 1 (2% Na_2CO_3 ; 0,055% formaldeído) por cerca de 30 segundos e a seguir na solução 2 (2% Na_2CO_3 ; 0,0275% formaldeído) até o aparecimento das bandas;
- 7) Mergulhar o gel em solução 10% ácido acético para bloquear a reação de revelação;
- 8) Lavar o gel em água destilada por 5 minutos;
- 9) Deixar secar a temperatura ambiente;

Após a secagem o gel foi fotografado com filme apropriado (*Typon-Promega*).

II.4.4.3 Seqüenciamento de DNA

Para o seqüenciamento os produtos de PCR foram quantificados em géis de agarose 2%, 1X TBE, através da eletroforese simultânea com uma amostra de concentração conhecida, corados com brometo de etídeo (5 $\mu\text{g/ml}$).

Noventa microgramas de produto de PCR foram purificados com 5 unidades de Exonuclease I (5u/ μl) (*Amershan*) e 2,5 unidades de SAP (*Shimp Alkaline Phosphatase*) (2,5u/ μl) (*Amershan*) através da incubação a 37°C por 45 minutos, seguida da inativação das enzimas à 80°C durante 15 minutos. Em seguida, o produto purificado foi submetido a reação de seqüenciamento com 2 μl de *BigDye Terminator Ready Reaction* (*Perkin Elmer*) e 3,2pmoles do oligo (*Foward* ou *Reverse*) utilizado na PCR, sendo as condições da reação as seguintes: desnaturação inicial à 96°C por 2 minutos seguidos de 25 ciclos de desnaturação à 96°C por 10 segundos, hibridação à 50°C por 5 segundos e extensão à 60°C por 4 minutos. Após a reação, as amostras foram precipitadas de acordo com o descrito a seguir:

- a) Adicionar 32 µl de etanol 95% e 8 µl de água destilada em cada amostra e agitar com o auxílio de um agitador do tipo *Vortex*;
- b) Deixar em temperatura ambiente por 10 minutos;
- c) Centrifugar a 14000 rpm por 30 minutos;
- d) Descartar o sobrenadante;
- e) Lavar o precipitado com 125 µl de etanol 70%;
- f) Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos;
- g) Descartar o sobrenadante e secar as amostras à 96°C;

A seguir as amostras foram submetidas à análise da sequência em seqüenciador automático ABI377 (*Applied Biosystems*)

II.4.5 Análise estatística

O resultados dos estudos de associação realizados neste trabalho foram analisados através das seguintes técnicas estatísticas padronizadas:

- 1) Teste de χ^2 para verificar se há diferença de grupos de alelos entre afetados e controles dos diferentes locos estudados;
- 2) Teste exato de Fischer – usado com o mesmo objetivo do teste anterior em amostras pequenas;
- 3) Teste de Kruskal-Wallis – para verificar se a distribuição dos alelos dos locos polimórficos CAG e GGC do gene do receptor de andrógeno é diferente entre o grupo de afetados e o grupo controle;
- 4) Teste t-student – para avaliar diferenças entre médias;
- 5) Equilíbrio de Hardy-Weinberg – calculado com o objetivo de saber se a amostra em questão está em equilíbrio ou se há algum desvio para um determinado sistema polimórfico;
- 6) *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC) – calculados a fim de se verificar qual o risco relativo associado a um determinado alelo;

Captulo III

Regies polimrficas CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno esto associadas com a susceptibilidade ao carcinoma de prstata em pacientes brasileiros

Abstract

Several reports have suggested that the polymorphic CAG and GGC regions within exon 1 of the androgen receptor gene might be associated with the occurrence of prostate carcinoma. We have analyzed these two polymorphic regions in Brazilian prostate carcinoma individuals (n=122 for CAG; n=117 for GGC) and controls (n=188 for CAG e n=172 for GGC). We have observed a higher prevalence of short CAG alleles (<22 repeats) (p=0.05) and GGC alleles with ≤ 16 repeats (p=0.04) in the prostate carcinoma group as well as a strong linkage disequilibrium between CAG and GGC regions among patients ($\chi^2=4,56$; 1 degree of freedom; p=0,03). Our data suggest that the prostate carcinoma susceptibility in Brazilian population is associated with the haplotype <22CAG/>16GGC, which increases by 2.5 times the probability of disease manifestation (OR=2.49; IC 95% 1.15-5.40).

Resumo

Vrios estudos tm sugerido que as regies polimrficas CAG e GGC, localizadas no exon 1 do gene do receptor de andrgeno, podem estar envolvidas na manifestao do carcinoma de prstata. No presente estudo, analisamos estas regies em pacientes com carcinoma de prstata (n=122 para CAG; n=117 para GGC) e controles normais (n=188 para CAG e n=172 para GGC) da populao brasileira. Observamos uma freqncia significativamente maior de alelos <22 repeties CAG (p=0,05) e alelos ≤ 16 repeties GGC (p=0,04) no grupo de pacientes. Observamos tambm que h disequbrio de ligao destas duas regies nos pacientes com carcinoma de prstata ($\chi^2=4,56$; 1 grau de liberdade; p=0,03). Nossos resultados sugerem que a susceptibilidade a esta forma de cncer na populao brasileira deve estar associada ao hapltipo <22CAG/>16GGC, o qual parece aumentar em cerca de 2,5 vezes a probabilidade da manifestao da doena (OR=2,49; IC 95% 1,15-5,4).

I. Introduo

O carcinoma de prstata o tumor slido mais comum e a segunda principal causa de mortes relacionadas a cncer entre homens da populao americana. No ltimo ano cerca de 180.000 novos casos de carcinoma de prstata foram diagnosticados e cerca de 32.000 mortes observadas na populao norte-americana (Greenlee *et al.*, 2000). Na populao brasileira, a estimativa para o ano de 2001 de que sejam diagnosticados 21.000 novos casos com 7.000 mortes (Estimativas da incidncia e mortalidade por cncer no Brasil, 2001).

Como as clulas epiteliais da prstata so dependentes de andrgenos, estes desempenham um papel crucial na tumorignese e progresso do carcinoma de prstata (Irvine *et al.*, 1995). Devido a esta dependncia, o tumor da prstata considerado um dos mais importantes tumores dependentes de hormnio (Walln *et al.*, 1999). A ligao do hormnio no domnio especfico do receptor determina a ocorrncia de um mecanismo em cascata de reaes andrgeno-dependentes (Elo *et al.*, 1995; Klocker *et al.*, 1995). Alm disso, esta ligao regula a expresso de vrios genes como, por exemplo, o gene que codifica a PSA. Assim, mutaes no gene do receptor de andrgeno poderiam levar a uma modificao em sua estrutura, de forma tal que o receptor estimularia o crescimento das clulas da prstata independentemente da ligao do hormnio com o receptor (Taplin *et al.*, 1995). O gene que codifica o receptor de andrgeno, localizado em Xq11.2-q12, tem 3061Kb e 8 exons (Tilley *et al.*, 1989). Vrios estudos identificaram diferentes mutaes de substituio de aminocido e formao de codons de parada no gene do receptor de andrgeno associadas com o carcinoma de prstata. Contudo, a freqncia destas mutaes baixa variando entre 2% e 8% (Taplin *et al.*, 1995; Elo *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1995; Klocker *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1996; Walln *et al.*, 1999; Marcelli *et al.*, 2000). Observa-se tambm a ocorrncia de amplificao gnica em cerca de 15% dos casos de carcinoma de prstata (Visakorpi *et al.*, 1995; Koivisto *et al.*, 1995; Walln *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem que alteraes no gene do receptor de andrgeno esto envolvidas com o desenvolvimento do tumor, mas no necessariamente com uma maior susceptibilidade ao seu desenvolvimento.

No primeiro exon do gene do receptor de andrgeno encontram-se duas regies polimrficas, CAG e GGC, que podem influenciar a funo de transativao do receptor (Chamberlain *et al.*, 1994). Aparentemente, esta influncia se d a partir do nmero de repeties CAG, ou seja, quanto menor o nmero de repeties, maior a atividade do receptor (Chamberlain *et al.*, 1994). Coetzee & Ross (1994), observaram que indivduos normais negrides apresentam uma maior freqncia de alelos com

menos de 21 repeties CAG do que indivduos normais caucasides e orientais. A partir desta observao e do fato de a freqncia de carcinoma de prstata ser maior na populao negride americana que em caucasides e orientais, Irvine *et al.* (1995) levantaram a hiptese de que alelos com menos de 21 repeties CAG poderiam estar associados com uma maior susceptibilidade ao carcinoma de prstata. Esses autores confirmaram uma prevalncia ligeiramente maior de alelos com menor nmero de repeties CAG (<22 repeties) em indivduos negrides da populao normal ($p=0,046$). Alm disso, observaram um discreto aumento, no significativo estatisticamente, de alelos com menos de 22 repeties no grupo de pacientes com carcinoma de prstata. Para a regio polimrfica GGC, Irvine *et al.* (1995) observaram que controles normais negrides tm uma freqncia significativamente menor de alelos com 16 repeties que caucasides, que por sua vez, tm uma freqncia menor que orientais. No grupo de pacientes no foi observada diferena significativa na freqncia deste alelo. Contudo, estes autores observaram desequbrio de ligao entre as regies polimrficas CAG e GGC no grupo de pacientes, com um excesso de indivduos afetados que apresentam alelos com menos de 22 repeties CAG e mais de 16 repeties GGC ($p=0,008$), o que no foi observado no grupo controle (Irvine *et al.*, 1995).

Vrios outros trabalhos confirmam uma maior freqncia de alelos com menos de 22 repeties em pacientes com carcinoma de prstata do que em controles (Ingles *et al.*, 1997; Giovannucci *et al.*, 1997; Stanford *et al.*, 1997), sendo que alguns destes trabalhos tm mostrado uma correlao positiva dos alelos com menos de 22 repeties e uma idade de incio mais precoce (Hardy *et al.*, 1996; Bratt *et al.*, 1999) e ainda outros uma correlao negativa dos alelos com menos de 22 repeties e o *Gleason score* (Ingles *et al.*, 1997; Giovannucci *et al.*, 1997). Alm disso, Giovannucci *et al.* (1997), Stanford *et al.* (1997) e Bratt *et al.* (1999) estimaram que a diminuio de cada seis trinucleotdeos CAG leva a um aumento do risco de carcinoma de prstata em cerca de quatro vezes, ou seja, um indivduo com 19 repeties CAG tem um risco quatro vezes maior de desenvolver carcinoma de prstata que um indivduo com 25 repeties. Por outro lado, estes achados no tm sido sempre confirmados. Por exemplo, Edwards *et al.* (1999), ao contrrio dos trabalhos anteriores observaram que alelos com mais de 22 repeties CAG so mais freqentes em tumores mais avanados e Lange *et al.* (2000) no encontraram nenhuma associao entre o tamanho das repeties CAG e o carcinoma de prstata.

Para a regio polimrfica GGC, Eales *et al.* (1998) observaram resultados semelhantes queles obtidos por Irvine *et al.* (1995), e verificaram tm uma correlao positiva entre alelos com mais de 16 repeties GGC e o *Gleason score*

(Eales *et al.*, 1998). Edwards *et al.* (1999), apesar de no terem observado associao entre o tamanho dos alelos GGC e o carcinoma de prstata, tambm observaram a correlao observada por Eales *et al.* (1998). Stanford *et al.* (1997), ao contrrio do observado pelos outros trabalhos, verificaram um risco aumentado para pacientes com alelos GGC com menos de 16 repeties.

Os estudos de associao entre os polimorfismos CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno e o carcinoma de prstata sugerem, portanto, que estas regies tm um papel importante na susceptibilidade ao desenvolvimento do tumor. Os estudos so entretanto, controversos. possvel que o efeito destas regies polimrficas seja varivel na susceptibilidade ao carcinoma de prstata entre as diferentes populaes ou ainda que elas apenas indiquem que o gene do receptor de andrgeno est envolvido com a susceptibilidade a esta forma de cncer no sendo, porm a causa deste efeito. Assim sendo, julgamos o estudo destes polimorfismos na populao brasileira da maior importncia, a fim de observarmos sua correlao com o desenvolvimento desta forma de cncer em nossa populao.

II. Pacientes e Mtodos

II.1 Pacientes

A descrio detalhada das amostras utilizadas neste estudo est no captulo II da presente tese.

II.1.1 Polimorfismo CAG

Para o polimorfismo CAG foram testadas 122 amostras de DNA de pacientes com carcinoma de prstata (31 amostras de linfcitos e 91 amostras de tecido tumoral includo em parafina). A idade mdia dos pacientes foi de $66,9 \pm 7,7$ anos.

II.1.2 Polimorfismo GGC

Para o polimorfismo GGC foram testadas 117 amostras de DNA de pacientes com carcinoma de prstata (32 amostras de linfcitos e 85 amostras de tecido tumoral includo em parafina). A idade mdia dos pacientes foi de $66,9 \pm 8,2$ anos.

II.2 Controles

As amostras controles utilizadas neste estudo esto detalhadamente descritas no captulo II desta tese. Para o polimorfismo CAG foram testados 188 indivduos (100 caucasides; 78 negrides), com idade mdia de $52,5 \pm 14,8$ anos. Na anlise do polimorfismo GGC foram estudados 172 indivduos (94 caucasides; 67 negrides), com idade mdia de $51,9 \pm 6,3$ anos.

II.3 Mtodos

Os mtodos de extrao de DNA a partir de linfcitos e a partir de tecidos em bloco de parafina esto descritos no captulo II.

II.3.1 Anlise das regies polimrficas CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno

As regies polimrficas CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno foram analisadas atravs de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*). As amostras foram submetidas a uma reao de *PCR* aninhada (*nested PCR*) com oligonucleotdeos mais internos (CAG 2F e CAG 2R; GGC 2F e GGC 2R) em relao aos primeiros (CAG 1F e CAG 1R; GGC 1F e GGC 1R). As seqncias dos oligonucleotdeos utilizados para a amplificao destas regies esto descritas a seguir:

Oligonucleotídeo	Seq�ncia	Tamanho dos fragmentos amplificados
CAG 1F	5' GTGCGCGAAGTGATCCAGAA 3'	305pb
CAG 1R	5' TCTGGGACGCAACCTCTCTC 3'	
CAG 2F	5' AGAGGCCGCGAGCGCAG 3'	221pb
CAG 2R	5' GCTGTGAAGTTGCTGTTCTCAT 3'	
GGC 1F	5' TCCTGGCACACTCTCTTCAC 3'	219pb
GGC 1R	5' GCCAGGGTACCACACATCAGGT 3'	
GGC 2F	5' ACTCTCTTCACAGCCGAAGAAGGC 3'	195pb
GGC 2R	5' ATCAGGTGCGGTGAAGTCGCTTTCC 3'	

As reaes de *PCR* para a amplificao da regio polimrfica CAG foram feitas a partir de 200ng de DNA em um volume final de reao de 25l, contendo 0,25mM de cada nucleotdeo, 0,3 unidades de *Taq* Polimerase (*Life Technologies*), tampo da enzima (50mM KCl; 10mM Tris-HCl pH8,3; 0,01% gelatina), 1,5mM de MgCl₂ e 30pmol de cada oligonucleotdeo (CAG 1F/CAG1R). As amostras foram desnaturadas a 94C por 4 minutos seguidos de 17 ciclos de 94C por 1 minuto, 55C por 1 minuto e 72C por 1 minuto. Uma desnaturao final a 72C por 6 minutos, completa a reao. A segunda reao foi feita a partir de 1l da primeira reao com os oligonucleotdeos CAG 2F/CAG 2R, sendo as demais condies iguais quelas da reao anterior. Estas amostras foram desnaturadas a 94C por 4 minutos seguidos de 28 ciclos de 94C por 1 minuto, 66C por 1 minuto e 72C por 1 minuto e 30 segundos. Uma desnaturao

final de 6 minutos a 72C completa a reao. Os produtos da segunda reao foram analisados em gis desnaturantes de poliacrilamida 6,5% com uria 7M, corados com nitrato de prata, de acordo com protocolo descrito no captulo II. Aps uma primeira anlise as amostras foram reagrupadas de acordo com o tamanho, sendo que aquelas de mesmo tamanho foram colocadas lado a lado, e submetidas a uma nova eletroforese. Para determinar o tamanho dos alelos foi realizado o seqenciamento de uma amostra de cada tamanho. A partir deste seqenciamento foi determinado o nmero de repeties CAG de cada uma das amostras.

As reaes de *PCR* para a amplificao da regio polimrfica GGC foram feitas a partir de 200ng de DNA em um volume final de reao de 25l, contendo 0,25mM de cada nucletdeo, 0,2 unidades de *Pfx Taq* DNA Polimerase (*Life Technologies*), tampo da enzima (50mM KCl; 10mM Tris-HCl pH8,3; 0,01% gelatina), 1x *enhancer* da enzima, 1mM de MgSO₄ e 30pmol de cada oligonucletdeo (GGC 1F/GGC 1R). As amostras foram desnaturadas a 94C por 2 minutos seguidos de 17 ciclos de 98C por 1 minuto e 70C por 5 minutos. A segunda reao foi feita a partir de 1l da primeira reao com os oligonucletdeos GGC 2F/GGC 2R, sendo as demais condies iguais quelas da reao anterior. Estas amostras foram desnaturadas a 94C por 2 minutos seguidos de 35 ciclos de 98C por 1 minuto e 70C por 5 minutos. A anlise destes produtos foi realizada da mesma maneira que aquela utilizada para a regio polimrfica CAG.

III. Resultados

III.1 Instabilidade somtica nas regies polimrficas CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno

Atravs dos estudos realizados com a regio polimrfica CAG do gene do receptor de andrgeno observamos a ocorrncia de dois casos de instabilidade somtica dentre os pacientes com carcinoma de prstata (CP42 e CP51) (Figura 1). O paciente CP42 apresentou dois alelos, sendo um com 19 e outro com 26 repeties. J o paciente CP51 apresentou um alelo de 19 repeties e um alelo de 22 repeties. Nenhum caso de instabilidade somtica foi observado entre os indivduos do grupo controle. Com relao a regio polimrfica GGC no foi observado nenhum caso de instabilidade somtica entre os pacientes e os indivduos controles.

Figura 1 – Instabilidade allica observada em dois casos de carcinoma de prstata. Os alelos (nmero de repeties) esto indicados pelas setas.

III.2 Regio polimrfica CAG do gene do receptor de andrgeno

O nmero de repeties dentre os pacientes com tumor de prstata variou entre 14 e 30 e dentre o grupo controle entre 16 e 28.

Inicialmente, realizamos uma anlise no grupo controle a fim de verificarmos se h variao na distribuio dos alelos entre caucasides e negrides. No observamos diferena significativa ($p=0,68$) entre estas duas amostras e, portanto agrupamos estes dois grupos para a realizao das anlises estatsticas subseqentes.

Na Tabela 1 e figura 2 podemos observar a distribuio dos alelos CAG dentre os indivduos da populao normal e indivduos com tumor de prstata. No observamos diferena significativa na distribuio dos alelos entre os grupos ($p>0,05$). Observamos, contudo, uma maior freqncia de alelos com um menor nmero de repeties no grupo do carcinoma de prstata. De fato, uma diferena significativa observada entre os grupos de alelos com menos de 22 repeties e alelos com 22 ou mais repeties ($p=0,05$).

Realizamos ainda uma comparao entre as amostras de carcinoma de prstata separadas de acordo com o *gleason score* (<7 e ≥ 7) (Tabela 2). Atravs da anlise destes dados no verificamos valores significativamente diferentes ($p=0,45$).

Na comparao da freqncia das amostras de carcinoma de prstata quando separadas de acordo com a idade, indivduos com menos de 65 anos e indivduos com 65 anos ou mais, foi observado que dentre os indivduos com menos de 65 anos a proporo relativa de alelos com menos de 22 repeties maior que aquela dos indivduos com 65 anos ou mais ($\chi^2=3,99$; 1 grau de liberdade; $p=0,05$) (Tabela 3).

Tabela 1 – Frequncia do nmero de repeties da regio polimrfica CAG do gene do receptor de andrgeno no grupo controle e em pacientes com carcinoma de prstata.

Número de repetições	Controles normais	Carcinoma de próstata
<22	93 (49,5%)	75 (61,6%)
�22	95 (50,5%)	48 (39,4%)
Total	188 (100%)	122 (100%)

Figura 2 – Grfico da distribuio da frequncia (%) do nmero de repeties CAG nos grupos de pacientes com carcinoma de prstata e controles normais.

Tabela 2 - Separao do nmero de repeties CAG de acordo com a escala de *Gleason*.

Número de Repetições	<i>Gleason score</i> < 7	<i>Gleason score</i> � 7
<22	32 (65,3%)	41 (56,9%)
�22	17 (34,7%)	31 (43,1%)
Total	49 (100%)	72 (100%)

Tabela 3 - Separao do nmero de repeties CAG de acordo com a idade de manifestao dos sintomas.

Número de Repetições	< 65 anos	� 65 anos
<22	35 (71,4%)	36 (51,4%)
�22	14 (28,6%)	34 (48,6%)
Total	49 (100%)	70 (100%)

III.3 Regio polimrfica GGC do gene do receptor de andrgeno

A distribuio da freqncia dos alelos GGC pode ser observada na Tabela 4 e na figura 3. O nmero de repeties GGC variou entre 10 e 21 no grupo de pacientes com carcinoma de prstata e 10 e 22 no grupo controle. Assim como realizado para o polimorfismo CAG, neste caso tambm separamos a amostra controle em dois grupos raciais, caucasides e negrides, e no observamos diferena significativa entre os dois grupos ($\chi^2=1,72$; 1 grau de liberdade; $p=0,42$). Neste caso, tambm consideramos estes dois grupos como nico.

Observamos que no h diferena significativa na distribuio dos alelos entre o grupo de pacientes com carcinoma de prstata e controles normais ($p>0,05$). Porm, quando separamos as amostras de pacientes com carcinoma de prstata e controles em dois grupos de acordo com o nmero de repeties (≤ 16 repeties GGC e >16 repeties GGC) observamos uma diferena significativa entre os dois grupos ($p=0,04$). No foram observadas diferenas significativas quando a amostra foi separada de acordo com a escala de *Gleason* (Tabela 5 – $p=0,26$) ou por idade (Tabela 6 – $p=0,45$).

Tabela 4 – Freqncia do nmero de repeties da regio polimrfica GGC do gene do receptor de andrgeno no grupo controle, pacientes com carcinoma de prstata.

Número de repetições	Controles normais	Carcinoma de próstata
≤ 16	62 (36%)	57 (48,7%)
>16	110 (64%)	60 (51,3%)
Total	172 (100%)	117 (100%)

Figura 3 – Grfico da distribuio da freqncia (%) do nmero de repeties GGC nos grupos de pacientes com carcinoma de prstata e controles normais.

Tabela 5 - Separao do nmero de repeties GGC de acordo com a escala de *Gleason*.

Número de Repetições	<i>Gleason score</i> < 7	<i>Gleason score</i> ≥ 7
≤16	21 (42,9%)	36 (55,4%)
>16	28 (57,2%)	29 (44,6%)
Total	49 (100%)	65 (100%)

Tabela 6 - Separao do nmero de repeties GGC de acordo com a idade de manifestao dos sintomas

Número de Repetições	< 65 anos	≥ 65 anos
≤16	20 (43,5%)	36 (52,2%)
>16	26 (56,5%)	33 (47,8%)
Total	46 (100%)	69 (100%)

III.4 Correlao entre as regies polimrficas CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno

A fim de verificarmos se existe alguma correlao entre as duas regies polimrficas do gene do receptor de andrgeno, realizamos uma anlise comparando o nmero de repeties CAG com o nmero de repeties GGC de cada paciente com carcinoma de prstata e cada controle normal. Os resultados obtidos podem ser observados nas Tabelas 7 e 8 e Figuras 4 e 5. Podemos observar que no grupo de pacientes com carcinoma de prstata h uma correlao significativa entre as duas regies polimrficas ($\chi^2 = 4,56$; 1 grau de liberdade; $p=0,03$), ou seja, existe uma freqncia significativamente maior de indivduos com nmero de repeties CAG menor que 22 e com nmero de repeties GGC maior que 16. Por outro lado, na anlise do grupo controle, no observamos diferena significativa entre os grupos ($\chi^2=0,05$; 1 grau de liberdade; $p=0,83$).

Tabela 7 – Correlao entre o nmero de repeties CAG com o nmero de repeties GGC do gene do receptor de andrgeno em pacientes com carcinoma de prstata.

	GGC	
CAG	≤16	>16
<22	25 (47,2%)	40 (69%)
≥22	28 (52,8%)	18 (31%)
Total	53 (100%)	58 (100%)

Tabela 8 – Correlao entre o nmero de repeties CAG com o nmero de repeties GGC do gene do receptor de andrgeno em controles normais.

CAG	GGC	
	≤ 16	> 16
< 22	33 (54,1%)	51 (51%)
≥ 22	28 (45,9%)	49 (49%)
Total	61 (100%)	100 (100%)

Figura 4 – Grfico da distribuio de frequncia (%) da correlao entre CAG/GGC em pacientes com carcinoma de prstata

Figura 5 – Grfico da distribuio de frequncia (%) da correlao entre CAG/GGC em controles normais.

IV. Discusso

IV.1 Instabilidade de microssatlites

A instabilidade de microssatlites um evento que ocorre numa freqncia de 2,5% a 43% dos casos de carcinoma de prstata (Schoenberg *et al.*, 1994; Egawa *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1995; Terrel *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 1996). Esta variabilidade de freqncia deve-se principalmente ao nmero de locos estudados por cada trabalho. A ocorrncia de dois casos de instabilidade somtica na regio polimrfica CAG do gene do receptor de andrgeno demonstra que o evento raro em pacientes brasileiros, ocorrendo em apenas cerca de 1,7% dos casos. Assim, acredita-se que falhas no mecanismo de reparo de DNA no gene do receptor de andrgeno no devem constituir o principal fator da tumorignese da prstata. Esta observao no descarta a possibilidade de uma freqncia diferente de instabilidade allica em outros locos nos pacientes brasileiros.

IV.2 Estudos de associao

Diferenas no tamanho das regies polimrficas CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno podem alterar a funo biolgica do receptor de andrgeno e, conseqentemente influenciar no desenvolvimento do carcinoma de prstata (Hardy *et al.*, 1996).

No presente trabalho no observamos diferena entre caucasides e negrides controles quanto distribuio dos alelos das regies polimrficas CAG e GGC, ao contrrio do observado em trabalhos anteriores (Coetzee & Ross, 1994; Irvine *et al.*, 1995; Sartor *et al.*, 1999). possvel que esta diferena seja decorrente da miscigenao racial da amostra aqui estudada, uma vez que h estudos recentes que sugerem que a composio gentica de negrides e caucasides brasileiros bastante semelhante (Carvalho-Silva *et al.*, 2001). Nota-se tambm que a diferena na distribuio das regies polimrficas CAG e GGC de caucasides e negrides observada na literatura bastante discreta (Coetzee & Ross, 1994; Irvine *et al.*, 1995; Sartor *et al.*, 1999). Esta observao sugere que diferenas significativas devero ser encontradas somente entre grupos tnicos com pouco grau de miscigenao.

A associao das regies polimrficas CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno foi positiva em pacientes brasileiros com carcinoma de prstata. Em relao ao polimorfismo CAG observamos uma maior freqncia de alelos com menos de 22 repeties no grupo de pacientes em relao ao grupo controle. Estes achados esto de acordo com os dados da literatura os quais nem sempre relatam diferenas

significativas entre pacientes e controles (Irvine *et al.*, 1995; Ingles *et al.*, 1997; Giovannucci *et al.*, 1997; Stanford *et al.*, 1997). Tendo em vista o grande nmero de dados disponveis na literatura, realizamos uma anlise conjunta incluindo os dados do presente trabalho (Tabela 9). Notamos contudo, que, nesta amostra global no h um excesso de pacientes com alelos <22 repeties CAG ($\chi^2=0,73$; 1 grau de liberdade; $p=0,39$) (Irvine *et al.*, 1995; Hardy *et al.*, 1996; Ingles *et al.*, 1997; Giovannucci *et al.*, 1997; Stanford *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1999). Esta observao sugere que a regio polimrfica CAG do gene do receptor de andrgeno pode no ter um papel fundamental na susceptibilidade ao carcinoma de prstata.

Ao observarmos em nossa populao uma freqncia significativamente maior de alelos com 16 ou menos repeties no grupo de pacientes com carcinoma de prstata em relao ao grupo controle, verificamos que esta diferena deve-se ao alelo de 16 repeties, ou seja, h uma maior freqncia de alelos com 16 repeties no grupo de pacientes. A anlise conjunta de todos os dados da literatura, incluindo os dados deste trabalho, confirma estes resultados ($\chi^2=12,19$; 1 grau de liberdade; $p=0,0003$) (Irvine *et al.*, 1996; Staford *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1999).

Tabela 9 – Sntese dos resultados dos diferentes estudos realizados com as regies polimrficas CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno. Os espaos em branco correspondem a dados no fornecidos nos trabalhos.

Referência	Região polimórfica CAG				Região polimórfica GGC				Correlação CAG/GGC					
	Controles		Câncer		Controles		Câncer		Controles			Câncer		
	<22	>22	<22	>22	=16	Não 16	=16	Não 16		�16	>16		�16	>16
Irvine <i>et al.</i> , 1995	76	46	38	19	55	60	30	27				<22 �22	27 17	20 3
Hardy <i>et al.</i> , 1996			37	72										
Giovanucci <i>et al.</i> , 1997	282	306	313	274										
Ingles <i>et al.</i> , 1997	101	68	38	19										
Stanford <i>et al.</i> , 1997	125	140	145	136	142	108	165	92	<22 �22	77 41	93 32	<22 �22	98 32	97 22
Edwards <i>et al.</i> , 1999	212	178	95	83	� 16 168	>16 116	� 16 110	>16 68						

Observamos uma correlao negativa significativa entre as regies polimrficas CAG e GGC no grupo de pacientes, ou seja, h uma maior proporo de alelos com menos de 22 repeties CAG e mais de 16 repeties GGC nos pacientes que nos controles. Esta observao sugere a ocorrncia de desequilbrio de ligao entre estas regies ($\Delta=|0,054|$) mantido, mesmo quando nossos dados so agrupados com aqueles publicados por Irvine *et al.* (1995) e Stanford *et al.* (1997) ($\chi^2=7,51$; 1 grau de liberdade; $p=0,0061$). Por outro lado, no observamos a associao do hapltipo <22 CAG/>16GGC com a idade de manifestao e com o valor de *Gleason* ($t=1,18$, 62

graus de liberdade, $p=0,24$; $t=0,99$, 61 graus de liberdade, $p=0,32$ respectivamente). Esta observao sugere que este hapltipo pode estar relacionado com o desenvolvimento do tumor e no com sua agressividade.

A partir de tais observaes acredita-se que a susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma de prstata estaria relacionada com o hapltipo <22 CAG/>16GGC, sendo que um indivduo com tal hapltipo teria um risco cerca de 2,5 vezes maior de vir a desenvolver carcinoma de prstata ($OR=2,49$; IC 95% 1,15-5,40). Sugerimos, portanto, que o polimorfismo GGC pode ter um papel funcional, dependente da regio polimrfica CAG, relacionado com o crescimento e/ou manuteno do tumor. Uma vez que a poliglicina codificada a partir do polimorfismo GGC est localizada no domnio de transativao, possvel que a diferena de um nico aminocido seja suficiente para interferir na afinidade do receptor e consequentemente na formao do complexo regulador da atividade dos andrgenos, ou ainda em alguma via de regulao gnica que o receptor de andrgeno participe. Rebbeck *et al.* (1999) observaram que a variabilidade da regio polimrfica CAG do gene do receptor de andrgeno est relacionada com a penetrncia da manifestao do cncer de mama em portadoras de mutaes no gene BRCA1, sugerindo mais uma vez a importncia desta regio na regulao gnica.

Este o primeiro estudo realizado com as regies polimrficas CAG e GGC do gene do receptor de andrgeno na populao brasileira. A partir dos resultados observados sugerimos que a variabilidade destas regies deve ter um papel fundamental no desenvolvimento e/ou susceptibilidade ao carcinoma de prstata tmbm na nossa populao e indica que o hapltipo <22 CAG/>16GGC que deve estar associado com a susceptibilidade ao carcinoma de prstata. Estudos funcionais do hapltipo <22 CAG/>16 GGC devem ser realizados com o objetivo de confirmar tais hipteses.

V. Referncias Bibliogrficas

- Bratt, O.; Borg, .; Kristoffersson, U.; Lundgren, R.; Zhang, Q.-X. and Olsson, H. – CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *Br. J. Cancer* **81**: 672-676, 1999.
- Carvalho-Silva, D. R.; Santos, F. R.; Rocha, J. and Pena, S. D. J. – The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 281-286, 2001.
- Chamberlain, N. L.; Driver, E. D. and Miesfeld, R. – The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucl. Acids Res.* **22**: 3181-3186, 1994.
- Coetzee, G. A. & Ross, R. K. – Re: Prostate cancer and the androgen receptor. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**: 872-873, 1994.
- Cunningham, J. M.; Shan, A.; Wick, M. J.; McDonnell, S. K.; Schaid, D. J.; Tester, D. J.; Qian, J.; Takahashi, S.; Jenkins, R. B.; Bostwick, D. G. and Thibodeau, S. N. – Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* **56**: 4475-4482, 1996.
- Eales, R. A.; Edwards, S. M.; Minter, R.; Hamoud, R.; Collins, N.; Shearer, R.; Easton, D.F.; Saunders, G. F.; Dearnaley, D. P.; Badzioch, D. – Androgen receptor polymorphisms: their association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. *Am. J. Hum. Genet.* **63**: A21 - 105, 1998.
- Edwards, S. M.; Badzioch, M. D.; Minter, R.; Hamoudi, R.; Collins, N.; Ardern-Jones, A.; Dowe, A.; Osborne, S.; Kelly, J.; Shearer, R.; Easton, D. F.; Saunders, G. F.; Dearnaley, D. P. and Eeles, R. A. – Androgen receptor polymorphisms: association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. *Int. J. Cancer* **84**: 458-465, 1999.
- Egawa, S.; Uchida, T.; Suyama, K.; Wang, C.; Otori, M.; Irie, S.; Iwamura, M and Koshiba, K - Genomic instability of microsatellite repeats in prostatic cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cancer Res.* **55**: 2418-2421, 1995.
- Elo, J. P.; Kvist, L.; Leinonen, K.; Isomaa, V.; Henttu, P.; Lukkarin, O. and Vihko, P. - Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J. Cl. End. Met.* **80**: 3493-3500, 1995.
- Estimativas da incidncia e mortalidade por cncer no Brasil. INCA – www.inca.org.br , 2001.
- Evans, B. A. J.; Harper, M. E.; Daniells, C. E.; Watts, C. E.; Matenhelia, S., Green, J. and Griffiths, K. – Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis. *Prostate* **28**: 162-171, 1996.
- Giovannucci, E.; Tampfer, M. J.; Krithivas, K.; Brown, M.; Brufsky, A.; Talcott, J.; Hennekens, C. H. and Kantoff, P. W. - The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc. Natl.Acad. Sci.* **94**: 3320-3323, 1997.
- Greenlee R.; Murray, T.; Bolden, S. and Wingo, P. – Cancer statistics, 2000. *Cancer J. Clinical* **50**: 7-33, 2000.
- Hardy, D.O.; Scher, H. I.; Bogenreider, T.; Sabbatini, P.; Zhang, Z.-F.; Nanus, M. and Catterall, J. F. – Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 4400-4405, 1996.
- Ingles, S. A.; Ross, R. K.; Yu, M. C.; Irvine, R. A.; La Pera, G.; Haile, R. W. and Coetzee, G. A. - Association of prostate cancer with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 166-170, 1997.
- Irvine, R. A.; Yu, M. C.; Ross, R. K. and Coetzee, G. A. - The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res.* **55**: 1937-1940, 1995.
- Klocker, H.; Neuschmid-Kaspar, F.; Culig, Z.; Cato, A. C. B.; Hobisch, A.; Eberle, J.; Cronauer, M. V.; Hittmair, A.; Radmayr, C.; berreiter, S.; Glatzl, J. and Bartsch, G. - Androgen receptor alterations in patients with disturbances in male sexual development and in prostatic carcinoma. *Urol. Int.* **54**: 2-5, 1995.
- Koivisto, P.; Hyytinen, E.; Palmberg, C.; Tammela, T.; Visakorpi, T.; Isola, J and Kallioniemi, O. P. - Analysis of genetic changes underlying local recurrence of prostate carcinoma during androgen deprivation therapy. *Am J. Pathol.* **147**: 1608-1614, 1995.
- Lange, E. M.; Chen, H.; Brierley, K.; Livemore, H.; Wojno, K. J.; Langefeld, C. D. and Cooney, K. A. – The polymorphic exon 1 androgen receptor CAG repeat in men with a potential

- inherited predisposition to prostate cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**: 439-42, 2000.
- Marcelli, M.; Ittmann M.; Mariani, S.; Sutherland, R.; Nigam, R.; Murthy, L.; Zhao, Y.; DiConcini, D.; Puxeddu, E.; Esen, A., Eastham, J.; Weigel, N. L. and Lamb, D. J. – Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res.* **60**: 944-949, 2000.
- Rebbeck, T. R.; Kantoff, P. W.; Krithivas, K.; Neuhausen, S.; Blackwood, M. A.; Godwin, A. K.; Daly, M. B.; Narod, S. A., Garber, J. E.; Lynch, H. T.; Weber, B. L. and Brown, M. – Modification of BRCA1-associated breast cancer risk by the polymorphic androgen-receptor CAG repeat. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 1371-1377, 1999.
- Sartor, O.; Zheng, Q. and Eastham, J. A. – Androgen receptor gene CAG repeat length varies in a race-specific fashion in men without prostate cancer. *Urology* **53**: 378-380, 1999.
- Schoenberg, M. P.; Hakimi, J. M.; Wang, S.; Bova, G. S.; Epstein, J. I.; Fischbeck, K. H.; Isaacs, W. B.; Walsh, P. C. and Barrack, E. R. – Microsatellite mutation (CAG_{24→18}) in the androgen receptor gene in human prostate cancer. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* **198**: 74-80, 1994.
- Stanford, J. L.; Just, J. J.; Gibbs, M.; Wicklund, K. G.; Neal, C. L.; Blumenstein, B. A. and Ostrander, E. A. – Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res.* **57**: 1194-1198, 1997.
- Suzuki, H.; Komiya, A.; Aida, S.; Akimoto, S.; Shiraishi, T.; Yatani, R.; Igarashi, T. and Shimazaki, J. - Microsatellite instability and other molecular abnormalities in human prostate cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* **86**: 956-961, 1995.
- Takahashi, H.; Furusato, M.; Allsbrook, Jr. W. C.; Nishii, H.; Wakui, S.; Barret, J. C. and Boyd, J. - Prevalence of androgen receptor gene mutation in latent prostatic carcinomas from Japanese men. *Cancer Res.* **55**: 1621-1624, 1995.
- Taplin, M. E.; Bubley, G. J.; Shuster, T. D.; Frantz, M. E.; Spooner, A. E.; Ogata, G. K.; Keer, H. N. and Balk, S. P. - Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N. Eng. J. Med.* **332**: 1393-1398, 1995.
- Terrel, R. B.; Wille, A. H.; Cheville, J. C.; Nystuen, A. M.; Cohen, M. B. and Sheffield, V. C. - Microsatellite instability in adrenocarcinoma of the prostate. *Am J. Pathol.* **147**: 799-805, 1995.
- Tilley, W. D., Marcelli, M., Wilson, J. D. and McPhaul, M. J. - Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 327-331, 1989.
- Visakorpi, T., Hyytinen, E., Koivisto, P., Tanner, M., Keinnen, R., Palmberg, C., Palotie, A., Tammela, T., Isola, J. and Kallioniemi, O. P. - *In vivo* amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nature Genetics* **9**: 401-406, 1995.
- Walln, M. J.; Linja, M.; Kaartinen, K.; Schleutker, J. and Visakorpi, T. – Androgen receptor gene mutations in hormone-refractory prostate cancer. *J Pathol.* **189**: 559-563, 1999.
- Watanabe, M.; Imai, H.; Shiraishi, T.; Shimazaki, J.; Kotake, T. and Yatani, R. - Microsatellite instability in human prostate cancer. *Br. J. Cancer* **72**: 562-564, 1995.

Capítulo IV

Polimorfismo do gene do receptor de vitamina D não está associado ao desenvolvimento do carcinoma de próstata em pacientes brasileiros.

Abstract

Recent studies have suggested that vitamin D is an important factor in the risk of prostate carcinoma manifestation and that the 3' untranslated region of vitamin D receptor gene (VDR) may be involved in the predisposition to the development of this kind of cancer. We analyzed the polymorphism C1171T (I352I) in exon 9 of VDR gene in 37 brazilian prostate carcinoma individuals and 192 brazilian controls. We have not observed evidence of association between this polymorphism and prostate carcinoma ($\chi^2=0,14$; 2 degrees of freedom; $p=0,93$). Even though the sample was very small, a higher frequency of allele T was observed in younger patients. A larger sample should be analyzed to confirm this observation.

Resumo

Estudos recentes têm sugerido que a vitamina D é um dos fatores determinantes no risco de manifestação do carcinoma de próstata e que os polimorfismos localizados na região 3' não traduzida do gene do receptor de vitamina D (VDR) podem estar associados com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento desta forma de câncer. Analisamos a alteração C1171T (I352I) localizada no exon 9 do gene VDR em 37 pacientes com carcinoma de próstata e 192 indivíduos controle da população brasileira. Não obtivemos evidência de associação de nenhum dos genótipos com a manifestação do carcinoma de próstata ($\chi^2=0,14$; 2 graus de liberdade; $p=0,93$). Apesar de não observarmos diferença na frequência dos genótipos entre pacientes e controles temos uma pequena evidência de que o alelo T poderia estar relacionado com uma manifestação precoce do carcinoma de próstata. Um estudo com uma amostra maior pode confirmar tal evidência.

I. Introdução

O carcinoma de próstata é a segunda principal causa de mortes relacionadas a câncer entre homens norte-americanos. Mais de 11 milhões de indivíduos da população americana apresentam lesões classificadas histologicamente como carcinoma de próstata (Blutt & Weigel, 1999). Uma vez que as taxas de carcinoma de próstata são maiores acima dos 65 anos, e a longevidade da população mundial tem aumentado nos últimos anos, acredita-se que o carcinoma de próstata tornar-se-á nos próximos anos a principal causa de mortes entre indivíduos do sexo masculino (Blutt & Weigel, 1999).

Vários fatores relacionados a um aumento de risco para o desenvolvimento do carcinoma de próstata têm sido identificados tais como idade, raça, alterações genéticas e história familiar (Carter *et al.*, 1993; Morton, 1994; Hass & Sakr, 1997). Recentemente, a deficiência de vitamina D tem sido considerada como mais um destes fatores de risco. A possibilidade de que a deficiência de vitamina D pode aumentar o risco de desenvolvimento do carcinoma de próstata foi sugerida inicialmente por Schwartz & Hulka (1990). Estes autores observaram que as taxas de mortalidade do carcinoma de próstata na população americana estavam inversamente correlacionadas à exposição à radiação ultravioleta, que é essencial para a síntese de vitamina D. Como a maior fonte de vitamina D para os americanos é a conversão de seus precursores pela luz ultravioleta, foi sugerido que indivíduos que vivem em regiões mais expostas à luz solar apresentariam uma menor susceptibilidade ao carcinoma de próstata, uma vez que teriam maiores concentrações séricas de vitamina D (Schwartz & Hulka, 1990).

Além dessa observação, tem sido verificado que a vitamina D está envolvida na regulação do crescimento e diferenciação de células da próstata, assim como de outros órgãos como mama, pâncreas e pele (Colston *et al.*, 1981; Colston *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1992; Fife *et al.*, 1997; Colston *et al.*, 1997).

A redução da capacidade de proliferação das células tumorais, quando comparada com a de células normais da próstata na presença de altos níveis de vitamina D, sugere novamente o envolvimento da vitamina D no processo de desenvolvimento do tumor da próstata (Krill *et al.*, 1999).

Para a forma ativa da vitamina D (1,25-dihidroxitamina D₃) atuar na regulação do crescimento e na diferenciação celular é necessária sua ligação com a forma nuclear de seu receptor (VDR) (Norman *et al.*, 1982). Este complexo forma um heterodímero com o receptor retinóico X (RXR), que tem a capacidade de ligar-se a

regiões promotoras de genes reguladores do ciclo celular, de uma maneira análoga à dos hormônios esteróides (Pike, 1991; Schmidt *et al.*, 1998).

O gene do receptor de vitamina D (VDR) está localizado em 12q12-q14, apresenta nove exons e regiões polimórficas tais como: microssatélite poli-A localizado na região 3' não traduzida, variante localizada no intron 8 identificada por um RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) reconhecido pela endonuclease de restrição *BsmI* e alteração C1171T (I352I) localizada no exon 9, reconhecida pela endonuclease de restrição *TaqI* (Figura 1).

Figura 1 – Região 3' do gene VDR mostrando a localização dos polimorfismos *BsmI* no intron 8, *TaqI* no exon 9, TGA - codon de parada que indica o término da região traduzida e o microssatélite poli-A na região não traduzida (extraído de Ingles *et al.*, 1998)

A associação entre estes polimorfismos e o carcinoma de próstata já foi observada em vários grupos populacionais (Ingles *et al.*, 1997; Ingles *et al.*, 1998; Kibel *et al.*, 1998; Correa-Cerro *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999; Blazer *et al.*, 2000). É interessante notar que, dado o forte desequilíbrio de ligação que estes polimorfismos apresentam entre si, os estudos realizados com cada um deles separadamente tem refletido os demais (Morrison *et al.*, 1994).

Os dois haplótipos mais comuns em caucasóides americanos são o bTL e o BtS, onde as letras minúsculas indicam a presença do sítio de restrição e L e S correspondem a alelos com 18 ou mais resíduos de alanina e alelos com menos de 18 resíduos de alanina, respectivamente. O haplótipo bTL, na maioria dos trabalhos realizados, estaria relacionado com um maior risco para o carcinoma de próstata (Taylor *et al.*, 1996; Ingles *et al.*, 1997; Kibel *et al.*, 1998; Habuchi *et al.*, 2000). Contudo, alguns estudos mostram associação de outros haplótipos com um maior risco para o desenvolvimento do carcinoma de próstata: em negróides americanos este haplótipo seria o BTL (Ingles *et al.*, 1998) e, em europeus o haplótipo tS (Correa-Cerro *et al.*, 1999). Outros estudos não encontraram associação de nenhum destes haplótipos e/ou alelos com o carcinoma de próstata (Ma *et al.*, 1998; Furuya *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1999; Blazer *et al.*, 2000).

Os estudos realizados até o momento sugerem que o receptor de vitamina D pode estar de alguma maneira, envolvido na carcinogênese da próstata. Até o momento, através dos estudos de associação realizados entre os polimorfismos da

região 3' do gene VDR e o carcinoma de próstata não foi possível a compreensão do real papel destas regiões na susceptibilidade a esta forma de câncer, uma vez que estes estudos mostram resultados conflitantes em diferentes amostras. É possível que estas diferenças estejam associadas a genes relacionados ao metabolismo da vitamina D, envolvidos com este tipo de tumor, nas diferentes populações. Além disso, talvez o gene do receptor de vitamina D não esteja envolvido diretamente no desenvolvimento desta forma de câncer. Tendo em vista estas controvérsias, julgamos importante verificar a variação de uma destas regiões polimórficas no gene VDR (C1171T) na população brasileira para confirmar ou não sua associação com a susceptibilidade ao carcinoma de próstata nesta população.

II. Pacientes e Métodos

O presente estudo consistiu na análise da alteração C1171T (I352I) em pacientes brasileiros com carcinoma de próstata e indivíduos normais e na tentativa de identificar alguma mutação associada ao polimorfismo.

II.1 Pacientes

A descrição detalhada das amostras utilizadas neste estudo é fornecida no capítulo II. Foram testadas 37 amostras de DNA extraído a partir de linfócitos de pacientes com carcinoma de próstata. A idade média dos pacientes foi de $67,2 \pm 7,4$ anos.

II.2 Controles

A amostra controle utilizada neste estudo encontra-se também descrita no capítulo II, sendo constituída de 192 indivíduos (108 caucasóides e 83 negróides) com idade média de $52,7 \pm 14,1$ anos.

II.3 Métodos

Os métodos de extração de DNA a partir de linfócitos e a partir de tecidos incluídos em blocos de parafina estão igualmente descritos no capítulo II.

II.3.1 Análise da alteração C1171T do gene do receptor de vitamina D (VDR)

A alteração C1171T do gene VDR foi analisada através de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) conforme descrito a seguir. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação desta região foram as seguintes:

Oligonucleotídeo	Seqüência	Tamanho do fragmento amplificado
VDR F	5' CAGAGCATGGACAGGGAGCAA 3'	740pb
VDR R	5' GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC 3'	

As reações de *PCR* para a amplificação da região em estudo foram feitas a partir de 200ng de DNA em um volume final de reação de 25µl, contendo 0,25mM de cada nucleotídeo, 0,3 unidades de Taq Polimerase (*Life Technologies*), 1x tampão da enzima (50mM KCl; 10mM Tris-HCl pH8,3; 0,01% gelatina), 1,5mM de MgCl₂ e 25pmol de cada oligonucleotídeo (VDR F/VDR R). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Uma desnaturação final a 72°C por 6 minutos, completa a reação. 7,5µl do produto da reação foram submetidos a uma digestão com a endonuclease *TaqI* por 1 hora a 65°C em volume final de 25µl e analisados em géis de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*) 3% corados com brometo de etídeo 0,2%. Os alelos resultantes da digestão foram denominados t quando o sítio de restrição estava presente e T quando o sítio de restrição estava ausente. Assim, é possível observarmos três diferentes genótipos: TT, Tt e tt (Figura 2).

Figura 2 – Padrão dos três diferentes genótipos observados a partir da digestão com *TaqI* do fragmento amplificado que contém a região da alteração C1171T do gene VDR. 1- Heterozigoto Tt; 2 – Homozigoto TT; 3 – Homozigoto tt.

II.3.1 Single-strand conformational polymorphism (SSCP) e seqüenciamento do gene do receptor de vitamina D (VDR)

A triagem de mutações no gene do receptor de vitamina D foi realizada a partir da seleção de amostras representativas de cada genótipo do grupo controle e do grupo de carcinoma de próstata. A descrição detalhada da técnica pode ser observada no capítulo II.

O seqüenciamento do gene foi realizado em seis amostras, sendo duas com genótipo TT, duas com genótipo Tt e duas com genótipo tt para a alteração C1171T do gene do receptor de vitamina D (uma amostra de paciente com carcinoma de próstata e uma amostra controle).

Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de cada exon para a realização do SSCP e do seqüenciamento do gene estão descritos na tabela abaixo:

Oligonucleotídeo	Seqüência	Tamanho dos fragmentos amplificados
VDR 1F	5' TCGTGCCCACTTCCTTAGAG 3'	205pb
VDR 1R	5' GAAAACAGAAAGCCAGGGAAG 3'	
VDR 2F	5' GGCCTGCTTGCTGTTCTTAC 3'	239pb
VDR 2R	5' CCCTTCATGGAAACACCTTG 3'	
VDR 3F	5' GCAGGGTGTGTGCTCTCTC 3'	210pb
VDR 3R	5' GCCTTTCCTGACTCCACTT 3'	
VDR 4F	5' AGGAGGAAGGTTTCCTGGAG 3'	268pb
VDR 4R	5' CTCCCAGCAGGCAGACATAC 3'	
VDR 5F	5' GAGACCCCATCTTTCCTTC 3'	185pb
VDR 5R	5' CCCCCTCCCTTACTCTATG 3'	
VDR 6F	5' GCTCCTTCTCTCCCTCATC 3'	228pb
VDR 6R	5' TTCCCAGAGATTGCAGAAG 3'	
VDR 7F	5' TGGTAACCTGACCTCCTTCC 3'	221pb
VDR 7R	5' AAAAGACTCCCCAGGAGGTG 3'	
VDR 8F	5' ACCTGGCCATTGTCTCTCAC 3'	240pb
VDR 8R	5' TACGTCTCCCTCAGGTTGC 3'	
VDR 9F	5' TGAGAGCTCCTGTGCCTTCT 3'	394pb
VDR 9R	5' GTGAGGAGGGCTGCTGAGTA 3'	

As reações de *PCR* para a amplificação de cada exon foram feitas a partir de 200ng de DNA em um volume final de reação de 25µl, contendo 0,25mM de cada nucleotídeo, 0,3 unidades de Taq Polimerase (*Life Technologies*), 1x tampão da enzima (50mM KCl; 10mM Tris-HCl pH8,3; 0,01% gelatina), 1,5mM de MgCl₂ e 25pmol de cada oligonucleotídeo. As amostras foram desnaturadas a 94°C por 4 minutos seguidos de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Uma desnaturação final de 72°C por 6 minutos, completa a reação.

Após a reação de *PCR* o produto foi submetido a análise por *SSCP* e em seguida ao seqüenciamento. A reação de seqüenciamento foi realizada tal como descrito no capítulo II da presente tese. Os resultados obtidos foram comparados com a seqüência do gene do receptor de vitamina D descrita no *GenBank* sob código AC004466.

III. Resultados

III.1 Alteração C1171T do gene do receptor de vitamina D (VDR)

As frequências e distribuição de cada um dos genótipos observados nos grupos controle e carcinoma de próstata podem ser observadas na tabela 1 e figura 2. Não observamos variação na distribuição dos alelos entre caucasóides e negróides no grupo controle ($p=0,75$). Assim, consideramos estes dois grupos como único para a realização das análises estatísticas subseqüentes.

A distribuição dos genótipos no grupo controle e no grupo de pacientes com carcinoma de próstata estão em proporções de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,77$; 2 graus de liberdade; $p=0,68$; $\chi^2=0,04$; 2 graus de liberdade; $p=0,98$, respectivamente). Observamos também que não há diferença na distribuição dos genótipos entre o grupo controle e o grupo de carcinoma de próstata ($\chi^2=0,14$; 2 graus de liberdade; $p=0,93$).

Tabela 1 – Frequência dos genótipos observados na alteração C1171T do gene do receptor de vitamina D no grupo controle e pacientes com carcinoma de próstata

Genótipo	Controles normais	Carcinoma de próstata
TT	76 (39,6%)	14 (37,8%)
Tt	94 (48,9%)	18 (48,6%)
tt	22 (11,5%)	5 (13,5%)
TOTAL	192 (100%)	37 (100%)

Figura 2 – Distribuição da frequência de cada um dos genótipos da alteração C1171T em pacientes com carcinoma de próstata e controles normais.

Foram realizadas análises separando as amostras de carcinoma de próstata de acordo com o *Gleason score* e a idade de manifestação da doença. Não observamos diferença significativa na distribuição dos genótipos entre os dois grupos quanto ao valor do *gleason* (<7 e ≥ 7) (Tabela 2) ($\chi^2=0,41$; 2 graus de liberdade; $p=0,82$) ou quanto a idade (indivíduos com menos de 65 anos e indivíduos com 65 anos ou mais) ($\chi^2=3,44$; 2 graus de liberdade; $p=0,18$) (Tabela 3).

Tabela 2 – Frequência dos genótipos observados na alteração C1171T do gene do receptor de vitamina D no grupo de pacientes com câncer de próstata separados de acordo com o *Gleason score*.

Genótipo	<7	≥ 7
TT	10 (41,7%)	3 (30%)
Tt	12 (50%)	6 (60%)
tt	2 (8,3%)	1 (10%)
TOTAL	24 (100%)	10 (100%)

Tabela 3 – Frequência dos genótipos observados na alteração C1171T do gene do receptor de vitamina D no grupo de pacientes com carcinoma de próstata separados de acordo com a idade.

Genótipo	<65	≥ 65
TT	7 (63,6%)	7 (30,4%)
Tt	3 (27,3%)	13 (56,5%)
tt	1 (9,1%)	3 (13,1%)
TOTAL	11 (100%)	23 (100%)

III.2 Triagem de mutação no gene do receptor de vitamina D (VDR)

Através da análise de SSCP não identificamos nenhum padrão de bandas alterado associado a qualquer dos três genótipos. A fim de confirmarmos a evidência de que não havia nenhuma mutação associada a estes, realizamos o seqüenciamento de uma amostra de cada genótipo, tanto controle como paciente. A realização do seqüenciamento do gene do receptor de vitamina D revelou que não há nenhuma alteração tanto em regiões traduzidas, assim como nas junções intron-exon que estivesse associada com qualquer um dos genótipos da alteração C1171T.

IV. Discussão

Na última década, tem sido demonstrado o envolvimento da vitamina D na regulação da proliferação celular e na diferenciação celular *in vitro* (Feldman *et al.*, 1996). Entretanto, o mecanismo molecular destes efeitos ainda não está esclarecido e os genes envolvidos neste processo, assim como aqueles ativados pelo receptor de vitamina D, ainda não foram identificados. Desta maneira, o gene que codifica o receptor de vitamina D é um potencial candidato para estar envolvido em tais processos. Vários estudos têm sugerido que o efeito da vitamina D, assim como do gene do receptor de vitamina D, pode ter um papel importante no desenvolvimento do carcinoma de próstata (Taylor *et al.*, 1996; Ingles *et al.*, 1997; Ingles *et al.*, 1998; Correa-Cerro *et al.*, 1999).

No presente trabalho, não observamos diferença significativa na frequência dos genótipos do polimorfismo C1171T entre caucasóides e negróides tanto no grupo controle como no grupo de pacientes. Taylor *et al.* (1996) e Kibel *et al.* (1998) também não observaram diferenças entre caucasóides e negróides americanos em pacientes e controles. Portanto, sugerimos que a distribuição dos genótipos do polimorfismo C1171T do gene do receptor de vitamina D não apresenta diferença entre indivíduos de diferentes grupos raciais.

Não obtivemos evidência de associação do polimorfismo C1171T com a susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma da próstata. Porém, observamos uma maior frequência de indivíduos TT no grupo de pacientes com menos de 65 anos. Esta frequência não é estatisticamente significativa, podendo ser em decorrência do pequeno tamanho da amostra. Taylor *et al.* (1996), sugeriram que o alelo T estaria relacionado com uma maior susceptibilidade ao carcinoma de próstata e Correa-Cerro *et al.* (1999) sugeriram que a maior susceptibilidade estaria associada ao alelo t, principalmente para pacientes com idade de manifestação superior a 70 anos. Um estudo com uma amostra maior seria importante para confirmar nossos resultados e tentar esclarecer esta controvérsia.

Com os estudos realizados até o presente momento, observa-se que os alelos e/ou haplótipos que apresentam associação com o desenvolvimento do carcinoma de próstata são diferentes nas várias populações estudadas, além de influenciarem diferentemente na idade de manifestação da doença e no *Gleason score* do tumor em cada população (Taylor *et al.*, 1996; Ingles *et al.*, 1997; Kibel *et al.*, 1998; Ingles *et al.*, 1998; Correa-Cerro *et al.*, 1999; Habuchi *et al.*, 2000). Ainda não está claro se estes polimorfismos estão associados a diferenças funcionais ou de abundância do receptor

de vitamina D. Verbeek *et al.* (1997) e Gross *et al.* (1998) estudando células com diferentes genótipos para os polimorfismos C1171T e polimorfismo do intron 8 reconhecido pela endonuclease BsmI, sugeriram que estes não estão relacionados com a função ou estabilidade do receptor ou ainda com o controle de expressão do gene. Portanto, estes polimorfismos poderiam ser marcadores de alguma outra alteração no próprio gene do receptor de vitamina D ou em outro gene próximo a este (Verbeek *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1998). Através do seqüenciamento do gene do receptor de vitamina D não observamos nenhuma outra alteração que pudesse confirmar a primeira hipótese levantada anteriormente.

Em conclusão, nossos dados e os da literatura são inconclusivos quanto ao envolvimento destes polimorfismos na susceptibilidade ao carcinoma de próstata. É possível que os polimorfismos da região 3' do gene do receptor de vitamina D sejam apenas marcadores de um outro gene, próximo a este, que seria responsável pela associação dos diferentes genótipos com o carcinoma de próstata.

V. Referências Bibliográficas

- Blazer, D. G.; Umbach, D. M.; Bostick, R. M. and Taylor, J. A.- Vitamin D receptor polymorphisms and prostate cancer. *Mol. Carcinog.* **27**: 18-23, 2000.
- Blutt, S. E. & Weigel, N. L. – Vitamin D and prostate cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **221**: 89-98, 1999.
- Carter, B. S.; Bova, G. S.; Beaty, T. H.; Steinberg, G. D.; Childs, B. Isaacs, W. B. and Walsh, P. C. - Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J. Urol.* **150**: 797-802, 1993.
- Colston, K. W.; Colston, J. M. and Feldman, D. – 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and malignant melanoma: The presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology* **108**: 1083-1086, 1981.
- Colston, K. W.; Berger, V. and Coombes, R. C. – Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation. *Lancet* **1**: 188-191, 1989.
- Colston, K. W.; James, S. Y.; Ofori-Kuragu, E. A., Binderup, L. and Grant, A. G. – Vitamin D receptors and antiproliferative effects of vitamin D derivatives in human pancreatic carcinoma cells *in vivo* and *in vitro*. *Br. J. Cancer* **76**: 1017-1020, 1997.
- Correa-Cerro, L.; Berthon, P.; Häussler, J.; Bochum, S.; Drelon, E.; Mangin, P.; Fournier, G.; Paiss, T.; Cussenot, O. and Vogel, W. – Vitamin D receptor polymorphisms as markers in prostate cancer. *Hum. Genet.* **105**: 281-287, 1999.
- Feldman, D.; Malloy, P. J. and Goss, C. – **Vitamin D: metabolism and action.** In: Marcus, R.; Feldman, D. and Kelsey, J. (eds) – *Osteoporosis. Academic, New York*, pp 205-235, 1996.
- Fife, R. S.; Sledge, G. W. and Proctor, C. – Effects of vitamin D₃ on proliferation of cancer cells *in vitro*. *Cancer Lett.* **120**: 65-69, 1997.
- Furuya, Y.; Akakura, K.; Masai, M. and Ito, H. – Vitamin D receptor gene polymorphism in japanese patients with prostate cancer. *Endocrine J.* **46**: 467-470, 1999.
- Gross, C.; Musiol, I. M.; Eccleshall, T. R.; Malloy, P. J. and Feldman, D. – Vitamin D receptor gene polymorphisms: analysis of ligand binding and hormone responsiveness in cultured skin fibroblasts. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* **242**: 467-473, 1998.
- Habuchi, T.; Suzuki, T.; Sasaki, R.; Wang, L.; Sato, K.; Sattoh, S.; Akao, T.; Tsuchia, N.; Shimoda, N.; Wada, Y.; Koizume, A.; Chiara, J.; Ogawa, O. and Kato, T. – Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a japanese population. *Cancer Res.* **60**: 305-308, 2000.
- Hass, G. P. & Sakr, M. D. – Epidemiology of prostate cancer. *Cancer J. Clin.* **47**: 273-287, 1997.
- Ingles, S. A.; Ross, R. K.; Yu, M. C.; Irvine, R. A.; La Pera, G.; Haile, R. W. and Coetzee, G. A. - Association of prostate cancer with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 166-170, 1997.
- Ingles, S. A.; Coetzee, G. A.; Ross, R. K.; Henderson, B. E.; Kolonel, L. N.; Crocitto, L.; Wang, W. and Haile, R. W. - Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in african-americans. *Cancer Res.* **58**: 1620-1623, 1998.
- Kibel, A. S., Isaacs, S. D.; Isaacs, W. B. and Bova, G. S. – Vitamin D receptor polymorphisms and lethal prostate cancer. *J. Urol.* **160**: 1405-1409, 1998.
- Krill, D.; Stoner, J.; Konety, B. R.; Becich, M. J. and Getzenberg, R. H. – Differential effects of vitamin D on normal human prostate epithelial and stromal cells in primary culture. *Urology* **54**: 171-177, 1999.
- Ma, J.; Stampfer, M. J.; Gann, P. H.; Hough, H. L.; Giovannucci, E.; Kelsey, K. T.; Hennekens, C. H. and Hunter, D. J. – Vitamin D receptor polymorphisms, circulating vitamin D metabolites, and risk of prostate cancer in United States physicians. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**: 385-390, 1998.
- Miller, G. J.; Stapleton, G. E.; Ferrara, J. A.; Lucia, M. S.; Pfister, S.; Hedlunt, T. E. and Upadhy, P. – The human prostatic carcinoma cell line LNCaP expresses biologically active, specific receptors for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res.* **52**: 515-520, 1992.
- Morrison, N. A.; Qi, J. C.; Tokita, A.; Kelly, P. J.; Crofts, L.; Nguyen, T. V.; Sambrook, P. N. and Eisman, J. A.- Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* **367**: 284-287, 1994.

- Morton, R. A. Jr; - Racial differences in adenocarcinoma of the prostate in North american men. *Urology* **44**: 637-645, 1994.
- Norman, A. W.; Roth, J. and Orci, L. – The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). *Endocr. Rev.* **3**: 331-366, 1982.
- Pike, J. W. – Vitamin D₃ receptors: structure and function in transcription. *Ann. Rev. Nutr.* **11**: 189-216, 1991.
- Schmidt, J.; Wittenhagen, P. and Horder, M. – Molecular effects of vitamin D on cell cycle and oncogenesis. *Ugeskr Laeger* **160**: 4411-4414, 1998.
- Schwartz, G. G. & Hulka, B. S. – Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hipotesis). *Anticancer Res.* **10**: 1307-1311, 1990.
- Taylor, A.; Hirvonen, A.; Waston, M.; Pittman, G.; Mohler, J. L. and Bell, D. A. - Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res.* **56**: 4108-4110, 1996.
- Verbeek, W.; Gombart, A. F.; Shionara, M.; Campbell, M. and Koeffler, H. P. – Vitamin D receptor: no evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the Taq I restriction enzyme polymorphism. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* **238**: 77-80, 1997.
- Watanabe, M.; Fukutome, K.; Murata, M.; Uemura, H.; Kubota, Y.; Kawamura, J. and Yatani, R. – Significance of vitamin D receptor gene polymorphism for prostate cancer risk in japanese. *Anticancer Res.* **19**: 4511-4514, 1999.

Capítulo V

Novo polimorfismo do gene da endostatina está associado com uma maior susceptibilidade ao carcinoma de próstata em pacientes brasileiros

Abstract

The prostate tumors are characterized by a high degree of vascularity and the number of microvessels has been shown to be positively correlated to a worsened prognosis. Angiogenesis, the formation of new blood vessels is promoted by several angiogenic inhibitors and activating factors. One of the most potent inhibitory factors yet described is endostatin. When present at high levels in serum, endostatin causes regression of several different kinds of tumors, including prostate carcinoma. We have performed association studies between a novel polymorphism (D104N) in endostatin gene and prostate cancer. We observed that heterozygous N104 individuals have a 2.5 times increased chance of developing prostate carcinoma as compared to homozygous D104 subjects (OR 2.4; 95% CI 1.40-4.20).

Resumo

Os tumores de próstata são caracterizados por um alto grau de vascularização, sendo que o número de microveias do tumor está diretamente relacionado com o prognóstico. A angiogênese que é o processo de formação de vasos é mediada por fatores ativadores e inibidores. Um dos mais potentes fatores anti-angiogênicos já descritos é a endostatina que, em altos níveis, leva à regressão de vários tipos de tumor, entre os quais o de próstata. No presente estudo demonstramos a associação de um novo polimorfismo (D104N) com a susceptibilidade ao carcinoma de próstata. Observamos que indivíduos heterozigotos para o polimorfismo apresentam um risco cerca de 2,5 vezes maior de desenvolver o carcinoma de próstata que indivíduos homozigotos para a forma mais comum (D104) (OR=2,4; IC 95% 1,40-4,20).

I. Introdução

O carcinoma de próstata é o tipo de câncer mais freqüentemente diagnosticado e a segunda causa de mortes relacionadas a câncer na população americana (Greenlee *et al.*, 2001). Estima-se que, apesar de 42% dos homens apresentarem carcinoma na próstata, diagnosticado através de autópsia, apenas 9,5% irão desenvolver a forma clínica da doença e 2,9% irão morrer devido ao câncer (Siegal *et al.*, 1995). Desta maneira, o desenvolvimento de testes prognósticos é essencial na identificação daqueles pacientes com susceptibilidade ao desenvolvimento do carcinoma de próstata, que poderão ser beneficiados por uma maior vigilância antes da manifestação da doença. Enquanto a maioria dos casos de carcinoma de próstata são esporádicos, existem casos familiares com um risco aumentado para parentes de indivíduos afetados (Carter *et al.*, 1992). Análises de segregação do carcinoma de próstata sugerem a ocorrência de, pelo menos, um loco principal de susceptibilidade que seria responsável pela ocorrência de aproximadamente 10% dos casos de carcinoma de próstata (Carter *et al.*, 1992). Pelo menos seis locos de susceptibilidade (5 em cromossomos autossômicos e 1 no cromossomo X) já foram mapeados através de estudos de ligação (Smith *et al.*, 1996; Berthon *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1998; Gibbs *et al.*, 1999; Berry *et al.*, 2000; Tavtigian *et al.*, 2001). Além destes possíveis genes de susceptibilidade, acredita-se que alterações em outros genes podem ser associadas com o risco e/ou progressão deste tipo de tumor em casos familiares e isolados (Irvine *et al.*, 1995; Whittemore *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1995; Ingles *et al.*, 1997; Schaid *et al.*, 1998; Ekman *et al.*, 1999).

Os tumores de próstata são caracterizados por um alto grau de vascularização (Bigler *et al.*, 1993). O grau de diferenciação histológica, assim como o número de microveias de um tumor, estão diretamente relacionados com o prognóstico do paciente (Rogatsch *et al.*, 1997; Silberman, *et al.*, 1997). A angiogênese, ou a formação de novos vasos sanguíneos, a partir do endotélio preexistente, é o passo fundamental na progressão do tumor e metástase (Hanahan & Folkman, 1996; Sasaki *et al.*, 1998). Os passos seqüenciais envolvidos na angiogênese são mediados por uma série de fatores ativadores e inibidores. Recentemente, a endostatina, um produto da clivagem do domínio C-terminal do colágeno XVIII (NC1) foi acrescentada à lista destes fatores. A endostatina induz a inibição da proliferação e migração de células endoteliais, assim como o processo da apoptose através de mecanismos ainda não compreendidos (Sasaki *et al.*, 1998; O' Reilly *et al.*, 1997; Dhanabal *et al.*, 1989; Dixelius *et al.*, 2000).

Experimentalmente, altos níveis de endostatina induzem a regressão de vários tipos de tumor sólido em diferentes órgãos de camundongos e ratos, tais como pulmão, fígado, rim, mama e próstata (O' Reilly *et al.*, 1997; Dhanabal *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 1999; Yokoyama, *et al.*, 2000; Perletti *et al.*, 2000). Além disso, pacientes com Síndrome de Down, que possuem altos níveis séricos de endostatina devido ao fato de apresentarem três cópias do gene do colágeno XVIII (Zorick, *et al.*, 2001), apresentam uma incidência reduzida na taxa de tumores de tecidos sólidos, inclusive o tumor de próstata (Hasle, *et al.*, 2000). Portanto, baixos níveis de endostatina ou a perda da função da proteína podem estar associadas com um risco aumentado no desenvolvimento de tumores em tecidos sólidos ou com um pior prognóstico da doença.

Recentemente em nosso laboratório, identificamos uma substituição de aminoácido (D104N) no domínio NC1 do colágeno XVIII, região codificadora da endostatina. A partir desta observação, levantamos a hipótese de que a presença do aminoácido asparagina no lugar do aminoácido ácido aspartico, nesta posição, poderia levar a uma perda da função da endostatina e estar associado com a progressão ou agressividade de tumores em tecidos sólidos.

II. Pacientes e Métodos

II.1 Pacientes

A descrição detalhada das amostras utilizadas neste estudo pode ser observada no capítulo II. Foram testadas 181 amostras de DNA de pacientes com carcinoma de próstata (66 amostras de linfócitos e 115 amostras de tecido tumoral incluído em parafina). A idade média dos pacientes foi de $65,8 \pm 8,1$ anos.

II.2 Controles

A amostra controle utilizada neste estudo está detalhadamente descrita no capítulo II desta tese. Foram testadas 198 amostras (106 caucasóides; 83 negróides), sendo a idade média de $52,7 \pm 14,1$ anos.

II.3 Métodos

Os métodos de extração de DNA a partir de linfócitos e a partir de tecidos incluídos em blocos de parafina estão descritos no capítulo II.

II.3.1 Análise da alteração D104N do gene do colágeno XVIII (COL18A1)

A alteração D104N do gene COL18A1 foi analisada através de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*). As amostras foram submetidas a um *PCR* com os oligonucleotídeos (COL18A1F; COL18A1R) seguido de digestão com a endonuclease de restrição *Mse*1. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação desta região estão descritas na tabela a seguir:

Oligonucleotídeo	Seqüência	Tamanho do fragmento amplificado
COL18A1F	5' CACGGTTTCTCTTCCAGGAC 3'	168pb
COL18A1R	5' CTCTCAGAGCTGCTCACACG 3'	

As reações de *PCR* para a amplificação da região em estudo foram feitas a partir de 100ng de DNA em um volume final de reação de 25µl, contendo 0,25mM de cada nucleotídeo, 0,2 unidades de *Pfx Taq* DNA Polimerase (*Life Technologies*), tampão da enzima (50mM KCl; 10mM Tris-HCl pH8,3; 0,01% gelatina), 1X realçador (*enhancer*) da enzima, 1,0mM de $MgSO_4$ e 20pmol de cada oligonucleotídeo. As

amostras foram desnaturadas a 94°C por 4 minutos seguidos de 33 ciclos de 94°C por 40 segundos, 57°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos. Uma desnaturação final a 72°C por 6 minutos, completa a reação. 7,0µl do produto da reação de *PCR* foram submetidos a uma digestão com a endonuclease de restrição *Mse1* a 37°C por 18 a 20 horas em volume final de 25µl e analisados em géis de poliacrilamida 8%, corados com nitrato de prata, conforme protocolo descrito no capítulo II da presente tese. Na presença do sítio de restrição observamos dois fragmentos de 101pb e 68pb. Os alelos resultantes da digestão foram denominados *E* quando o sítio de restrição estava presente e *e* quando o sítio de restrição estava ausente (Figura 1).

Figura 1 – Padrão dos três diferentes genótipos observados a partir da digestão com *Mse1* do fragmento amplificado que contém a região da alteração D104N do gene COL18A1. 1- Heterozigoto Ee; 2 – Homozigoto EE.

II.3.2 Dosagem dos níveis séricos da endostatina

A dosagem dos níveis séricos da endostatina foi realizada com a colaboração do Dr. Todd S. Zorick através da técnica de Elisa, utilizando o kit *Accucyte* (*Cytimmune Sciences, Inc., College Park, MD USA*). O kit usado tem uma sensibilidade de 2ng/ml, sendo a variabilidade entre medidas de no máximo 10%. Foram dosadas 13 amostras de controles normais com genótipo Ee e 13 amostras de controles normais com genótipo EE.

III. Resultados

III.1 Análise da alteração D104N do gene do colágeno XVIII (COL18A1)

As freqüências e distribuição de cada um dos genótipos observados nos grupos controle e carcinoma de próstata podem ser observadas na tabela 1 e figura 2. Não observamos diferença significativa na distribuição dos alelos entre caucasóides e negróides do grupo controle ($p=0,13$). Portanto, consideramos estes dois grupos como único para a realização das análises estatísticas subseqüentes.

Na análise dos dados da tabela 1 e figura 2 observamos que a freqüência da alteração D104N na população brasileira é de 12% e que a distribuição dos genótipos tanto no grupo controle como no grupo de pacientes se apresenta em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,82$; 2 graus de liberdade; $p=0,66$ e $\chi^2=1,82$; 2 graus de liberdade; $p=0,41$, respectivamente). Na comparação da distribuição dos genótipos entre o grupo controle e o grupo de carcinoma de próstata observamos que há uma freqüência significativamente maior do genótipo Ee no grupo de pacientes em relação ao grupo controle ($\chi^2=10,23$; 1 grau de liberdade; $p=0,0014$).

Tabela 1 – Freqüência dos genótipos observados na alteração D104N do gene do colágeno XVIII no grupo controle e pacientes com carcinoma de próstata

Genótipo	Controles normais	Carcinoma de próstata
EE	174 (87,9%)	135 (74,6%)
Ee	24 (12,1%)	45 (24,9%)
ee	0	1 (0,5%)
TOTAL	198 (100%)	181 (100%)

Figura 2 – Distribuição da freqüência de cada um dos genótipos da alteração D104N em pacientes com carcinoma de próstata e controles normais.

As amostras de carcinoma de próstata foram separadas de acordo com o *Gleason score* (<7 e ≥ 7) (Tabela 2), e também de acordo com a idade de diagnóstico da doença (indivíduos com menos de 65 anos e indivíduos com 65 anos ou mais)

(Tabela 3). Não observamos diferença estatisticamente significativa para nenhuma das classificações ($\chi^2=0,075$; 2 graus de liberdade; $p=0,78$ e $\chi^2=0,91$; 2 graus de liberdade; $p=0,64$, respectivamente).

Tabela 2 – Frequência dos genótipos observados na alteração D104N do gene do colágeno XVIII no grupo de pacientes com carcinoma de próstata separados de acordo com o *Gleason score*.

Genótipo	<7	≥7
EE	64 (76,2%)	86 (78,9%)
Ee	20 (23,8%)	23 (21,1%)
ee	0	0
TOTAL	84 (100%)	109 (100%)

Tabela 3 – Frequência dos genótipos observados na alteração D104N do gene do colágeno XVIII no grupo de pacientes com carcinoma de próstata separados de acordo com a idade.

Genótipo	<65	≥65
EE	47 (70,1%)	79 (73,2%)
Ee	20 (29,9%)	28 (25,9%)
ee	0	1(0,9%)
TOTAL	67 (100%)	108 (100%)

III.2 Concentração sérica de endostatina

A concentração média dos níveis séricos da endostatina entre os indivíduos do grupo controle que apresentam genótipo Ee foi de $17,38 \pm 5,55$ ng/ml, enquanto que nos indivíduos que apresentam genótipo EE foi de $17,17 \pm 5,99$ ng/ml.

IV. Discussão

A angiogênese é uma das principais etapas de desenvolvimento e crescimento de um tumor (Battegy, 1995). Este processo é resultado de um balanço entre ativadores e inibidores da angiogênese. A endostatina é um dos mais potentes fatores de inibição da angiogênese já descritos na literatura (O' Reilly *et al.*, 1997). Porém, até o presente momento não se conhece qual o mecanismo de ação desta proteína neste processo (O' Reilly *et al.*, 1997; Dhanabal *et al.*, 1989).

No presente estudo estamos demonstrando pela primeira vez uma possível associação entre um polimorfismo presente no gene da endostatina e o carcinoma de próstata. Observamos uma maior frequência da alteração D104N em pacientes com carcinoma de próstata que em controles normais. Este polimorfismo parece aumentar em cerca de 2,5 vezes a susceptibilidade de um indivíduo a desenvolver o carcinoma de próstata ($OR=2,4$; IC 95%= 1,40-4,20). O fato de não observarmos correlação da alteração D104N com a idade de manifestação da doença e o valor de *Gleason*, sugere que esta mutação pode estar principalmente associada com o desenvolvimento do tumor e não com a sua agressividade. Recentemente, Musso *et al.* (2001) observaram uma redução de cerca de duas vezes nos níveis de colágeno XVIII em pacientes com tumores hepatocelulares (HCCs) recorrentes. Esta observação corrobora com a hipótese de que indivíduos com altos níveis de endostatina estariam menos susceptíveis ao desenvolvimento de tumores em tecidos sólidos.

O fato de não observarmos diferença nos níveis séricos de endostatina entre indivíduos homozigotos para o alelo selvagem e indivíduos heterozigotos sugere que a alteração D104N não está relacionada com a estabilidade de proteína. Esta hipótese está de acordo com análises da estrutura da endostatina realizadas por Dr. Paulo H. C. Godoi e Dr. Glaucius Oliva, pesquisadores dos Institutos de Química e de Física de São Carlos/SP, respectivamente (Iughetti *et al.*, 2001). O aminoácido D104 está localizado na superfície da molécula, uma região altamente conservada entre o colágeno XVIII de camundongos e de humanos. A partir de tal observação sugerimos que a região contendo o aminoácido D104 possa representar um novo sítio de ligação da endostatina que poderia estar envolvido com vários processos celulares relacionados com a tumorigênese, entre os quais o processo de apoptose (Iughetti *et al.*, 2001). A existência de um novo sítio de interação da endostatina é sugerida a partir da observação de que a inibição da migração de células endoteliais induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) não é dependente do sítio de ligação atualmente conhecido desta proteína (Sasaki *et al.*, 1998).

Portanto, a partir de tais observações sugerimos que a alteração D104N é um indicador da diminuição da atividade anti-angiogênica da endostatina no processo de angiogênese da próstata. Estudos funcionais da forma mutante da endostatina, assim como a análise da alteração D104N em outras populações, devem ser realizados a fim de confirmarmos tais hipóteses.

V. Referências Bibliográficas

- Battegry, E. J. – Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J. Mol. Med.* **73**: 333-346, 1995.
- Berry, R., Schoeder, J. J., French, A. J., McDonnell, S. K., Peterson, B. J., Cunningham, J. M., Thibodeau, S. N. and Schaid, D. J. – Evidence for a prostate cancer-susceptibility locus on chromosome 20. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 82-91, 2000.
- Berthon, P., Valeri, A., Cohen-Akenine, A., Drelon, E., Paiss, T., Wöhr, G., Latil, A., Millasseau, P., Mellah, I., Cohen, N., Blanché, H., Bellané-Cahntelot, C., Demenais, F., Teillac, P., Duc, A., L., Petriconi, R., Hautmann, R., Chumakov, I., Bachner, L., Maitland, N. J., Lidereau, R., Vogel, W., Fournier, G., Mangin, P., Cohen, D. and Cussenot, O. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 1416-1424, 1998.
- Bigler, S. A.; Deering, R. E. and Brawer, M. K. - Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum. Pathol.* **24**: 220-226, 1993.
- Carter, B. S.; Beaty, T. H.; Steinberg, G. D.; Childs, B. and Walsh, P. C. - Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 3367-3371, 1992.
- Dhanabal, M.; Ramchandran, R.; Waterman, M. J. F.; Lu, H.; Knebelmann, B.; Segal, M. and Sukhatme, V. P. – Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 11721-11726, 1999.
- Dhanabal, M.; Ramchandran, R.; Volk, R.; Stillman, I. E.; Lombardo, M.; Iruela-Arispe, M. L.; Simons, M. and Sukhatme, V. P. – Endostatin: yeast production, mutanys, and tumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **59**: 189-197, 1999.
- Dixlexius, J.; Larsson, H.; Sassaki, T.; Holmqvist, K.; Lu, L.; Engstrom, A.; Welsh, M. and Claesson-Welsh, L. – Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* **95**: 3403-3411, 2000.
- Ekman, P.; Grönberg, H.; Matsuyama, H.; Kivineva, M.; Gergerheim, Ulf S. R. and Li, C. – Links between genetic and enviromental factors and prostate cancer risk. *Prostate* **39**: 262-268, 1999.
- Gibbs, M., Stanford, J. L., McIndoe, R. A., Jarvik, G. P., Kolb, S., Goode, E. L., Chakrabarti, L., Schuster, E. F., Buckley, V. A., Miller, E. L., Brandzel, S., Li, S., Hood, L. and Ostrander, E. A. - Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 776-787, 1999.
- Greenlee, R. T.; Hill-Harmon, M. B.; Murray, T. and Thun, M. – Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J. Clin.* **51**: 15-36, 2001.
- Hanahan, D. & Folkamn, J. - Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364, 1996.
- Hasle, H.; Clemmensen, I. H. and Mikkelsen, M. – Risk of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet* **355**: 165-169, 2000.
- Ingles, S. A.; Ross, R. K.; Yu, M. C.; Irvine, R. A.; La Pera, G.; Haile, R. W. and Coetzee, G. A. - Association of prostate cancer with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 166-170, 1997.
- Irvine, R. A.; Yu, M. C.; Ross, R. K. and Coetzee, G. A. - The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res.* **55**: 1937-1940, 1995.
- Iughetti, P.; Suzuki, O.; Godoi, P. H. C.; Alves, V. A. F.; Setié, A.; Zorick, T.; Soares, F.; Camargo, A.; Moreira, E. S.; di Loreto, C.; Moreira-Filho, C. A.; Simpson, A.; Oliva, G. and Passos-Bueno, M. R. – A polymorphism in endostatin, na angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocracinoma. *Submitted in Cancer Research*, 2001.
- Musso, O.; Rehn, M.; Theret, N.; Turlin, B.; Bioulac-Sage, P.; Lotrian, D.; Campion, J.P.; Pihlajaniemi, T. and Clement, B. - Tumor progression is associated with a significant decrease in the expression of the endostatin precursor collagen XVIII in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* **61**: 45-49, 2001.
- O' Reilly M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J. - Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**: 277-285, 1997.

- Perletti, G.; Concarri, P.; Giardini, R.; Marras, E.; Piccinini, F.; Folkman, J. and Chen, L. - Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Res.* **60**: 1793-1796, 2000.
- Rogatsch, H.; Hittmair, A.; Reissigl, A.; Mikuz, G. and Feichtinger, H. - Microvessel density in core biopsies of prostatic adenocarcinoma: a stage predictor? *J. Pathol.* **182**: 205-210, 1997.
- Sasaki, T.; Fukai, N.; Mann, K.; Göhring, W.; Olsen, B. R. and Timpl, R. - Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* **17**: 4249-4256, 1998.
- Schaid, D. J., McDonnell, S. K., Blute, M. L. and Thibodeau, S. N. - Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 1425-1438, 1998.
- Siegel, J. A.; Yu, E. and Brawer, M. K. - Topography of neovascularity in human prostate carcinoma. *Cancer* **75**: 2545-2551, 1995.
- Silberman, M. A.; Partin, A. W.; Veltri, R. W. and Epstein, J. I. - Tumor angiogenesis correlates with progression after radical prostatectomy but not with pathologic stage in gleason sum 5 to 7 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* **79**: 772-779, 1997.
- Smith, J. R.; Freije, D.; Carpten, J. D.; Grönberg, H.; Xu, J.; Isaacs, S.D.; Brownstein, M. J.; Bova, G. S.; Guo, H.; Bujnovszky, P.; Nusskern, D. R.; Damber, J-E; Berg, A.; Emanuelsson, M.; Kallioniemi, O. P.; Walker-Daniels, J.; Bailey-Wilson, J. E.; Beaty, T. H.; Meyers, D. A.; Walsh, P. C.; Collins, F. S.; Trent, J. M. and Isaacs, W. B. - Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* **274**: 1371-1374, 1996.
- Takahashi, S.; Shan, A. L.; Ritland, S. R.; Delacey, K. A.; Bostwick, D. G.; Lieber, M. M.; Thibodeau, S. N. and Jenkis, R. B. - Frequent loss of heterozygosity at 7q31.1 in primary prostate cancer is associated with tumor aggressiveness and progression. *Cancer Res.* **55**: 4114-4119, 1995.
- Tavitigian, S. V., Simard, J., Teng, D. H. F., Abtin, V., Baungard, M., Beck, A., Campi, N. J., Carillo, A. R., Chen, Y., Dayananth, P., Desrochers, M., Dumont, M., Farnham, J. M., Frank, D., Frye, C., Ghaffari, S., Gupte, J. S., Hu, R., Iliev, D., Janecki, T., Kort, E. N., Laity, K. E., Leavitt, A., Leblanc, G., McArthur-Morrison, J., Pederson, A., Reid, J. E., Richards, S., Schroeder, M., Smith, R., Snyder, S. C., Swedlund, B., Swensen, J., Thomas, A., Tranchant, M., Woodland, A-M., Labrie, F., Skolnick, M. H., Neuhausen, S., Rommens, J. and Cannon-Albright, L. A. - A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nature Genetics* **27**: 172-180, 2001.
- Whittemore, A. S. ; Wu, A. H.; Kolonel, L. N.; John, E. M.; Gallagher, R. P.; Howe, G. R.; West, D. W.; Teh, C. Z. and Stamey, T. - Family history and prostate cancer risk in black, white and asian men in the United States and Canada. *Am. J. Epidemiol.* **141**: 732-740, 1995.
- Xu, J., Meyers, D., Freije, D., Isaacs, S., Wiley, K., Nusskern, D., Ewing, C., Wilkens, E., Bujnovsky, P., Bova, G. S., Walsh, P., Isaacs, W., Schleutker, J., Matikainen, M., Tammela, T., Visakorpi, T., Kallioniemi, O. P., Berry, R., Schaid, D., French, A., McDonnell, S., Schoeder, J., Blute, M., Thibodeau, S., Grönberg, H., Emanuelsson, M., Damber, J-E., Bergh, A., Jonsson, B-A., Smith, J., Bailey-Wilson, J., Carpten, J., Stephan, D., Gillanders, E., Amundson, I., Kainu, T., Freas-Lutz, D., Baffoe-Bonnie, A., Aucken, A. V., Sood, R., Collins, F., Brownstein, M. and Jeffrey, T. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nature Genetics* **20**: 175-179, 1998.
- Yokoyama, Y.; Green, J. E.; Sukhatme, V. P. and Ramakrishnan, S. - Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinomas in a transgenic mouse model. *Cancer Res.* **60**: 4362-4365, 2000.
- Yoon S. S.; Eto, H.; Lin, C-M.; Nakamura, H.; Pawlik, T. M.; Song, S. U. and Tanabe, K. K. - Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases. *Cancer Res.* **59**: 6251-6256, 1999.
- Zorick, T. S.; Mustacchi, Z.; Bando, S. Y.; Zatz, M.; Moreira-Filho, C. A.; Olsen, B. and Passos-Bueno, M. R. - High serum endostatin levels in patients with Down's syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumors. *Submitted in EJHG*, 2001.

Capítulo VI

Polimorfismos nos genes *MXI1* e *p53* não estão associados com a susceptibilidade ao carcinoma de próstata em pacientes brasileiros

Abstract

In the process of tumorigenesis, the inactivation of tumor suppressor genes is one of the most important events involved in the initiation of cellular transformation. In prostate tumors, a low frequency of mutations in *p53* and *MXI1* genes has already been described. We analyzed the polymorphic region AAAAC, in the 3' untranslated region of *MXI1* gene and the polymorphism Pro72Arg of *p53* gene to verify if there is an association of these regions with prostate carcinoma. We have not observed any difference in the genotypes distribution between prostate carcinoma patients and controls in these regions. Our findings suggest that these regions are not associated with the predisposition to prostate carcinoma in Brazilian population.

Resumo

No processo de transformação tumoral a inativação dos genes supressores de tumor é um dos principais eventos que levam ao início da transformação celular. Nos tumores de próstata já foram descritas mutações nos genes *p53* e *MXI1*, porém em baixa frequência. Analisamos a região polimórfica AAAAC localizada na região 3' não traduzida do gene *MXI1* e o polimorfismo Pro72Arg do gene *p53* na tentativa de verificar se há associação destas regiões com uma maior susceptibilidade ao carcinoma de próstata. Não observamos diferença na distribuição dos genótipos entre pacientes e controles para nenhuma das regiões estudadas. Esta observação sugere que estas regiões não estão relacionadas com o carcinoma de próstata na população brasileira.

I. Introdução

Atualmente, estima-se que cerca de 50% dos homens da população americana irão desenvolver a forma latente do carcinoma de próstata em algum momento de sua vida. Por outro lado, a forma clínica é diagnosticada em 1 a cada 11 homens, sendo que, cerca de 30% destes homens virão a morrer devido a doença (Konishi *et al.*, 1997). Apesar da importância clínica da doença, pouco se sabe a respeito dos eventos genéticos envolvidos com sua manifestação. Estudos citogenéticos e moleculares desenvolvidos na última década têm sugerido que o processo de transformação tumoral é uma consequência de múltiplos eventos genéticos. Neste processo, a inativação de genes supressores de tumor, aparentemente, é um dos principais eventos na iniciação da transformação celular. Várias mutações em genes supressores de tumor tais como o gene do retinoblastoma, o p53 e o MXI1 já foram descritas em tumores de próstata (Bookstein *et al.*, 1993; Effert *et al.*, 1993; Dinjens *et al.*, 1994; Albarosa *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1995; Eagle *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1995; Konishi *et al.*, 1995a; Konishi *et al.*, 1995b; Kubota *et al.*, 1995; Moyret-Lalle *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1996; Kawamata *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996; Wechsler *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1997; Schlechte *et al.*, 1998).

O gene MXI1 está localizado na região 10q24-25, apresenta 6 exons e duas regiões polimórficas, sendo uma repetição CA no intron 3 e uma repetição AAAAC na região 3' não traduzida do exon 6 (Gray *et al.*, 1995; Albarosa *et al.*, 1995; Wechsler *et al.*, 1996). Este gene é responsável pela produção da proteína Mxi1 que regula a proteína Max que por sua vez tem a capacidade de formar heterodímeros com as proteínas Myc. Uma vez que as proteínas Myc são proteínas responsáveis pela transformação oncogênica (Albarosa *et al.*, 1995) e a proteína Mxi1 está relacionada com a regulação negativa da atividade de Myc, a Mxi1 tem, potencialmente, a função de supressor de tumor (Eagle *et al.*, 1995). Estudos de identificação de mutações neste gene são controversos: enquanto Eagle *et al.* (1995) e Prochownik *et al.* (1998) identificaram mutações patogênicas em cerca de 40% das amostras de tumores estudadas, vários outros estudos não identificaram nenhuma mutação em amostras de tumores de próstata (Gray *et al.*, 1995; Kawamata *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1997; Kuczyk *et al.*, 1998). Portanto, ainda é incerto o envolvimento deste gene na patogênese do tumor de próstata.

O gene p53, localizado em 17p13, apresenta 11 exons e codifica uma proteína supressora de crescimento e transformação celular (Levine *et al.*, 1991; Zambetti & Levine, 1993; Agarwal *et al.*, 1998). Vários estudos têm buscado uma correlação entre mutações no gene p53 e o desenvolvimento do carcinoma de próstata, sendo a média

da frequência de mutações observadas de 17% (Bookstein *et al.*, 1993; Effert *et al.*, 1993; Dinjens *et al.*, 1994; Konishi *et al.*, 1995a; Konishi *et al.*, 1995b; Moyret-Lalle *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996; Schlechte *et al.*, 1998).

Quando o gene *p53* foi identificado e clonado observou-se uma maior frequência da mutação Pro72Arg em indivíduos com diversas formas de câncer (Matlashewski *et al.*, 1987; Levine *et al.*, 1991; Weston *et al.*, 1992). Através de estudos funcionais realizados com as duas variantes da proteína não foi observada nenhuma diferença nas atividades funcionais destas (Moreau & Matlashewski, 1992). Porém, demonstrou-se a associação do polimorfismo prolina com uma maior susceptibilidade ao câncer de pulmão (Kawajari *et al.*, 1993). Além disso, Wu *et al.* (1995) analisaram a frequência de cada uma das formas da proteína *p53* em pacientes com carcinoma renal, câncer urotelial, câncer de testículo e carcinoma de próstata e observaram uma associação do polimorfismo prolina apenas nos casos de câncer urotelial e câncer renal. Como estas duas formas de câncer estão relacionadas ao tabagismo e as outras duas (testículo e próstata) não, os autores sugerem que o polimorfismo prolina poderia estar relacionado apenas com tumores associados ao tabagismo (Wu *et al.*, 1995).

A natureza heterogênea dos tumores de próstata não permite uma interpretação clara dos eventos envolvidos no desenvolvimento do carcinoma de próstata. Assim, dada a importância dos genes supressores de tumor no desenvolvimento desta forma de câncer em outras populações estudamos uma região polimórfica em cada um destes genes (AAAAC no gene *MXI1* e Pro72Arg no gene *p53*) na tentativa de verificarmos se existe uma associação destas regiões com a susceptibilidade ao carcinoma de próstata na população brasileira.

II. Pacientes e Métodos

II.1 Pacientes

A descrição detalhada das amostras utilizadas no estudo dos dois polimorfismos analisados pode ser observada no capítulo II.

II.1.1 Polimorfismo AAAAC do gene MXI1

Para este polimorfismo foram testadas 89 amostras de DNA de pacientes com carcinoma de próstata (28 amostras de linfócitos e 61 amostras de tecido tumoral incluído em parafina). A idade média dos pacientes foi de $66,4 \pm 7,6$ anos.

II.1.2 Polimorfismo Pro72Arg do gene p53

Para este polimorfismo foram testadas 37 amostras de DNA extraído a partir de linfócitos de pacientes com carcinoma de próstata. A idade média dos pacientes foi de $67,4 \pm 7,5$ anos.

II.2 Controles

A amostra controle utilizada neste estudo está detalhadamente descrita no capítulo II desta tese. Para o polimorfismo AAAAC do gene *MXI1* foram testadas 180 amostras (96 caucasóides; 75 negróides), sendo a idade média $53,3 \pm 14,4$ anos. Na análise do polimorfismo Pro72Arg do gene *p53* foram estudadas 134 amostras (69 caucasóides; 56 negróides), sendo a idade média $53,4 \pm 13,9$ anos.

II.3 Métodos

Os métodos de extração de DNA a partir de linfócitos e a partir de tecidos incluídos em bloco de parafina estão descritos no capítulo II.

II.3.1 Análise das regiões polimórficas AAAAC do gene MXI1 e Pro72Arg do gene p53

Ambas regiões polimórficas foram analisadas através de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*). As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação destas regiões estão descritas na tabela a seguir:

Oligonucleotídeo	Seqüência	Tamanho
polMxi1F	5' GGGTTCATGATGCAGTCTCCTC 3'	110pb
polMxi1R	5' GGTCTCTGACCCCTTTTGTTC 3'	
polp53 F	5' TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC 3'	199pb
polp53 R	5' TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA 3'	

As reações de *PCR* para a amplificação do polimorfismo AAAAC do gene MXI1 foram feitas a partir de 50ng de DNA em um volume final de reação de 25µl, contendo 0,25mM de cada nucleotídeo, 0,2 unidades de *Taq* Polimerase (*Life Technologies*), 1x tampão da enzima (50mM KCl; 10mM Tris-HCl pH8,3; 0,01% gelatina), 1,5mM de MgCl₂ e 30pmol de cada oligonucleotídeo (polMXI1 F/polMXI1 R). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de 95°C por 45 segundos, 63°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. Uma desnaturação final de 72°C por 6 minutos, completa a reação. Esta região pode apresentar dois alelos, sendo um com 4 repetições AAAAC e outro com 5 repetições AAAAC. Os produtos da reação de *PCR* foram analisados em géis de poliacrilamida 6,5% com uréia 7M, corados com nitrato de prata, conforme protocolo descrito no capítulo II. Após uma primeira análise, as amostras foram reagrupadas de acordo com o tamanho dos alelos, sendo que aquelas que apresentaram o mesmo padrão de migração foram submetidas lado a lado a uma nova eletroforese. Assim, foi determinado quais amostras eram homozigotas para 4 repetições AAAC, quais eram heterozigotas com 4 e 5 repetições AAAAC e quais eram homozigotas com 5 repetições AAAAC. Um exemplo de cada um dos genótipos pode ser observado na figura 1.

Figura 1 – Padrão dos três diferentes genótipos observados a partir da amplificação da região polimórfica AAAAC do gene *MXI1*. 1- Homozigoto 55; 2 – Heterozigoto 45; 3 – Homozigoto 44.

As reações de *PCR* para amplificação da região polimórfica Pro72Arg do gene *p53* foram feitas a partir de 100ng de DNA em um volume final de reação de 25μl, contendo 0,2mM de cada nucleotídeo, 0,2 unidades de *Taq* Polimerase (*Life Technologies*), 1x tampão da enzima (50mM KCl; 10mM Tris-HCl pH8,3; 0,01% gelatina), 1,5mM de MgCl₂ e 25pmol de cada oligonucleotídeo (polp53 F/polp53 R). As amostras foram desnaturadas a 95°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto seguidos de uma desnaturação final de 72°C por 6 minutos. 15μl do produto da reação de *PCR* foram submetidos a uma digestão com a endonuclease de restrição *Bst*UI por 18-20 horas a 60°C em volume final de 20μl e analisados em géis de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*) 3% corados com brometo de etídeo 0,2%. Os alelos resultantes da digestão foram denominados Pro quando o sítio de restrição estava presente e Arg quando o sítio de restrição estava ausente. Assim, foi possível observarmos três diferentes genótipos: Arg/Arg, Arg/Pro e Pro/Pro (Figura 2).

Figura 2 – Padrão dos três diferentes genótipos observados a partir da digestão com *Bst*UI do fragmento amplificado que contém a região da alteração Pro72Arg do gene *p53*. 1- Heterozigoto Arg/Pro; 2 – Homozigoto Pro/Pro; 3 – Homozigoto Arg/Arg.

III. Resultados

III.1 Região polimórfica AAAC do gene MXI1

As frequências e distribuição de cada um dos genótipos observados nos grupos controle e carcinoma de próstata podem ser observadas na tabela 1 e figura 3. Não foi observada nenhuma variação na distribuição dos alelos entre caucasóides e negróides no grupo controle ($p=0,28$). Portanto, estes dois grupos foram considerados como um único grupo para a realização das análises estatísticas subsequentes.

A distribuição dos genótipos tanto no grupo controle como no grupo de pacientes apresenta-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,41$; 2 graus de liberdade; $p=0,82$; $\chi^2=0,006$; 2 graus de liberdade; $p=0,99$, respectivamente). Não observamos diferença significativa na distribuição dos genótipos entre o grupo controle e o grupo de carcinoma de próstata ($\chi^2=0,65$; 2 graus de liberdade; $p=0,72$).

Tabela 1 – Frequência dos genótipos observados na região polimórfica AAAAC do gene MXI1 no grupo controle e pacientes com carcinoma de próstata.

Genótipo	Controles normais	Carcinoma de próstata
44	33 (18,3%)	20 (22,5%)
45	93 (51,7%)	44 (49,4%)
55	54 (30%)	25 (28,1%)
TOTAL	180 (100%)	89 (100%)

Figura 3 – Distribuição da frequência de cada um dos genótipos da região polimórfica AAAAC do gene MXI1 em pacientes com carcinoma de próstata e controles normais.

Realizamos duas diferentes análises com as amostras de carcinoma de próstata: as amostras foram separadas de acordo com o *Gleason score* e a idade de manifestação da doença. Não foi observada diferença significativa na distribuição dos genótipos separados de acordo com o *Gleason score* (Tabela 2) ($\chi^2=1,23$; 2 graus de liberdade; $p=0,54$) nem com a idade de manifestação (Tabela 3) ($\chi^2=2,69$; 2 graus de liberdade; $p=0,26$).

Tabela 2 – Frequência dos genótipos observados na região polimórfica AAAAC do gene MXI1 no grupo de pacientes com carcinoma de próstata separados de acordo com o *Gleason score*.

Genótipo	<7	≥7
44	10 (25%)	10 (22,2%)
45	21 (52,5%)	20 (44,4%)
55	9 (22,5%)	15 (33,3%)
TOTAL	40 (100%)	45 (100%)

Tabela 3 – Frequência dos genótipos observados na região polimórfica AAAAC do gene MXI1 no grupo de pacientes com carcinoma de próstata separados de acordo com a idade.

Genótipo	<65	≥65
44	10 (31,2%)	10 (18,9%)
45	12 (37,6%)	29 (54,7%)
55	10 (31,2%)	14 (26,4%)
TOTAL	32 (100%)	53 (100%)

III.2 Polimorfismo Pro72Arg do gene p53

As frequências e distribuição de cada um dos genótipos observados nos grupos controle e carcinoma de próstata estão descritos na tabela 4 e figura 4. Não observamos nenhuma variação na distribuição dos alelos entre caucasóides e negróides no grupo controle ($p=0,71$) e consideramos então, estes dois grupos como um único grupo para a realização das análises estatísticas subsequentes.

A distribuição dos genótipos tanto no grupo controle como no grupo de pacientes está em proporções de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,003$; 2 graus de liberdade; $p=0,99$; $\chi^2=0,76$; 2 graus de liberdade; $p=0,68$, respectivamente). Não observamos diferença significativa na distribuição dos genótipos entre o grupo controle e o grupo de carcinoma de próstata ($\chi^2=1,41$; 2 graus de liberdade; $p=0,49$).

Tabela 4 – Frequência dos genótipos observados com polimorfismo Pro72Arg do gene *p53* no grupo controle e pacientes com carcinoma de próstata.

Genótipo	Controles normais	Carcinoma de próstata
Arg/Arg	57 (42,5%)	18 (52,9%)
Arg/Pro	61 (45,5%)	12 (35,3%)
Pro/Pro	16 (11,9%)	4 (11,8%)
TOTAL	134 (100%)	34 (100%)

Figura 4 – Distribuição da frequência de cada um dos genótipos do polimorfismo Pro72Arg do gene *p53* em pacientes com carcinoma de próstata e controles normais.

Quando analisamos as amostras de carcinoma de próstata separadas de acordo com o *Gleason score* e a idade de manifestação da doença não observamos diferença significativa na distribuição dos genótipos (Tabela 5) ($\chi^2=5,62$; 2 graus de liberdade; $p=0,06$) e (Tabela 6) ($\chi^2=0,04$; 2 graus de liberdade; $p=0,98$).

Tabela 5 – Frequência dos genótipos observados com o polimorfismo Pro72Arg do gene *p53* no grupo de pacientes com carcinoma de próstata separados de acordo com o *Gleason score*.

Genótipo	<7	≥7
Arg/Arg	8 (36,4%)	9 (90%)
Arg/Pro	10 (45,4%)	1 (10%)
Pro/Pro	4 (18,2%)	0
TOTAL	22 (100%)	10 (100%)

Tabela 6 – Frequência dos genótipos observados com o polimorfismo Pro72Arg do gene *p53* no grupo de pacientes com carcinoma de próstata separados de acordo com a idade.

Genótipo	<65	≥65
Arg/Arg	5 (55,6%)	12 (54,5%)
Arg/Pro	3 (33,3%)	7 (31,8%)
Pro/Pro	1 (11,1%)	3 (13,4%)
TOTAL	9 (100%)	22 (100%)

IV. Discussão

O processo de transformação tumoral envolve múltiplos eventos genéticos entre os quais a inativação de genes supressores de tumor. Esta inativação, na maioria dos casos, está relacionada em um primeiro momento, com a perda de um alelo de um gene supressor de tumor. As regiões 10p e 17q, nas quais estão localizados respectivamente os supressores de tumor *MXI1* e *p53*, apresentam perdas alélicas em cerca de 20% dos tumores de próstata (Carter *et al.*, 1990; Lundgren *et al.*, 1992; Konishi *et al.*, 1995a; Isaacs *et al.*, 1995). Como a taxa de mutação destes dois genes, em tumores de próstata, é relativamente baixa no gene *p53* e controversa no gene *MXI1*, acredita-se que algum outro evento genético possa estar relacionado com a inativação do segundo alelo destes genes (Bookstein *et al.*, 1993; Effert *et al.*, 1993; Dinjens *et al.*, 1994; Eagle *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1995; Konishi *et al.*, 1995a; Konishi *et al.*, 1995b; Moyret-Lalle *et al.*, 1995; Brooks *et al.*, 1996; Kawamata *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1997; Kuczyk *et al.*, 1998; Prochownik *et al.*, 1998; Schlechte *et al.*, 1998). Analisamos uma região polimórfica no gene *MXI1* e o polimorfismo Pro72Arg no gene *p53* na tentativa de observarmos se há associação destas regiões com a susceptibilidade ao carcinoma de próstata em pacientes brasileiros.

Ao analisarmos a região polimórfica AAAAC do gene *MXI1*, não observamos diferença na distribuição dos genótipos entre controles e afetados, assim como nas classificações de acordo com a idade de manifestação ou com o *Gleason score*. Estas observações sugerem que a região polimórfica AAAAC do gene *MXI1* não está envolvida com o desenvolvimento e/ou uma maior susceptibilidade ao carcinoma de próstata. Como a região 10q23-25 apresenta alta frequência de perda alélica em tumores de próstata (Gray *et al.*, 1995) e o gene *MXI1*, aparentemente, não tem forte influência sobre a manifestação do carcinoma de próstata, acreditamos que outros supressores de tumor, localizados nesta região, possam ter um maior envolvimento com esta forma de câncer.

Também não foi encontrada evidência de associação com o polimorfismo Pro72Arg do gene *p53*. Uma vez que, até o presente momento, não foi estabelecida nenhuma correlação do carcinoma de próstata com o tabagismo, nossos resultados estão de acordo com a hipótese proposta por Wu *et al.* (1995) que correlaciona a forma Pro deste polimorfismo com uma maior susceptibilidade a tumores cujo desenvolvimento está associado ao tabagismo (Wu *et al.*, 1995). Até o momento, não foi estabelecido qual o envolvimento do gene *p53* com o carcinoma de próstata.

Aparentemente, as mutações neste gene, observadas em tumores de próstata, são consequência do descontrole da divisão celular que ocorre no desenvolvimento do tumor e não uma das causas envolvidas no processo de carcinogênese da próstata.

V. Referências Bibliográficas

- Agarwal, M. L.; Taylor, W. R.; Chernov, M. V.; Chernova, O. B. and Stark, G. R. – The p53 network. *J. Biol. Chem.* **273**: 1-4, 1998.
- Albarosa, R.; DiDonato, S. and Finocchiaro, G. – Redefinition of the coding sequence of the MXI1 gene and identification of a polymorphic repeat in the 3' non-coding region that allows the detection of loss of heterozygosity of chromosome 10q25 in glioblastomas. *Hum. Genet.* **95**: 709-711, 1995.
- Brooks, J. D.; Bova, G. S. and Isaacs, W. B. - Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *Prostate* **26**: 35-39, 1995.
- Brooks, J. D.; Bova, G. S.; Ewing, C. M.; Piantadosi, S.; Carter, B. S.; Robinson, J. C.; Epstein, J. I. and Isaacs, W. - An uncertain role for p53 gene alterations in human prostate cancers. *Cancer Res.* **56**: 3814-3822, 1996.
- Brookstein, R.; MacGrogan, D.; Hilsenbeck, S. G.; Sharkey, F. and Allred, D. C. – p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res.* **53**: 3369-3373, 1993.
- Carter, B. S.; Ewing, C. M.; Ward, W. S.; Treiger, B. F.; Aalders, T. W.; Schalken, J. A.; Epstein, J. I. and Isaacs, W. B. – Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8751-8755, 1990.
- Cher, M. L.; Ito, T.; Weidner, N.; Carroll, P. R. and Jensen, R. H. - Mapping of regions of physical deletion on chromosome 16q in prostate cancer cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J. Urol.* **153**: 249-254, 1995.
- Dinjens, W. N.; van der Weinden, M. M.; Schroeder, F. H.; Bosman, F. T. and Trapman, J. – Frequency and characterization of p53 mutations in primary and metastatic human prostate cancer. *Int. J. Cancer* **56**: 630-633, 1994.
- Eagle, L. R.; Yin, X.; Brothman, A. R.; Williams, B. J.; Atkin, N. B. and Prochownik, E. V. – Mutation of the MXI1 gene in prostate cancer. *Nature Genetics* **9**: 249-255, 1995.
- Edwards, S. M.; Dearnaley, D. P.; Arden-Jones, A.; Hamoudi, R. A.; Easton, D. F.; Ford, D.; Shearer, R.; Dowe, A.; The CRC/BPG UK familial prostate cancer study collaborators and Eales, R. A. – No germline mutations in the dimerization domain of MXI1 in prostate cancer clusters. *Br. J. Cancer* **76**: 992-1000, 1997.
- Effert, P. J.; McCoy, R. H.; Walther, P. J. and Liu, E. T. – p53 gene alterations in human prostate carcinoma. *J. Urol.* **150**: 257-261, 1993.
- Emmert-Buck, M. R.; Vocke, C. D.; Pozzatti, R. O.; Duray, P. H.; Jennings, S. B.; Florence, C. D.; Zhuang, Z.; Bostwick, D. G.; Liotta, L. A. and Linehan, W. M. - Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.* **55**: 2959-2962, 1995.
- Gray, I. C.; Phillips, S. M. A.; Lee, S. J.; Neoptolemos, J. P.; Weinssensbach, J. and Spurr, N. K. – Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res.* **55**: 4800-4803, 1995.
- Isaacs, W. B.; Bova, G. S.; Morton, R. A.; Bussemakers, M. J. G.; Brooks, J. D. and Ewing, C. M. – Molecular biology of prostate cancer progression. In: **Preventing Prostate Cancer – Screening versus chemoprevention** Vol. 23 - Cold Spring Harbor Laboratory Press, 19-32, 1995.
- Kawajiri, K.; Nakachi, K.; Imai, K.; Watanabe, J. and Hayashi, S. I. – Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 gene involved in human lung cancer. *Carcinogenesis* **14**: 1085-1089, 1993.
- Kawamata, N.; Park, D.; Wilczynski, S.; Yokota, J. and Koeffler, H. P. – Point mutations of the MXI1 gene are rare in prostate cancers. *Prostate* **29**: 191-193, 1996.
- Konishi, N.; Hiasa, Y.; Matsuda, H.; Tao, M.; Tsuzuki, T.; Hayashi, I.; Kitahori, Y.; Shiraishi, T.; Yatani, R.; Shimazaki, J. and Lin, J-C – Intratumor cellular heterogeneity and alterations in ras oncogene and p53 tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. *Am. J. Pathol.* **147**: 1112-1122, 1995a.
- Konishi, N.; Hiasa, Y.; Hayashi, I.; Matsuda, H.; Tsuzuki, T.; Ming, T.; Kitahori, Y.; Shiraishi, T.; Yatani, R. and Shimazaki, J. – p53 mutations occur in clinical, but not latent, human prostate carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **86**: 57-63, 1995b.
- Konishi, N.; Cho, M.; Yamamoto, K. and Hiasa, Y. – Genetic changes in prostate cancer. *Pathol. Int.* **47**: 735-747, 1997.

- Kubota, Y.; Fujinami, K.; Uemura, H.; Dobashi, Y.; Miyamoto, H.; Iwasaki, Y.; Kitamura, H. and Shuin, T. - Retinoblastoma gene mutations in primary human prostate cancer. *Prostate* **27**: 314-320, 1995.
- Kuczyk, M. A.; Serth, J.; Bokemeyer, C.; Schwede, J. Herrmann, R.; Machtens, S.; Grunewald, V.; Hofner, K. and Jonas, U. - The MXI1 tumor supressor gene is not mutated in primary prostate cancer. *Oncol. Rep.* **5**: 213-216, 1998.
- Levine, A. J.; Momand, J. and Finlay, C. A. - The p53 tumor supressor gene. *Nature* **351**: 453-456, 1991.
- Lundgren, R.; Mandahl, N.; Heim, S.; Limon, J.; Henrikson, H. and Mitelman, F. - Cytogenetic analysis of 57 primary prostatic adenocarcinomas. *Genes Chrom. Cancer* **4**: 16-24, 1992.
- Macoska, J. A.; Trybus, T. M.; Benson, P. D.; Sakr, W. A.; Gringnon, D. J.; Wojno, K. D.; Pietruk, T. and Powell, I. J. - Evidence for three tumor supressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res.* **55**: 5390-5395, 1995.
- Matlashewski, G. J.; Tuck, S.; Pim, D.; Lamb, P.; Schneider, J. and Crawford, L. V. - Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 961-963, 1987.
- Moreau, F. & Matlashewski, G. - Molecular analysis of different allelic variants of wild-type human p53. *Biochem. Cell Biol.* **70**: 1014-1019, 1992.
- Moyret-Lalle, C.; Marçais, C.; Jacquemier, J.; Moles, J-P and Daver, A. - *ras*, *p53*, and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* **64**: 124-129, 1995.
- Murakami, Y. S.; Brothman, A. R.; Leach, R. J. and White, R. L. - Supression of malignant phenotype in a human prostate cancer cell line by fragments of normal chromosomal region 17q. *Cancer Res.* **55**: 3389-3394, 1995.
- Prochownik, E. V.; Eagle, L. G.; Deubler, D.; Zhu, X. L.; Stephenson, R. A.; Rohr, L. R.; Yin, X. and Brothman, A. R. - Commonly occurring loss and mutation of the MXI1 gene in prostate cancer. *Genes Chrom. Cancer* **22**: 1295-304, 1998.
- Schlechte, H.; Lenk, S. V.; Löning, T.; Schnorr, D.; Rudolph, B. D.; Ditscherlein, G. and Loening, S. A. - p53 tumor supressor gene mutations in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Eur. Urol.* **34**: 433-440, 1998.
- Suzuki, H.; Komiya, A.; Aida, S.; Ito, H.; Yatani, R. and Shimazaki, J. - Detection of human papillomavirus DNA and p53 gene mutations in human prostate cancer. *Prostate* **28**: 318-324, 1996.
- Takahashi, S.; Shan, A. L.; Ritland, S. R.; Delacey, K. A.; Bostwick, D. G.; Lieber, M. M.; Thibodeau, S. N. and Jenkis, R. B. - Frequent loss of heterozygosity at 7q31.1 in primary prostate cancer is associated with tumor aggressiveness and progression. *Cancer Res.* **55**: 4114-4119, 1995.
- Trapman, J.; Sleddens, H. F. B. M.; van der Weiden, M. M.; Dinjens, W. N. M.; Konig, J. J.; Schroder, F. H.; Faber, P. W. and Bosman, F. T. - Loss of heterozygosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate tumor supressor gene between the loci D8S87 and D8S133 in human prostate cancer. *Cancer Res.* **54**: 6061-6064, 1994.
- Visakorpi, T.; Kallioniemi, A. H.; Syvänen, A. C.; Hyytinen, E. R.; Karhu, R.; Tammela, T.; Isola, J. J. and Kallioniemi, O. P. - Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* **55**: 342-347, 1995.
- Wechsler, D. S.; Shelly, C. A. and Dang, C. V. - Genomic organization of human MXI1, a putative tumor supressor gene. *Genomics* **32**: 466-470, 1996.
- Weston, A.; Perrin, L. S.; Forrester, K.; Hoover, R. N.; Trump, B. F.; Harris, C. C. and Caporaso, N. E. - Allelic frequency of a p53 polymorphism in human lung cancer. *Cancer Epid. Biomarkers Prev.* **1**: 481-483, 1992.
- Wu, W-J; Kakehi, Y.; Habuchi, T.; Kinoshita, H.; Ogawa, O.; Terachi, T.; Huang, C-H; Chiang, C-P and Yoshida, O. - Alleic frequency of p53 gene codon polymorphism in urologic cancers. *Jpn. J. Cancer Res.* **86**: 730-736, 1995.
- Zambetti, D. R. & Levine, A. J. - A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J.* **7**: 855-865, 1993.

Capítulo VII

Sumário e Conclusões

No mundo inteiro, o carcinoma de próstata ocupa o quinto lugar entre as neoplasias malignas de maior mortalidade. No Brasil, estima-se para o ano de 2001 que, entre os tumores malignos no sexo masculino, o carcinoma de próstata terá a segunda maior taxa de mortalidade e a primeira taxa de incidência (Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2001 – INCA). Uma vez que a taxa de mortalidade por carcinoma de próstata na população brasileira tem aumentado significativamente nos últimos anos, a presente tese se propôs a investigar regiões polimórficas em genes conhecidos que poderiam estar associadas a um aumento na predisposição a esta forma de câncer. Assim sendo, estudamos as regiões polimórficas CAG e GGC do gene do receptor de andrógeno; o polimorfismo C1171T do gene do receptor de vitamina D; o polimorfismo D104N do gene da endostatina; o polimorfismo Pro72Arg do gene *p53* e a região polimórfica AAAAC localizada na região 3' não traduzida do gene MXI1.

Na análise das regiões polimórficas CAG e GGC do gene do receptor de andrógeno observamos uma frequência significativamente maior de alelos <22 repetições CAG ($p=0,05$) e alelos ≤ 16 repetições GGC ($p=0,04$) e a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre as duas regiões no grupo de pacientes com carcinoma de próstata. A partir de tais observações sugerimos que a predisposição a esta forma de câncer na população brasileira deve estar associada ao haplótipo <22CAG/>16GGC, que por sua vez aumentaria em cerca de 2,5 vezes a probabilidade da manifestação da doença ($OR=2,49$; IC 95% 1,15-5,40).

No estudo do polimorfismo C1171T do gene do receptor da vitamina D não obtivemos evidência de associação de nenhum dos genótipos com a manifestação do carcinoma de próstata ($\chi^2=0,14$; 2 graus de liberdade; $p=0,93$), sugerindo que este gene não deve ter um papel importante na susceptibilidade ao carcinoma de próstata na população brasileira.

Na análise do gene da endostatina demonstramos pela primeira vez a associação de um novo polimorfismo (D104N) com a susceptibilidade ao carcinoma de próstata. Observamos que indivíduos heterozigotos para o polimorfismo apresentam um risco cerca de 2,5 vezes maior de desenvolver o carcinoma de próstata que indivíduos homozigotos para a forma mais comum (D104) ($OR=2,4$; IC 95% 1,40-4,20).

Finalmente, no estudo realizado com a região polimórfica AAAAC, localizada na região 3' não traduzida do gene MXI1 e o polimorfismo Pro72Arg do gene *p53* não observamos diferença na distribuição dos genótipos entre pacientes e controles em nenhuma das regiões estudadas. Esta observação sugere que estas regiões não estão relacionadas com desenvolvimento do carcinoma de próstata na população brasileira.

Portanto, com o presente estudo foi possível demonstrarmos a associação dos genes do receptor de andrógeno e da endostatina com o desenvolvimento e/ou com a predisposição ao carcinoma de próstata em pacientes brasileiros. Este é, aparentemente, o primeiro estudo de associação realizado com o carcinoma de próstata na população brasileira. Outros estudos com diferentes regiões de susceptibilidade ao carcinoma de próstata devem ser realizados a fim de permitirem, num futuro próximo, a realização de testes preditivos em homens jovens, permitindo a identificação de indivíduos que tenham maior predisposição ao desenvolvimento desta forma de câncer e desta maneira, um acompanhamento mais rigoroso com o objetivo de tratar o tumor no início de sua manifestação.

Summary and Conclusions

In the world's population prostate carcinoma is the fifth most common male cancer-related death malignancy. In Brazil, among all male invasive cancers it is expected that prostate carcinoma will have the second highest death rate and the highest incidence rate (Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2001). As the prostate carcinoma death rate in Brazilian population has been increasing over the last several years we proposed to investigate polymorphic regions of known genes that might be associated with prostate carcinoma predisposition. We studied the androgen receptor CAG and GGC polymorphic regions, the vitamin D receptor C1171T polymorphism, the endostatin D104N polymorphism, the p53 Pro72Arg polymorphism and the MXI1 AAAAC polymorphic region.

In our androgen receptor CAG and GGC polymorphic regions analysis, we have observed a higher prevalence of short CAG alleles (<22 repeats) ($p=0.05$) and GGC alleles with ≤ 16 repeats ($p=0.04$) in the prostate carcinoma group, as well as a strong linkage disequilibrium between CAG and GGC regions among patients. Our data suggest that the prostate carcinoma susceptibility in the Brazilian population is associated with the haplotype <22CAG/>16GGC, which increases by 2.5 times the probability of disease manifestation ($OR=2.49$; IC 95% 1.15-5.40).

In our study of the vitamin D receptor C1171T polymorphism, we have not observed evidence of association between any genotype of this polymorphism and prostate carcinoma ($\chi^2=0.14$; 2 degrees of freedom; $p=0.93$). This observation suggests that this gene does not play an important role in prostate cancer development in the Brazilian population.

In our analysis of the endostatin gene we demonstrated for the first time the association of a new polymorphism (D104N) with prostate cancer. We observed that heterozygous N104 individuals have a 2.5 times increased chance of developing prostate carcinoma as compared to homozygous D104 subjects ($OR 2.4$; 95% CI 1.40-4.20).

Finally in the study with the MXI1 AAAAC polymorphic region and the p53 Pro72Arg polymorphism, we have not observed any difference in the genotypes distribution between prostate carcinoma patients and controls in these two regions. Our findings suggest that these regions are not associated with the predisposition to prostate carcinoma in the Brazilian population.

So, with the present study it was possible to demonstrate the association of the androgen receptor and endostatin genes with prostate cancer development and /or

susceptibility in Brazilian patients. This apparently is the first association study done with prostate carcinoma patients in the Brazilian population. Other studies with different susceptibility regions need to be done to permit, in the future, the development of predictive tests in young men with an increased risk for prostate carcinoma. These tests will allow the identification of men who might be more susceptible to develop prostate carcinoma, who then can be followed closely by clinicians in order to watch for the first signs of prostate carcinoma.

Capítulo VIII

Referências Bibliográficas

- Adachi, M.; Taki, T.; Ieki, Y.; Huang, C-L; Higashiyama, M. and Miyake, M. - Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Research* **56**:1751-1755, 1996.
- Alers, J. C.; Rochat, J.; Krijtenburg, P. J.; Hop, W. C.; Kranse, R.; Rosenberg, C.; Tanke, H. J.; Schroder, F. H. and Dekken, H. - Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab. Invest.* **80**: 931-942, 2000.
- Algire, G. H. & Chalkley, H. W. - Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J. Natl. Cancer Inst. USA* **6**: 73-85, 1945.
- Aprikian, A. G.; Bazinet, M.; Plante, M.; Meshref, A.; Trudel, C.; Aronson, S.; Nachabe, M.; Pélouquin, F.; Déssureault, J.; Narod, S.; Bégin, L. and Elhilali, M. M. - Family history and the risk of prostatic carcinoma in a high risk group of urological patients. *J. Urol.* **154**: 404-406, 1995.
- Arps, S.; Rodewald, A.; Schmalenberger, B.; Carl, P.; Bressel, M. and Kastendieck, H. - Cytogenetic survey of 32 cancers of the prostate. *Cancer Genet. Cytogenet.* **66**: 93-99, 1993.
- Atkin, N. B. and Baker, M. C. - Chromosome study of five cancers of the prostate. *Hum. Genet.* **70**: 359-364, 1985.
- Azevedo, E. S. - Subgroup Studies of Black Admixture Within a Mixed Population of Bahia, Brazil. *Ann. Hum. Genet.* **44**: 56-60, 1980.
- Banerjee, S. K.; Makalise, W. S.; Weston, A. P.; Mitchell, S. M.; Campbell, D. R. - Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *Biotechniques* **18**: 768-773, 1995.
- Bassam, B. S.; Caetano-Anolles, G. and Gresshiff, P. M. - Fast sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **196**: 80-83, 1991.
- Berry, R.; Schoeder, J. J.; French, A. J.; McDonnell, S. K.; Peterson, B. J.; Cunningham, J. M.; Thibodeau, S. N. and Schaid, D. J. - Evidence for a prostate cancer-susceptibility locus on chromosome 20. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 82-91, 2000.
- Berthon, P.; Valeri, A.; Cohen-Akenine, A.; Drelon, E.; Paiss, T.; Wöhr, G.; Latil, A.; Millasseau, P.; Mellah, I.; Cohen, N.; Blanché, H.; Bellané-Cahntelot, C.; Demenais, F.; Teillac, P.; Duc, A. L.; Petriconi, R.; Hautmann, R.; Chumakov, I.; Bachner, L.; Maitland, N. J.; Lidereau, R.; Vogel, W.; Fournier, G.; Mangin, P.; Cohen, D. and Cussenot, O. - Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 1416-1424, 1998.
- Bova, G. S. & Isaacs, W. B. - Review of allelic loss and gain in prostate cancer. *World J. Urol.* **14**: 338-346, 1996.
- Bratt, O.; Borg, Å.; Kristoffersson, U.; Lundgren, R.; Zhang, Q.-X. and Olsson, H. - CAG repeat length in the androgen receptor gene is related to age at diagnosis of prostate cancer and response to endocrine therapy, but not to prostate cancer risk. *Br. J. Cancer* **81**: 672-676, 1999.
- Brooks, J. D.; Bova, G. S. and Isaacs, W. B. - Allelic loss of the retinoblastoma gene in primary human prostatic adenocarcinomas. *Prostate* **26**: 35-39, 1995.
- Brothman, A. R.; Peehl, D. M.; Patel, A. M. and McNeal, J. E. - Frequency and pattern of karyotypic abnormalities in human prostate cancer. *Cancer Res.* **50**: 3795-3803, 1990.
- Carter, H. B.; Piantadosi, S. and Isaacs, J. T. - Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *J. Urol.* **143**: 742-746, 1990.
- Carter, B. S.; Beaty, T. H.; Steinberg, G. D.; Childs, B. and Walsh, P. C. - Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 3367-3371, 1992.
- Carter, H. B. & Pearson, J. D. - Prostate-specific antigen testing for early diagnosis of prostate cancer: formulation of guidelines. *Urology* **54**: 780-786, 1999.
- Chen, C.; Parangi, S.; Tolentino, M. J. and Folkman, J. - A strategy to discover circulating angiogenesis inhibitors generated by human tumors. *Cancer Res.* **55**: 4230-4233, 1995.
- Cher, M. L.; Ito, T.; Weidner, N.; Carroll, P. R. and Jensen, R. H. - Mapping of regions of physical deletion on chromosome 16q in prostate cancer cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J. Urol.* **153**: 249-254, 1995.

- Cher, M. L.; Bova, G. S.; Moore, D. H.; Small, E. J.; Carroll, P. R.; Pin, S. S.; Epstein, J. I.; Isaacs, W. B. and Jensen, R. H. – Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res.* **56**: 3091-3102, 1996.
- Cooney, K. A.; McCarthy, J. D.; Lange, E.; Huang, L.; Miesfeldt, S.; Montie, J. E.; Oesterling, J. E.; Sandler, H. M. and Lange, K. – Prostate cancer susceptibility locus on chromosome 1q: a confirmation study. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 955-959, 1997.
- Correa-Cerro, L.; Berthon, P.; Häussler, J.; Bochum, S.; Drelon, E.; Mangin, P.; Fournier, G.; Paiss, T.; Cussenot, O. and Vogel, W. – Vitamin D receptor polymorphisms as markers in prostate cancer. *Hum. Genet.* **105**: 281-287, 1999.
- Dong, J-T; Lamb, P. W.; Rinker-Schaeffer, C. W.; Vukanovic, J.; Ichikawa, T.; Isaacs, J. T. and Barret, J. C. - KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science* **268**: 884-886, 1995.
- Eagle, L. R.; Yin, X.; Brothman, A. R.; Williams, B. J.; Atkin, N. B. and Prochownik, E. V. - Mutation of the MXI1 gene in prostate cancer. *Nature Genetics* **9**: 249-255, 1995.
- Eales, R. A.; Durocher, F.; Edwards, S.; Teare, D.; Badzioch, M.; Hamoudi, R.; Gill, S.; Biggs, P.; Dearnaley, D.; Ardern-Jones, A.; Dowe, A.; Shearer, R.; McLennan, D. L.; Norman, R. L.; Ghadirian, P.; Aprikian, A.; Ford, D.; Amos, C.; King, T. M.; The Cancer Research Campaign/British Prostate Group U. K. Familial Prostate Cancer Study Collaborators; Labrie, F.; Simard, J.; Narod, S. A.; Easton, D. and Foulkes, W. D. – Linkage analysis of chromosome 1q markers in 136 prostate cancer families. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 653-658, 1998.
- Edwards, S. M.; Badzioch, M. D.; Minter, R.; Hamoudi, R.; Collins, N. Ardern-Jones, A.; Dowe, A.; Osborne, S.; Kelly, J.; Shearer, R.; Easton, D. F.; Saunders, G. F.; Dearnaley, D. P. and Eeles, R. A. – Androgen receptor polymorphisms: association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. *Int. J. Cancer* **84**: 458-465, 1999.
- Egawa, S.; Uchida, T.; Suyama, K.; Wang, C.; Otori, M.; Irie, S.; Iwamura, M. and Koshiba, K. - Genomic instability of microsatellite repeats in prostatic cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cancer Res.* **55**: 2418-2421, 1995.
- Ekman, P.; Grönberg, H.; Matsuyama, H.; Kivineva, M.; Gergerheim, Ulf S. R. and Li, C. – Links between genetic and environmental factors and prostate cancer risk. *Prostate* **39**: 262-268, 1999.
- Elo, J. P.; Kvist, L.; Leinonen, K.; Isomaa, V.; Henttu, P.; Lukkarinen, O. and Vihko, P. – Mutated human androgen receptor gene detected in a prostatic cancer patient is also activated by estradiol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**: 3494-3500, 1995.
- Emmert-Buck, M. R.; Vocke, C. D.; Pozzatti, R. O.; Duray, P. H.; Jennings, S. B.; Florence, C. D.; Zhuang, Z.; Bostwick, D. G.; Liotta, L. A. and Linehan, W. M. - Allelic loss on chromosome 8p12-21 in microdissected prostatic intraepithelial neoplasia. *Cancer Res.* **55**: 2959-2962, 1995.
- Erbersdobler, A.; Bardenhagen, P. and Henke, R. P. – Numerical chromosomal anomalies in latent adenocarcinomas of the prostate. *Prostate* **38**: 92-99, 1999.
- Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. INCA – www.inca.org.br, 2001.
- Evans, B. A. J.; Harper, M. E.; Daniells, C. E.; Watts, C. E.; Matenhelia, S.; Green, J. and Griffiths, K. – Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis. *Prostate* **28**: 162-171, 1996.
- Fleshner, N.; Rakovitch, E.; Klotz, L. - Differences between urologists in the United States and Canada in the approach to prostate cancer. *J Urol.* **163**:1461-1466, 2000.
- Furuya, Y.; Akakura, K.; Masai, M. and Ito, H. – Vitamin D receptor gene polymorphism in Japanese patients with prostate cancer. *Endocrine J.* **46**: 467-470, 1999.
- Gao, X.; Zacharek, A.; Salkowski, A.; Grignon, D. J.; Wael, S.; Porter, A. T. and Honn, K. V. – Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res.* **55**: 1002-1005, 1995.
- Gately, S.; Twardowski, P.; Stack, M. S.; Patrick, M.; Boggio, L.; Cundiff, D. L.; Schnaper, H. W.; Madison, L.; Volpert, O.; Bouck, N.; Enghild, J.; Kwaan, H. C. and Soff, G. A. – Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res.* **56**: 4887-4990, 1996.
- Gibbs, M., Chakrabarti, L., Stanford, J. L., Goode, E. L., Kolb, S., Schuster, E. F., Buckley, V. A., Shook, M.; Hood, L.; Jarvik, G. P. and Ostrander, E. A. – Analysis of chromosome

- 1q42.2-43 in 152 families with high risk of prostate cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 1087-1095, 1999a.
- Gibbs, M.; Stanford, J. L.; McIndoe, R. A.; Jarvik, G. P.; Kolb, S.; Goode, E. L.; Chakrabarti, L.; Schuster, E. F.; Buckley, V. A.; Miller, E. L.; Brandzel, S.; Li, S.; Hood, L. and Ostrander, E. A. Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. *Am. J. Hum. Genet.* **64**: 776-787, 1999b.
- Gibbs, M.; Stanford, J. L.; Jarvik, G. P.; Janer, M.; Badzioch, M.; Peters, M. A.; Goode, E. L.; Kolb, S.; Chakrabarti, L.; Shook, M.; Basom, R. and Hood, L. – A genomic scan of families with prostate cancer identifies multiple regions of interest. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 100-109, 2000.
- Giovannucci, E.; Tampfer, M. J.; Krithivas, K.; Brown, M.; Brufsky, A.; Talcott, J.; Hennekens, C. H. and Kantoff, P. W. - The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 3320-3323, 1997.
- Gleason, D. F. – Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum. Pathol.* **23**: 273-279, 1992.
- Glover, F. E.; Coffey, Jr D. S.; Douglas, L. L.; Russel, H.; Cadigan, M.; Tulloch, T.; Wedderburn, K.; Wan, R. L.; Baker, T. D. and Walsh, P. C. – Familial study of prostate cancer in Jamaica. *Urology* **52**: 441-443, 1998.
- Goldman, E. – The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* **2**: 1236-1240, 1907.
- Good, D. J.; Poliverini, P. J.; Rastinejad, F.; Le Beau, M. M.; Lemons, R. S.; Frazier, W. A. and Bouck, N. P. - A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6624-6628, 1990.
- Gray, I. C.; Phillips, S. M. A.; Lee, S. J.; Neoptolemos, J. P.; Weissenbach, J. and Spurr, N. K. - Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res.* **55**: 4800-4803, 1995.
- Greenlee, R. T.; Hill-Harmon, M. B.; Murray, T. and Thun, M. – Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J. Clin.* **51**: 15-36, 2001.
- Hardy, D.O.; Scher, H. I.; Bogenreider, T.; Sabbatini, P.; Zhang, Z.-F.; Nanus, M. and Catterall, J. F. – Androgen receptor CAG repeat lengths in prostate cancer: correlation with age of onset. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**: 4400-4405, 1996.
- Ide, A. G.; Baker, N. H. and Warren, S. L. – Vascular reactions of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am. J. Radiol.* **42**: 891-899, 1939.
- Ingles, S. A.; Ross, R. K.; Yu, M. C.; Irvine, R. A.; La Pera, G.; Haile, R. W. and Coetzee, G. A. - Association of prostate cancer with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**: 166-170, 1997.
- Ingles, S. A.; Coetzee, G. A.; Ross, R. K.; Henderson, B. E.; Kolonel, L. N.; Crocitto, L.; Wang, W. and Haile, R. W. - Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in african-americans. *Cancer Res.* **58**: 1620-1623, 1998.
- Irvine, R. A.; Yu, M. C.; Ross, R. K. and Coetzee, G. A. - The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res.* **55**: 1937-1940, 1995.
- Isaacs, S. D.; Kiemeny, L. A. L. M.; Baffoe-Bonnie, A.; Beat, T. H. and Walsh, P. C. - Risk of cancer in relatives of prostate cancer probands. *J. Nat. Cancer Inst.* **87**: 991-996, 1995.
- Jones, G. W.; Mettlin, C.; Murphy, G. P.; Guinan, P.; Herr, H. W.; Hussey, D. H.; Chmiel, J. S.; Fremgen, A. M.; Clive, R. E.; Zuber-Ocwieja, K. E. and Winchester - Patterns of care for carcinoma of the prostate gland: results of a national survey of 1984 and 1990. *J. Am. Coll. Sur.* **180**: 545-554, 1995.
- Kandel, J.; Bossy-Wetzel, E.; Radvany, F.; Klagsbum, M.; Folkman, J. and Hanahan, D. – Neovascularization is associated with a switch to the export bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* **66**: 1095-1104, 1991.
- Keetch, D. W.; Rice, J. P.; Suarez, B. K.; Catalona, W. J. - Familial aspects of prostate cancer: a case control study. *J. Urol.* **154**: 2100-2102, 1995.
- Kibel, A. S.; Isaacs, S. D.; Isaacs, W. B. and Bova, G. S. – Vitamin D receptor polymorphisms and lethal prostate cancer. *J. Urol.* **160**: 1405-1409, 1998.
- Klocker, H.; Neuschmid-Kaspar, F.; Culig, Z.; Cato, A. C. B.; Hobisch, A.; Eberle, J.; Cronauer, M. V.; Hittmair, A.; Radmayr, C.; Überreiter, S.; Glatzl, J. and Bartsch, G. - Androgen

- receptor alterations in patients with disturbances in male sexual development and in prostatic carcinoma. *Urol. Int.* **54**: 2-5, 1995.
- Koivisto, P.; Hyytinen, E.; Palmberg, C.; Tammela, T.; Visakorpi, T.; Isola, J. and Kallioniemi, O. P. - Analysis of genetic changes underlying local recurrence of prostate carcinoma during androgen deprivation therapy. *Am. J. Pathol.* **147**: 1608-1614, 1995.
- Konig, J. J.; Teubel, W.; vanSteenbrugge, G. J.; Romijn, J. C. and Hagemeyer, A. - Characterization of chromosome 8 aberrations in the prostate cancer cell line LNCaP-FGC and sublines. *Urol. Res.* **27**: 3-8, 1999.
- Konishi, N.; Hiasa, Y.; Hayashi, I.; Matsuda, H.; Tao, M.; Tsuzuki, T.; Hayashi, I.; Kitahori, Y.; Shiraishi, T.; Yatani, R.; Shimazaki, J. and Lin, J. C. - Intratumor cellular heterogeneity and alterations in *ras* oncogene and *p53* tumor suppressor gene in human prostate carcinoma. *Am. J. Pathol.* **147**: 1112-1122, 1995a.
- Konishi, N.; Hiasa, Y.; Hayashi, I.; Matsuda, H.; Tsuzuki, T.; Ming, T.; Kitahori, Y.; Shiraishi, T.; Yatani, R. and Shimazaki, J. - *p53* mutations occur in clinical, but not latent, human prostate carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* **86**: 57-63, 1995b.
- Krieger, H.; Morton, N. E.; Azevedo, E. S.; Freire-Maia, A. and Yasuda, N. - Racial Admixture in North-Eastern Brazil. *Ann. Hum. Genet.* **29**: 113-125, 1965.
- Kubota, Y.; Fujinami, K.; Uemura, H.; Dobashi, Y.; Miyamoto, H.; Iwasaki, Y.; Kitamura, H. and Shuin, T. - Retinoblastoma gene mutations in primary human prostate cancer. *Prostate* **27**: 314-320, 1995.
- Lange, E. M.; Chen, H.; Brierley, K.; Perrone, E. E.; Bock, C. H.; Gilanders, E. and Ray, M. E. - Linkage analysis of 153 prostate cancer families over a 30-cM region containing the putative susceptibility locus HPCX. *Clin. Cancer Res.* **5**: 4013-4020, 1999.
- Latil, A.; Baron, J. C.; Cussenot, O.; Fournier, G.; Soussi, T.; Boccon-Gibod, L.; Le Duc, A.; Rouëssé, J. and Lidereau, R. - Altérations génétiques dans les cancers localisés de la prostate: identification d'une région commune de délétion sur le chromosome 18q. *Bull. Cancer* **82**: 589-597, 1995.
- Li, J.; Yen, C.; Liaw, D.; Podsypanina, K.; Bose, S.; Wang, S. I.; Puc, J.; Miliaresis, C.; Rodgers, L.; McCombie, R.; Bigner, S. H.; Giovanella, B. C.; Ittmann, M.; Tycko, B.; Hibshoosh, H.; Wigler, M. H. and Parsons, R. - PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**: 1943-1947, 1997.
- Macoska, J. A.; Trybus, T. M.; Benson, P. D.; Sakr, W. A.; Grignon, D. J.; Wojno, K. D.; Pietruk, T. and Powell, I. J. - Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res.* **55**: 5390-5395, 1995.
- Marcelli, M.; Ittmann, M.; Mariani, S.; Sutherland, R.; Nigam, R.; Murthy, L.; Zhao, Y.; DiConcini, D.; Puxeddu, E.; Esen, A.; Eastham, J.; Weigel, N. L. and Lamb, D. J. - Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res.* **60**: 944-949, 2000.
- McIndoe, R. A.; Stanford, J. L.; Gibbs, M.; Jarvik, G. P.; Brandzel, S.; Neal, C. L.; Li, S.; Gammack, J. T.; Gay, A. A.; Goode, E. L.; Hood, L. and Ostrander, E. A. - Linkage analysis of 49 high-risk families does not support a common familial prostate cancer susceptibility gene at 1q24-25. *Am. J. Hum. Genet.* **61**: 347-353, 1997.
- Meikle, A. W.; Stephenson, R. A.; McWhorter, W. P.; Skolnick, M. H. and Middleton, R. G. - Effects of age, sex steroids, and family relationships on volumes of prostate zones in men with and without prostate cancer. *Prostate* **26**: 253-259, 1995.
- Miller, S. A.; Dykes, D. D. and Polesky, H. F. - A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**: 1215, 1988.
- Morrison, N. A.; Yeoman, R.; Kelly, P. J. and Eisman, J. A. - Contribution of *trans*-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6665-6669, 1994.
- Moyret-Lalle, C.; Marçais, C.; Jacquemier, J.; Moles, J. P.; Daver, A.; Soret, J. Y.; Jeanteur, P.; Ozturk, M. and Theillet, C. - *ras*, *p53*, and HPV status in benign and malignant prostate tumors. *Int. J. Cancer* **64**: 124-129, 1995.
- Murakami, Y. S.; Brothman, A. R.; Leach, R. J. and White, R. L. - Suppression of malignant phenotype in a human prostate cancer cell line by fragments of normal chromosomal region 17q. *Cancer Res.* **55**: 3389-3394, 1995.
- Neuhausen, S. L.; Farnham, J. M.; Kort, E.; Tavtigian, S. V.; Skolnick, M. H. and Cannon-Albright, L. A. - Prostate cancer susceptibility locus HPC1 in Utah high-risk pedigrees. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 2437-2442, 1999.
- O'Reilly, M. S.; Holmgren, L.; Shing, Y.; Chen, C.; Rosenthal, R. A.; Moses, M.; Lane, W. S.; Cao, Y.; Sage, E. H. and Folkman, J. - Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that

- mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**: 315-328, 1994.
- O' Reilly M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W. S.; Flynn, E.; Birkhead, J. R.; Olsen, B. R. and Folkman, J. - Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**: 277-285, 1997.
- Orita, M.; Iwahara, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K.; Sekita, T. - Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as a single strand conformation polymorphisms. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **86**: 2766-2770, 1989.
- Pesche, S.; Latil, A.; Muzeau, F.; Cussenot, O.; Fournier, G.; Longy, M.; Eng, C. and Lideau, R. - PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene* **16**: 2879-2883, 1998.
- Quian, J.; Bostwick, D. G.; Takahashi, S.; Borell, T. J.; Herath, J. F.; Lieber, M. M. and Jenkins, R. B. - Chromosomal anomalies in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma detected by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Res.* **55**: 5408-5414, 1995.
- Rebbeck, T. R.; Walker, A. H.; Zeigler-Johnson, C.; Weisburg, S.; Martin, A. M.; Nathanson, K. L.; Wein, A. J. and Malkowicz, S. B. - Association of HPC2/ELAC2 genotypes and prostate cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 1014-1019, 2000.
- Reichardt, J. K. V.; Makridakis, N.; Henderson, B. E.; Yu, M. C.; Pike, M. C. and Ross, R. K. - Genetic variability of human SRD5A2 gene: implications for prostate cancer risk. *Cancer Res.* **55**: 3973-3975, 1995.
- Rinker-Schaeffer, C. W.; Hawkins, A. L.; Ru, N.; Dong, J.; Stoica, G.; Griffin, C. A.; Ichikawa, T.; Barret, J. C. and Isaacs, J. T. - Differential suppression of mammary and prostate cancer metastasis by human chromosomes 17 and 11. *Cancer Res.* **54**: 6249-6256, 1994.
- Ripple, G. H. & Wilding, G. - Drug development in prostate cancer. *Semin Oncol.* **26**: 217-26, 1999.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. - **Molecular Cloning - A Laboratory Manual 2nd edition** - Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sattler, H. P.; Rohde, V.; Bonkhoff, H.; Zwergel, T. and Wullich, B. - Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *Prostate* **39**: 79-86, 1999.
- Schaid, D. J.; McDonnell, S. K.; Blute, M. L. and Thibodeau, S. N. - Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **62**: 1425-1438, 1998.
- Smith, J. R.; Freije, D.; Carpten, J. D.; Grönberg, H.; Xu, J.; Isaacs, S.D.; Brownstein, M. J.; Bova, G. S.; Guo, H.; Bujnovszky, P.; Nusskern, D. R.; Damber, J-E; Berg, A.; Emanuelsson, M.; Kallioniemi, O. P.; Walker-Daniels, J.; Bailey-Wilson, J. E.; Beaty, T. H.; Meyers, D. A.; Walsh, P. C.; Collins, F. S.; Trent, J. M. and Isaacs, W. B. - Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* **274**: 1371-1374, 1996.
- Stanford, J. L.; Just, J. J.; Gibbs, M.; Wicklund, K. G.; Neal, C. L.; Blumenstein, B. A. and Ostrander, E. A. - Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res.* **57**: 1194-1198, 1997.
- Steck, P. A.; Pershouse, M. A.; Jasser, S. A.; Young, W. K. A.; Lin, H.; Ligon, A. H.; Langford, L. A.; Baumgard, M. L.; Hattier, T.; Davis, T.; Frye, C.; Hu, R.; Swedlund, B.; Teng, D. H. F. and Tavtigian, S. V. - Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genetics* **15**: 356-362, 1997.
- Steinberg, G. D.; Carter, B. S.; Beaty, T. H.; Cilds, B. and Walsh, P. C. - Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* **17**: 337-347, 1990.
- Suarez, B. K.; Lin, J.; Burmester, J. K.; Broman, K. W.; Weber, J. L.; Banerjee, T. K.; Goddard, K. A. B.; Witte, J. S.; Elston, R. C. and Catalona, W. J. - A genomic screen of multiplex sibships with prostate cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 933-944, 2000.
- Suzuki, H.; Komiya, A.; Aida, S.; Akimoto, S.; Shiraiishi, T.; Yatani, R.; Igarashi, T. and Shimazaki, J. - Microsatellite instability and other molecular abnormalities in human prostate cancer. *Jpn. J Cancer Res.* **86**: 956-961, 1995.
- Takahashi, S.; Shan, A. L.; Ritland, S. R.; Delacey, K. A.; Bostwick, D. G.; Lieber, M. M.; Thibodeau, S. N. and Jenkins, R. B. - Frequent loss of heterozygosity at 7q31.1 in primary prostate cancer is associated with tumor aggressiveness and progression. *Cancer Res.* **55**: 4114-4119, 1995a.

- Takahashi, S.; Masakuni, F.; Allsbrook, W. C.; Nishii, H.; Wakui, S.; Barrett, J. C. and Boyd, J. – Prevalence of androgen receptor gene mutations in latent prostatic carcinomas from Japanese men. *Cancer Res.* **55**: 1621-1624, 1995b.
- Taplin, M. E.; Bubley, G. J.; Shuster, T. D.; Frantz, M. E.; Spooner, A. E.; Ogata, G. K.; Keer, H. N. and Balk, S. P. – Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N. Eng. J. Med.* **332**: 1393-1398, 1995.
- Tavitigian, S. V.; Simard, J.; Teng, D. H. F.; Abtin, V.; Baungard, M.; Beck, A.; Campi, N. J.; Carillo, A. R.; Chen, Y.; Dayananth, P.; Desrochers, M.; Dumont, M.; Farnham, J. M.; Frank, D.; Frye, C.; Ghaffari, S.; Gupte, J. S.; Hu, R.; Iliev, D.; Janecki, T.; Kort, E. N.; Laity, K. E.; Leavitt, A.; Leblanc, G.; McArthur-Morrison, J.; Pederson, A.; Reid, J. E.; Richards, S.; Schroeder, M.; Smith, R.; Snyder, S. C.; Swedlund, B.; Swensen, J.; Thomas, A.; Tranchant, M.; Woodland, A-M.; Labrie, F.; Skolnick, M. H.; Neuhausen, S.; Rommens, J. and Cannon-Albright, L. A. – A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nature Genetics* **27**: 172-180, 2001.
- Taylor, A.; Hirvonen, A.; Waston, M.; Pittman, G.; Mohler, J. L. and Bell, D. A. – Association of prostate cancer with vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res.* **56**: 4108-4110, 1996.
- Terrel, R. B.; Wille, A. H.; Cheville, J. C.; Nystuen, A. M.; Cohen, M. B. and Sheffield, V. C. – Microsatellite instability in adenocarcinoma of the prostate. *Am. J. Pathol.* **147**: 799-805, 1995.
- Trapman, J.; Sleddens, H. F. B. M.; van der Weiden, M. M.; Dinjens, W. N. M.; Konig, J. J.; Schroder, F. H.; Faber, P. W. and Bosman, F. T. – Loss of heterozygosity of chromosome 8 microsatellite loci implicates a candidate tumor suppressor gene between the loci D8S87 and D8S133 in human prostate cancer. *Cancer Res.* **54**: 6061-6064, 1994.
- Verma, R. S.; Manikal, M.; Conte, R. A. and Godec, C. J. – Chromosomal basis of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Invest.* **17**: 441-447, 1999.
- Visakorpi, T.; Kallioniemi, A. H.; Syvänen, A. C.; Hyytinen, E. R.; Karhu, R.; Tammela, T.; Isola, J. J. and Kallioniemi, O. P. – Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* **55**: 342-347, 1995a.
- Visakorpi, T.; Hyytinen, E.; Koivisto, P.; Tanner, M.; Keinänen, R.; Palmberg, C.; Palotie, A.; Tammela, T.; Isola, J. and Kallioniemi, O. P. – *In vivo* amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nature Genetics* **9**: 401-406, 1995b.
- Wallén, M. J.; Linja, M.; Kaartinen, K.; Schleutker, J. and Visakorpi, T. – Androgen receptor gene mutations in hormone-refractory prostate cancer. *J Pathol.* **189**: 559-563, 1999.
- Watanabe, M.; Imai, H.; Shiraishi, T.; Shimazaki, J.; Kotake, T. and Yatani, R. – Microsatellite instability in human prostate cancer. *Br. J. Cancer* **72**: 562-564, 1995.
- Whittemore, A. S.; Wu, A. H.; Kolonel, L. N.; John, E. M.; Gallagher, R. P.; Howe, G. R.; West, D. W.; Teh, C. Z. and Stamey, T. – Family history and prostate cancer risk in black, white and Asian men in the United States and Canada. *Am. J. Epidemiol.* **141**: 732-740, 1995.
- Whittemore, A. S.; Lin, I. G.; Oakley-Girvan, I.; Gallagher, R. P.; Halpern, J.; Kolonel, L. N. and Wu, A. H. – No evidence of linkage for chromosome 1q42.2-43 in prostate cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **65**: 254-256, 1999.
- Witte, J. S.; Goddard, A. B.; Conti, D. V.; Elston, R. C.; Lin, J.; Suarez, B. K.; Broman, K. W.; Burmester, J. K.; Weber, J. L. and Catalona, W. J. – Genomewide scan for prostate cancer-aggressiveness loci. *Am. J. Hum. Genet.* **67**: 92-99, 2000.
- Xu, J.; Meyers, D.; Freije, D.; Isaacs, S.; Wiley, K.; Nusskern, D.; Ewing, C.; Wilkens, E.; Bujnovsky, P.; Bova, G. S.; Walsh, P.; Isaacs, W.; Schleutker, J.; Matikainen, M.; Tammela, T.; Visakorpi, T.; Kallioniemi, O. P.; Berry, R.; Scahid, D.; French, A.; McDonnell, S.; Schoeder, J.; Blute, M.; Thibodeau, S.; Grönberg, H.; Emanuelsson, M.; Damber, J.-E.; Bergh, A.; Jonsson, B.-A.; Smith, J.; Bailey-Wilson, J.; Carpten, J.; Stephan, D.; Gillanders, E.; Amundson, I.; Kainu, T.; Freas-Lutz, D.; Baffoe-Bonnie, A.; Aucken, A. V.; Sood, R.; Collins, F.; Brownstein, M. and Jeffrey, T. – Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nature Genetics* **20**: 175-179, 1998.
- Xu, J. & International Consortium for Prostate Cancer Genetics – Combined analysis of hereditary prostate cancer linkage to 1q24-25: results from 772 hereditary prostate cancer families from the International Consortium for Prostate Cancer Genetics. *Am. J. Hum. Genet.* **66**: 945-957, 2000.

- Xu, J.; Stolk, J. A.; Zhang, X.; Silva, S. J.; Houghton, R. L.; Matsumura, M.; Vedvick, T. S.; Leslie, K. B.; Badoro, R. and Reed, S. G. – Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res.* **60**: 1677-1682, 2000.
- Xu, J.; Zheng, S. L.; Carpten, J. D.; Nupponen, N. N; Robbins, C. M.; Mestre, J.; Moses, T. Y.; Faith, D. A.; Kelly, B. B.; Isaacs, S. D.; Wiley, K. E.; Ewing, C. M.; Bujnovsky, P.; Chang, B.; Bailey-Wilson, J.; Bleecker, E. R.; Walsh, P. C. Trent, J. M. Meyers, D. A. and Isaacs, W. B. – Evaluation of linkage and association of HPC2/ELAC2 in patients with familial or sporadic prostate cancer. *Am. J. Hum. Genet.* **68**: 901-911, 2001.
- Young, C Y-F; Montgomery, B. T.; Andrews, P. E.; Qiu, S.; Bilhartz, D. L and Tindall, D. - Hormonal regulation of prostate-specific antigen messenger RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer Res.* **51**: 3748-3752, 1991.
- Yu, H.; Diamands, P.; Levesque, M.; Asa, S. L.; Monne, M. and Croce, C. M. - Expression of the prostate-specific antigen gene by primary ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **55**: 1603-1606, 1995.

Anexo

Artigo submetido para publicação

“A polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocarcinoma”

Paula Iughetti¹, Oscar Suzuki¹, Paulo H. C. Godoi², Venâncio Avancini Ferreira Alves³, Andréa L. Sertié¹, Todd Zorick¹, Fernando Soares⁴, Anamaria Camargo⁴, Eloísa S. Moreira⁴, Celso di Loreto³, Carlos Alberto Moreira-Filho⁵, Andrew Simpson⁴, Glaucius Oliva⁶, Maria Rita Passos-Bueno¹

¹Centro de estudos do genoma Humano, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, USP.

²Instituto de Química de São Carlos, USP.

³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, USP.

⁴Instituto Ludwig, São Paulo

⁵Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

⁶Instituto de Física de São Carlos, USP.

Artigo submetido em 23/04/2001 para a Revista *Cancer Research*.

Publicado em 15/10/2001 na revista *Cancer Research* Volume 61 Número 20.

A polymorphism in endostatin, an angiogenesis inhibitor, predisposes for the development of prostatic adenocarcinoma

Paula Iughetti¹, Oscar Suzuki¹, Paulo H.C. Godoi², Venâncio Avancini Ferreira Alves³, Andrea L. Sertié¹, Todd Zorick¹, Fernando Soares⁴, Anamaria Camargo⁴, Eloísa S. Moreira⁴, Celso di Loreto³, Carlos Alberto Moreira-Filho⁵, Andrew Simpson⁴, Glaucius Oliva⁶, Maria Rita Passos-Bueno¹.

¹Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, USP ²Instituto de Química de São Carlos, ³Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, USP; ⁴Instituto Ludwig, São Paulo, ⁵Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, ⁶Instituto de Física de São Carlos, USP.

Address for correspondence: Maria Rita Passos-Bueno, PhD. Rua do Matão 277. Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, USP. 05508-900. E-mail: passos@ib.usp.br Tel: 55-11-38187563. Fax: 55-11-38187419.

Author' address:

Paula Iughetti (iughetti@usp.br), Oscar Suzuki (oscar@sp.mailbr.com.br), Andréa L. Sertié (asertie@hotmail.com), Todd Zorick (tzorick@ib.usp.br), Maria Rita Passos-Bueno (passos@ib.usp.br)
Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, USP, Rua do Matão 277, SP, Brasil. Tel: 55-11-38187563. Fax: 55-11-38187419;

Paulo H. C. Godoi (godoiphc@if.sc.usp.br), Instituto de Química and Glaucius Oliva (oliva@if.sc.usp.br), Instituto de Física, USP Av. Trabalhador São Carlense, 400, São Carlos, SP, Brasil;

Venâncio Avancini Ferreira Alves (venancio@uol.com.br) and Celso di Loreto, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, USP, Av. Dr. Arinaldo, 455, SP, Brasil. Tel: 55-11-30668177; Fernando Soares, Anamaria Camargo (anamaria@bidu.ludwig.org.br), Eloísa S. Moreira (eloisamoreira@bol.com.br), Andrew Simpson (asimpson@node1.com.br), Instituto Ludwig, Rua Antonio Prudente, 109, SP, Brasil. Tel: 55-11-270 4922. Fax: 55-11-270 7001;

Carlos Alberto Moreira-Filho (cmoreira@icb.usp.br), Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, SP, Brasil.

Abstract

We have performed association studies between a novel cSNP (D104N) in endostatin, one of the most potent inhibitor of angiogenesis, and prostate cancer. We observed that heterozygous N104 individuals have a 2.5 times increased chance of developing prostate cancer as compared to homozygous D104 subjects (OR 2.4; 95%; CI 1.4-4.16). Modeling of the endostatin mutant showed that the N104 protein is stable. These results together with the observation that residue 104 is evolutionary conserved lead we to propose that: a) the DNA segment containing this residue might contain a novel interaction site to a yet unknown receptor and b) the presence of N104 impairs the function of endostatin.

Key words

Prostate cancer, angiogenesis, endostatin, SNP, association studies.

Introduction

Prostate cancer is the most common male malignancy and the second leading cause of cancer-related deaths in American men (1). It has been estimated that although 42% of males have prostate carcinoma identified by postmortem examination, only 9.5% will have a clinical diagnosis in their lifetime, and only 2.9% actually will die of the disease (2). Hence, the development of prognostic tests is essential to identify those patients who would benefit from more vigilant surveillance. While the majority of prostate cancer cases are sporadic, it has long been recognized that familial clustering exists, with an increased relative risk of affected families (3). Segregation analysis of prostate cancer suggests the presence of at least one major susceptibility locus that may account for up to 10% of all cases (3). Indeed, at least six putative prostate cancer susceptibility loci (five on autosomal chromosomes and one on the X chromosome) have already been mapped through linkage analysis (4,5). In addition to these putative major susceptibility genes, it is believed that alterations of other genes could be associated with the risk and/or progression of this type of tumor, including both sporadic and familial cases (6).

Angiogenesis, or the formation of new blood vessels from preexisting endothelium, is a fundamental step in tumor progression and metastasis (7,8). A wide range of both stimulatory and inhibitory molecules mediates the sequential steps involved in angiogenesis. Endostatin, a 20kDa cleavage product of the C-terminal domain of collagen XVIII (NC1), has recently been added to this list. Endostatin induces inhibition of endothelial cell proliferation and migration as well as apoptosis through mechanisms still not completely understood (8-11). Higher serum levels of endostatin induced experimentally in mice and rats seem to cause regression of various types of solid tumors, including prostate cancer (12-14). In addition, Down syndrome patients, who have higher

serum levels of endostatin due to 3 copies of the *COL18A1* gene (15), have a decreased incidence of solid tumors, including prostate cancer (16). Thus, lower levels or an impaired function of endostatin might be associated with a higher risk of developing malignant solid tumors or with a worsened prognosis of the disease. Recently, as a result of a systematic analysis of the *COL18A1* gene, we identified 20 polymorphic variants, but only one missense mutation (D104N) located in the C-terminal globular domain NC1 of collagen XVIII, the encoding region for endostatin (Table 1) (17). We hypothesized that the presence of an asparagine instead of aspartic acid at this position may lead to an impaired function of endostatin and could therefore be associated with the progression or aggressiveness of solid tumors. Our analysis of this cSNP (single nucleotide polymorphism) in 181 prostate cancer patients and 198 control individuals suggests that this change is predisposing to the development of malignant tumors of the prostate.

Subjects and Methods

Patients and controls

A total of 181 prostate cancer cases (61 Caucasians, 11 Negroids and 109 unclassified) of mean age 65.8 (SD=8.1 years) comprises the case group: 50 from the Hospital do Câncer and 131 from the Hospital Oswaldo Cruz, both situated within the city of São Paulo, SP, Brazil. All cases had fully documented histopathological diagnosis and were graded according to Gleason's system. A total of 198 non-cancer individuals (106 Caucasians, 83 Negroids and 9 unclassified) of mean age 52.7 years old (SD=14.1), who were relatives of patients with neuromuscular disorders and with negative history for prostate cancer, were considered as controls.

DNA was obtained from blood (in 66 cases and all control individuals) or from paraffin embedded tissues (115 cases). Standard protocols for DNA extraction from each of these tissues were used.

Genotype analysis

The missense change D104N (amino acid position in endostatin, which corresponds to amino acid position 1437 and nucleotide 4349G→A of the cDNA medium form of collagen XVIII) leads to the creation of a restriction site for *MseI*. This change was analyzed through the amplification of a 169bp fragment using the primers 5'-cacggtttctctccaggac-3' and 5'-ctctcagagctgctcacacg-3' followed by restriction endonuclease digestion with *MseI*. The PCR reaction consisted of 32 cycles of amplification and used the primers described above at concentrations of 4μM, 100 ng of genomic DNA, PfxTaq DNA polymerase (Life Technologies; 0.2 unit), and 250μM of each dNTP, at 94°C for 40s, 57°C for 40s and 72°C for 1 minute. The restricted digested PCR products were separated on 8% polyacrylamide gels stained with silver nitrate by standard procedures. In the presence of the mutation, two fragments of 101bp and 68bp were generated. All samples were done in duplicate to ensure genotyping accuracy. Analysis for the presence of the D104N mutation was also performed in DNA samples extracted from two different regions (a normal and a tumor one) of the paraffin block of 20 patients randomly chosen.

ELISA

ELISA analysis was performed in serum from 26 control individuals (13 heterozygous for the polymorphism D104N and 13 homozygous for the most common allele). Blood samples were collected in EDTA containing tubes, and serum was separated and stored at -70°C for future use. ELISA for serum endostatin was performed using a commercially available assay (Accucyte, Cytimmune Sciences, inc., College Park, MD, USA) according to the manufacturer's instructions for usage. All measurements were performed in duplicate to ensure the accuracy of the data collected. The kit used has a sensitivity of 2ng/ml, and typical interassay and intraassay variances were 10% or less.

Statistical analysis

Gene and genotype frequencies in affected and normal individuals were compared by contingency table analysis using both χ^2 statistics and Fisher's exact test. The level of significance considered was 5% and 1 degree of freedom for χ^2 analysis. Hardy-Weinberg equilibrium was tested with the chi-square statistic for the goodness-of-fit (1 degree of freedom). Odds ratio (OR) and its confidence interval were estimated by standard methods (18).

Molecular modeling and mutant structure analysis.

The human endostatin structure was obtained from the Protein Data Bank accession code 1BNL, and analyzed using the programs Swiss PDB Viewer, O, GRASP and Insight-II/Discover (19) The observed mutation was created by Insight-II and optimized by molecular energy minimization fixing all atoms except the side chains of D104N and its neighbors S102, K106 and T113.

The structures of mouse endostatin derived from collagen XVIII (PDB accession code 1KOE) and mouse endostatin derived from collagen XV (PDB accession code 1DY2) were also used for comparison.

Results and Discussion

Association between an endostatin polymorphism (D104N) and prostate cancer

The distribution of the genotypes for the polymorphism D104N is reported for controls and prostate cancer patients in Table 2. We did not observe any significant difference in the frequency of this polymorphism between Caucasians and Negroids in controls ($p=0.13$) or in patients ($p=0.16$), and this variable was not considered in the majority of statistical analysis. In addition, we found very similar genotypic frequencies for this polymorphic system in the patients ascertained in the two hospitals (33% in patients from Hospital do Câncer and 22% in patients from Hospital Oswaldo Cruz). All patients were therefore considered as a unique group for analysis.

Both the patient' and control' samples are in Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2=1.82$, $p=0.41$; $\chi^2=0.82$; $p=0.66$, respectively), but the frequency of heterozygotes for the D104N polymorphism was significantly higher in patients as compared to the control group ($\chi^2=10.23$; $p=0.0014$) (Table 2).

These findings support for the first time a potential association between a polymorphism in endostatin, one of the most potent angiogenesis inhibitors, and prostate cancer. Our results predict that individuals heterozygous for N104 have a 2.5 times greater chance of developing prostate cancer (OR 2.4; 95%CI 1.4-4.2). Association studies have been biased by potential stratification. In our sample we were able to obtain ethnic origin

of just a small number of patients. However, we observed that the Caucasians cases have a significantly higher carrier frequency than the Caucasian controls ($p=0.0488$; OR 2.19; 95% CI 1.0-4.6). The same was observed for Negroid population ($p=0.0007$; OR 13.03; 95% CI 3.3-50.8). Therefore, even if the odds ratio derived from the combined analysis has been slightly biased by potential stratification, the result is significant in both identifiable subsets themselves, confirming the results obtained with combined data. We did not observe any association between the presence of this mutation and Gleason score or age at diagnosis (Table 3), suggesting that this alteration is more related to the genesis of the tumor than to its aggressiveness. Recently, Musso et al. (20) reported that endogenous collagen XVIII levels in recurrent hepatocellular carcinomas (HCCs) were 2.2 fold lower than in those HCCs that did not recur, a finding which is in agreement with our hypothesis that individuals with higher levels of endostatin might be less prone to develop solid tumors.

D104N polymorphism possible leads to an impaired endostatin function

We have aligned the sequences of both human and mouse endostatin-XVIII as well as the endostatin-like molecule that is produced from the NC1 domain of collagen XV, which presents 61% sequence identity with that of collagen XVIII (21). This analysis showed that the aspartic acid at position 104 is conserved in all cases. In all of the three crystal structures, this residue is located at the surface of the molecule, partially buried through a hydrogen bond between OD1 (oxygen delta 1) and an internal serine residue (S102 in the human endostatin-XVIII). The atom OD2 (oxygen delta 2) is surrounded by positively charged residues and, in the high-resolution mouse structures, it is interacting through a strong salt bridge to an arginine residue. In the human endostatin, however, this

arginine corresponds to K106, whose NZ (nitrogen zeta) is in close proximity to the OD2 of D104.

The modeling of the D104N mutant could encompass two possible arrangements for the asparagine sidechain. In one configuration, the -NH₂ group would occupy the buried OD1 position, necessarily interacting with S102, which is unlikely to happen since the residue S102 is acting as a proton donor to D104 and a proton acceptor for the main chain -NH group of K106. Therefore, the second configuration is favored, with the -NH₂ group of the mutant N104 occupying the OD2 position of D104. Starting from a modeled mutant structure based on the second configuration, the molecular energy minimization shows little rearrangement of the surrounding residues to accommodate the new -NH₂ group of N104. On the other hand, the same procedure applied to the human structure resulted in a different conformation for K106, in terms of the distance to a salt-bridge to D104 (Figure 1). Figure 2 represents the electrostatic potential at the surface of both wild-type and the mutated structures, showing the altered charge distribution surrounding the D104N mutation.

The structure modeling analysis thus suggests that the human mutated D104N protein is stable, a result further supported by the finding that endostatin-XVIII serum levels were similar both in carriers and non-carriers of this mutation (17.38 ± 5.55 ng/ml; 17.17 ± 5.99 ng/ml, respectively).

Recent studies have shown that inhibition of endothelial cell proliferation and migration of cultured endothelial cells might occur through the binding of an endostatin epitope of two clusters of arginine to heparin/heparan sulphate when angiogenesis is induced by FGF-2 (22). This heparin binding epitope does not include D104; however, it is possible that this amino acid and its surrounding residues are presented for the interaction with a yet undetermined target receptor. The existence of another interaction site in

endostatin is also supported by the observation that inhibition of VEGF-induced migration of endothelial cells is not dependent on its heparin-binding epitope. Thus, we hypothesize that the D104N mutation might decrease the ability of endostatin to bind other molecules, thereby impairing its ability to inhibit angiogenesis. The amino acid D104 is conserved in both man and mouse, and it is also conserved in endostatins from both collagen XV and XVIII, implying that this residue is in a functionally important region of endostatin, with a common role for both angiogenesis inhibitors. It will be important to perform functional analyses to test the above hypothesis. The confirmation of the association of N104 with prostate cancer in other populations will also be important to support the possible screening for this mutation as a predictive test for prostate cancer.

Acknowledgements

We thank Dr. Paulo A. Otto for valuable suggestions in statistical analysis; Dr. Zatz for helpful discussions; C. Urbani for secretarial assistance and Mrs. Elisângela Quedas, Mrs. Silvia Bando and Mrs. Patrícia Mendonça for technical assistance. This research has been supported by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) and the Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX). M.R.P.B and G.O. are supported in part by an International Research Scholars grant from the Howard Hughes Medical Institute.

Legend for figures:

Figure 1: Sobreposition between the modeled structures of human endostatin-XVIII and the mutant D104N. The residues labeled in this figure were the only not fixed during the energy minimization protocol. The residue K106(mod) corresponds to the final conformation in the structure modeled (differs from the deposited structure), while K106(mut) corresponds to the final conformation calculated for the mutated D104N structure.

Figure 2: Electrostatic Surface Potential of human endostatin-XVIII (A) and the mutant D104N (B). Red and blue coloring represent negative and positive potentials, respectively. The orientation is about the same for both. Figure made with GRASP.

Table 1 – *COL18A1* variants and their frequency¹

Localization	Nucleotide change	Type of mutation	Frequency
Exon 03	c679A→G	Silent	30% ²
Exon 07	c1408G→A	Silent	16%
Exon 07	c1417C→G	Silent	33%
Exon 07	c1420C→T	Silent	8%
Exon 07	c1426G→T	Silent	33%
Exon 10	c1804T→C	Silent	10% ²
Exon 11	c1855C→T	Silent	50%
Exon 11	c1870C→T	Silent	50%
Exon 11	c1885C→A	Silent	50%
Exon 13	c2008C→T	Silent	8%
Exon 19	c2500T→C	Silent	15% ²
Exon 21	c2561A→G	I841V	16%
Exon 35	c3376C→T	Silent	16%
Exon 42	c4349G→A	D1437N	12% ³
Intron 06	g70362G→A	intronic	16%
Intron 06	g70377-70378 del AT	intronic	16%
Intron 25	g87517-87518 ins CCACTGCCCTCCCG	intronic	12%
Intron 31	g91374 del C	intronic	10%
Intron 38	g102233-102275 del 42bp	intronic	30%
Intron 41	g105865-105866 ins AC	intronic	62%

¹Variants identified through the sequencing of the 43 exons (and its flanking intronic regions) of the *COL18A1* in 8 patients with Knobloch syndrome (17); Allele frequency estimates based on the initial screening or ² the analysis of 50 control chromosomes; ³polymorphism described in the present report.

Table 2 – Endostatin genotype distribution among control and patient groups.

	Genotypes*	Subjects with racial classification		Total Sample N (%)
		Caucasians (N/%)	Negroids (N/%)	
Controls	DD	89 (84%)	76 (92.6%)	174 (87.9%)
	DN	17 (16%)	7 (8.4%)	24 (12.1%)
	Total	106 (100%)	83 (100%)	198 (100%)
Patients	DD	43 (70.5%)	5 (45%)	135 (74.5%)
	DN	18 (29.5%)	6 (55%)	45 (24.9%)
	NN	0	0	1 (0.6%)
	Total	61 (100%)	11 (100%)	181 (100%)

*D aspartic acid/ N asparagin

Table 3 –Endostatin genotype distribution according to Gleason score and age in prostate cancer

Genotypes*	Gleason score <7 (%)	Gleason score ≥7 (%)	Age <65 years (%)	Age ≥65 years (%)
DD	51 (75%)	68 (82%)	47 (70.1%)	79 (73.1%)
DN	17 (25%)	15 (18%)	20 (29.9%)	28 (26%)
NN	0	0	0	1 (0.9%)
Total	68 (100%)	83 (100%)	67 (100%)	108 (100%)

*D aspartic acid/ N asparagin

References

1. Stanford, J. L., Just, J. J., Gibbs, M., Wicklund, K. G., Neal, C. L., Blumenstein, B. A. and Ostrander, E. A. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res.* 5:1194-1198, 1997.
2. Siegal, J. A., Yu, E. and Brawer, M. K. Topography of neovascularity in human prostate carcinoma. *Cancer* 7:2545-2551, 1995.
3. Carter, B. S., Beaty, T. H., Steinberg, G. D., Childs, B. and Walsh, P. C. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *PNAS* 8:3367-3371, 1992.
- 4 Visakorpi, T. Molecular genetics of prostate cancer. *Ann. Chirurg. Gynaecol.* 88:11-16, 1999.
5. Tavtigian, S. V., Simard, J., Teng, D. H. F., Abtin, V., Baungard, M., Beck, A., Campi, N. J., Carillo, A. R., Chen, Y., Dayananth, P., Desrochers, M., Dumont, M., Farnham, J. M., Frank, D., Frye, C., Ghaffari, S., Gupte, J. S., Hu, R., Iliev, D., Janecki, T., Kort, E. N., Laity, K. E., Leavitt, A., Leblanc, G., McArthur-Morrison, J., Pederson, A., Reid, J. E., Richards, S., Schroeder, M., Smith, R., Snyder, S. C., Swedlund, B., Swensen, J., Thomas, A., Tranchant, M., Woodland, A-M., Labrie, F., Skolnick, M. H., Neuhausen, S., Rommens, J. and Cannon-Albright, L. A. A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat. Genet.* 27:172-180, 2001.
6. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285:1182-1186, 1971.
7. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 8:353-364, 1996.

8. Sasaki, T., Fukai, N., Mann, K., Göhring, W., Olsen, B. R. and Timpl, R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* 17:4249-4256, 1998.
9. O' Reilly M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 8:277-285, 1997.
10. Dhanabal, M., Ramachandran R., Waterman, M. J. F., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M. and Sukhatme, V. P. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274:11721-11726, 1999.
11. Dixelius, J., Larsson, H., Sasaki, T., Holmqvist, K., Lu, L., Engstrom, A., Timpl, R., Welsh, M. and Claesson-Welsh, L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 95:3403-3411, 2000.
12. Yoon S. S., Eto, H., Lin, C-m., Nakamura, H., Pawlik, T. M., Song, S. U. and Tanabe, K. K. Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases. *Cancer Res.* 59:6251-6256, 1999.
13. Perletti, G., Concarri, P., Giardini, R., Marras, E., Piccinini, F., Folkman, J. and Chen, L. Antitumor activity of endostatin against carcinogen-induced rat primary mammary tumors. *Cancer Res.* 60:1793-1796, 2000.
14. Yokoyama, Y., Green, J. E., Sukhatme, V. P. and Ramakrishnan, S. Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinomas in a transgenic mouse model. *Cancer Res.* 60: 4362-4365, 2000.
15. Zorick, T. S., Mustacchi, Z., Bando, S. Y., Zatz, M., Moreira-Filho, C. A., Olsen, B. and Passos-Bueno, M. R. High serum endostatin levels in patients with Down's

syndrome: implications for improved treatment and prevention of solid tumors.

Submitted in EJHG.

16. Hasle, H., Clemmensen, I. H. and Mikkelsen, M. Risk of leukemia and solid tumors in individuals with Down's syndrome. *Lancet* 355:165-169, 2000.
17. Suzuki, O., Sertié, A. L., Murray, J., Kok, F., Monteiro, M., Passos-Bueno, M. R. Identification of novel pathogenic and polymorphic mutations in the COL18A1 gene. *Manuscript in preparation.*
18. Fleiss, J. L. **Statistical methods for rates and proportions** John Wiley & Sons Inc. New York, 1973.
19. Molecular modeling and mutant structure analysis performed by i.(Grasp) Nicholls, A.; Sharp, K.A. and B.J. Honing *Proteins* 11: 218-296,1991. ii.(Swiss PDB Viewer) Guex, N. and Peitsch, M.C. *Electrophoresis* 18: 2714-2723, 1997. iii.(Insight-II/Discover) BIOSYM/Molecular Simulations Inc. Insight II/Discover program, 1995 iv.(The "O" program) Jones. T.A.; Zou, J.-Y.; Cowan, S.W. and Kjeldgaard, M. *Acta Crystallogr. A*47: 110-119, 1991.
20. Musso, O., Rehn, M., Theret, N., Turlin, B., Bioulac-Sage, P., Lotrian, D., Campion, J.P., Pihlajaniemi, T. and Clement, B. Tumor progression is associated with a significant decrease in the expression of the endostatin precursor collagen XVIII in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 61: 45-49, 2001.
21. Sasaki, T., Larsson, H., Tisi, D., Claesson-Welsh, L., Hohenester, E. and Timpl, R. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *JMB* 301:1179-1190, 2000.

22. Hohenester, E., Sasaki, T., Olsen, B. R. and Timpl, R. Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *EMBO J.* 17:1656-1664, 1998.

Figure 1

Surface Potential -5.612 -2.806 0.000 2.850 >+ Surface Potential -5.612 -2.841 0.000 2.850 >+

Figure 2