

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS
ISOENZIMAS 5-ALFA-REDUTASE I E II EM TECIDO PROSTÁTICO DE
PACIENTES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

EMANUEL BURCK DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE TÉCNICA PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS
ISOENZIMAS 5-ALFA-REDUTASE I E II EM TECIDO PROSTÁTICO DE
PACIENTES DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

EMANUEL BURCK DOS SANTOS

ALUNO

WALTER JOSÉ KOFF

ORIENTADOR

PORTO ALEGRE

2005

Não há fé inabalável senão aquela que pode encarar a razão
face a face, em todas as épocas da Humanidade

(Hippolyte Léon Denizard Rivail)

Ao meu amado pai, Ubiracy, que me legou o gosto pela leitura,
o apreço pela ciência e pela ética

À minha amada mãe, Anália, que encheu minha vida de afeto e dedicação

À minha amada mulher, Andressa, que me completa

Ao meu grande mestre Professor Doutor Walter J. Koff, que
não apenas possibilitou o presente trabalho, com também foi
decisivo para minha formação como médico e ainda me
tornou um incondicional admirador
da vida acadêmica

Ao Doutor Milton Berger, exemplo de médico, cientista e professor
a quem confiei aos cuidados um dos meus maiores tesouros

Ao Doutor Cláudio Luís Martins Lima pelo
exemplo constante, combinando habilmente
humildade e sapiência

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Osmar Luís Magalhães de Oliveira que começou a estudar a enzima 5-alfa-redutase em nosso meio.

À professora Vera Trindade que disponibilizou o laboratório de bioquímica sob sua responsabilidade para a realização desse trabalho.

À bioquímica Francine Muraro, pelo fundamental empenho na condução desse estudo.

Aos Acadêmicos Rodrigo Wey Rodrigues, Roberto Fisher e Daniel Soares pela imprescindível colaboração em momentos cruciais desse trabalho.

Aos incansáveis colegas Daniel M. Moreira, André Berger, Tiago E. Rosito, Roberto L. Müller, Marcelo Pimentel, Daniel Mellechi de Freitas, Daniel Zylberstejn, Nelson Batezini e Renan Desimon pela vital colaboração.

Aos companheiros Brasil Silva Neto, Jeverson Wagner e Jair Dacás pelo incondicional apoio.

Aos colegas Leonardo I. Dini e Karin M. Jaeger Anzolch por terem cedido-me suas dissertações de mestrado, que de alguma forma me inspiraram.

Aos queridos professores e médicos-contratados Dr. Protásio Alves, Dr. Bernardo Moreira e Dr^a Nancy T. Denicol, aos quais reitero minha constante admiração e agradecimento.

À competentíssima secretária do Serviço de Urologia Norma da Silva.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Serviço de Urologia, Centro Cirúrgico Ambulatorial, Bloco Cirúrgico, Medicina Nuclear, Serviço de Patologia, Engenharia) e ao

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À minha querida irmã Anelisa e ao meu afilhado Guilherme, minhas madrinhas Rosamália e Zenir, meus sogros, meus cunhados e à minha afilhada Luísa.

Aos Financiadores desse Projeto, FIPE, Fundação Médica do Rio Grande do Sul, e Serviço de Urologia do HCPA.

Aos pacientes que colaboraram generosa e voluntariamente com a condução desse estudo.

Ao digníssimo professor Walter Koff, sem o qual nada disso seria possível, meu mais especial agradecimento.

SUMÁRIO

1. Lista de Abreviaturas.....	10
2. Fundamentação Teórica e Revisão da Literatura.....	13
2.1. Introdução.....	14
2.2. Biologia e Propriedades Bioquímicas da 5-Alfa-Redutase.....	16
2.3. Genética da 5-Alfa-Redutase.....	21
2.4. Pseudohermafroditismo Masculino por Deficiência da 5-Alfa-Redutase Tipo II...26	
2.5. Próstata Normal, Hiperplasia Prostática Benigna e Câncer de Próstata.....	28
2.5.1. Hiperplasia Prostática Benigna.....	29
2.5.2. Câncer de Próstata.....	34
2.6. Hiperplasia Prostática Benigna, Câncer de Próstata e 5-Alfa-Redutase.....	41
2.7. Inibidores da 5-Alfa-Redutase.....	50
3. Referências Bibliográficas da Fundamentação Teórica.....	54
4. Objetivo e justificativa.....	58
5. Artigo em língua portuguesa.....	59
5.1. Resumo.....	60
5.2. Introdução.....	61
5.3. Material e Métodos.....	62
5.4. Resultados.....	64
5.5. Discussão.....	65
5.6. Conclusão.....	66
5.7. Financiamento.....	66
5.8. Referências.....	67
6. Artigo em língua inglesa.....	69

6.1. Abstract.....	70
6.2. Introduction.....	72
6.3. Material and Methods.....	74
6.4. Results.....	76
6.5. Discussion.....	77
6.6. Conclusion.....	78
6.7. Sponsoring.....	79
6.8. References.....	79
7. Anexos (Figuras e Tabelas).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS:

AA = aminoácidos

AP = exame anátomo-patológico

AR = receptor androgênico

BAM = bloqueio androgênico máximo

CaP = câncer de próstata

$^{14}\text{C-T}$ = testosterona marcada radioativamente com carbono 14

5α = 5-alfa-redutase

5α I = 5-alfa-redutase tipo I

5α II = 5-alfa-redutase tipo II

DNA = ácido desoxirribonucléico

DHT = diidrotestosterona

DU145 = cultura de células de adenocarcinoma prostático humano

17β -HSD = 17-beta-hidroxiesteroide oxidoreductase

ELISA = Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assays

et al. = e outros

EUA = Estados Unidos da América

HPB = hiperplasia prostática benigna

I-PSS = escore internacional de sintomas prostáticos

IC = intervalo de confiança

KD = kilodaltons

K_m = afinidade do substrato (constantes de Michaelis-Menten)

L= leucina

L/L = alelos leucina/leucina

LH = hormônio luteinizante

LNCAP= cultura de células de linfonodos com adenocarcinoma prostático metastático

mg = miligramas

ml = mililitros

NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

ng/ml = nanogramas/mililitro

OR = *odds ratio*

PCPT = Prostate Cancer Prevention Trial

PIN = neoplasia intraepitelial prostática

PLESS = Proscar Long Term Efficacy and Safety Study

PROSPECT = Proscar Safety Efficacy Canadian Two-Year Study

PROWERS = Proscar Worldwide Efficacy and Safety Study

PSA = antígeno prostático específico

Qmax = pico do fluxo urinário (fluxo máximo)

RNA = ácido ribonucléico

RNA_m = RNA mensageiro

RT-PCR = reação de cadeias de polimerase pela transcriptase reversa

RTU-P = ressecção transuretral de próstata

RUA = retenção urinária aguda

SCARP = Scandinavian Study of Reduction of the Prostate

SRD5A1 = gene que codifica a proteína 5 α I

SRD5A2 = gene que codifica a proteína 5 α II

STUI (LUTS) = sintomas do trato urinário inferior (low urinary tract symptoms)

T= testosterona

3α -diol = 5α -androstane 3α - 17β -diol

3α -HDS= 3-alfa-hidroxiesteroideoxidoreductase

3β -diol = 5α -androstane 3β - 17β -diol

$t_{1/2}$ = meia-vida

V= valina

V/L = alelos valina/leucina

V_m = velocidade máxima (constantes de Michaelis-Menten)

V/V = alelos valina/valina

ZC = zona central da próstata

ZP = zona periférica da próstata

ZT = zona de transição da próstata

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

INTRODUÇÃO

O principal androgênio envolvido no desenvolvimento e crescimento prostático é a Diidrotestosterona (DHT) (1, 2). A concentração de DHT na próstata é cerca de cinco vezes a de testosterona (T). Somente a testosterona livre (apenas 2% da T é livre) está disponível na próstata para formar DHT, sendo que 90% daquela é convertida a essa. A conversão de T em DHT é irreversível. No plasma a concentração de DHT é muito baixa, cerca de 11 vezes menor que a da T. Noventa e cinco por cento da T produzida tem origem testicular (células de Leydig). A meia-vida plasmática da testosterona varia de 10 a 20 minutos. Na próstata a T tem papel de pró-hormônio, pois a DHT originada da T é que apresenta maior efeito androgênico (ampliação do efeito androgênico da T) (3). A enzima que catalisa a reação T à DHT é a 5-alfa-redutase (5 α r). Em 1952 foi realizada a descrição inicial da 5 α r. Entretanto o primeiro hormônio androgênico caracterizado (que na verdade foi isolado na urina), foi denominado androsterona em 1931 por Butenant. Em 1935 Ernest Laquer e colaboradores demonstraram que, na verdade, o hormônio produzido pelos testículos era a T e não a androsterona. A androsterona era um metabólito inativo da T cuja função era aumentar a solubilidade em água para que a mesma pudesse ser excretada na urina. Também na década de 1930 foi descrita a DHT. Na década de 1950 foi caracterizada a 5 α r em fígado de rato, e na de 1960 foi descoberto que, em ensaios envolvendo a próstata, a DHT era um andrógeno mais potente que a T. Então se demonstrou que a DHT ligava-se ao mesmo receptor androgênico (AR) que a T, mas com uma afinidade maior (4). Evidência definitiva da importância da DHT ocorreu em 1974 com a descrição da síndrome da

deficiência da 5 α r (hipospádia perineoscrotal pseudovaginal)(5). Posteriormente vários estudos demonstram haver dois tipos de 5 α r (3, 4, 6-14). A tipo I (5 α r I) apresentava pH ótimo entre 6,0 – 8,5 e predominava na pele e no fígado. A tipo II (5 α r II) apresentava pH ótimo 5,0 e predominava na próstata (4, 15-17).

Estudos apontam para uma diferente distribuição estromal e epitelial para as duas isoenzimas (10). Embora haja uma maior expressão da 5 α r II na próstata normal, bem como na Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), no adenocarcinoma de próstata a expressão da 5 α r II está diminuída, ao passo que da 5 α r I pode estar aumentada, diferentemente do que ocorre quando não há câncer de próstata (CaP). Uma possível explicação para isso é a predominância relativa da 5 α r II no estroma (aumentado na HPB estromal) e da 5 α r I no epitélio (substituindo o estroma no CaP). Na verdade tanto a 5 α r I quanto a 5 α r II estariam presentes no estroma, embora com ampla predominância da 5 α r II, mas no epitélio haveria apenas a expressão da 5 α r I (10). O co-fator presente na conversão da T em DHT pela ação das 5 α r I e II é o NADPH (3, 14).

BIOLOGIA E PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DA 5 α -REDUTASE

A DHT formada a partir da T livre que entra na célula prostática, pela ação da 5 α r com a participação do NADPH (figura 1), se liga a receptores presentes no núcleo da célula, ou então é metabolizada. A DHT pode ser convertida a 3 α -diol pela ação da enzima 3 α -HSD (3-alfa-hidroxiesteroideoxidoreductase) com a presença do NADPH como co-fator. Essa reação é reversível, isto é, o 3 α -diol pode voltar a formar DHT, assim como ser convertido a androsterona pela enzima 17 β -HSD (co-fator NADPH). A androsterona pode voltar a ser 3 α -diol e, por conseguinte, DHT, pois a reação que leva o 3 α -diol a formar androsterona é reversível. Além do 3 α -diol a DHT pode ainda ser convertida, dentro da próstata, a 3 β -diol. Essa reação é também reversível e catalisada pela enzima 3 β -HSD com a presença do co-fator NADPH. Entretanto, o 3 β -diol é irreversivelmente metabolizado a 6 α -triol, pela ação da enzima 6 α -hidroxilase, ou a 7 α -triol pela 7 α -hidroxilase. As reações que levam ao surgimento dos trióis a partir do 3 β -diol são irreversíveis. A administração de 3 α -diol induz forte efeito androgênico por rápida conversão a DHT, ao passo que a administração de 3 β -diol não tem efeito androgênico significativo posto que é convertido irreversivelmente de forma rápida e eficaz a 6 α -triol e 7 α -triol (metabólitos inativos). Os trióis são os metabólitos finais da T na célula prostática. São hidrossolúveis, inativos e não podem voltar a ser DHT (2). A T pode ser também convertida a androstenediona, reação essa reversível e catalisada pela 17 β -HSD. A androstenediona pode então se convertida pela enzima 5 α r a androstandiona em uma reação irreversível. Há de se notar que a androstandiona também é o produto da DHT convertida pela 17 β -HSD em uma reação reversível. A androstandiona seja ela formada a partir do substrato androstenediona seja

através do substrato DHT (ambos produzidos através da conversão da T) é então metabolizada a androsterona pela ação da enzima 3α -HSD em uma reação reversível (figura 2) (18).

A ação da enzima 5α em outros tecidos também pode ocorrer sobre outros substratos tais como 20α -hidroxi-preg-4-em-3-one, 17α -hidroxi-progesterona, epitestosterona, progesterona e androstenediona (3, 4).

Ademais há também uma grande variação em relação à atuação da enzima em diferentes espécies animais e vegetais (3, 19-22). No caso da próstata de ratos a atividade da 5α I está associada a um papel catabólico no metabolismo dos esteróides, ao passo que a 5α II é mais importante nos processos anabólicos. O pH ótimo para a 5α I é mais neutro a alcalino, e da 5α II é mais ácido (23). Cães têm sido usados como modelos experimentais para o estudo da expressão da 5α e o desenvolvimento de HPB, pois os caninos freqüentemente são acometidos por essa hiperplasia. A homologia entre a seqüência de aminoácidos da 5α entre cães e humanos foi de 83% para a tipo I 88% para a tipo II. Comparando-se a distribuição da 5α em diferentes tecidos entre ratos, cães e humanos, várias diferenças tem sido encontradas. Na próstata humana 5α II é a mais abundante, enquanto que em ratos ambas são similarmente expressas. Já nos cães há um predomínio da 5α I em análises realizadas pelas técnicas de reação de cadeias de polimerase pela transcriptase reversa (RT-PCR). Já nos epidídimos de ratos, cães e humanos a atividade da enzima foi muito semelhante. Em rins de cães tanto a 5α I quanto a II apresentaram alta atividade, todavia em humanos isso não se verificou (8). Em homens foi realizado estudo em relação à variação racial da enzima, já que o CaP parece ter risco alto em afro-americanos, intermediário em brancos e baixo em orientais. No referido estudo foi analisado a associação de um metabólito da 5α , o 3α -diol, com a presença de CaP em

caucasóides, negróides e mongolóides. Entre os amarelos, o nível do metabólito estudado foi estatisticamente mais baixo que nos demais grupos. Os níveis de 3α -diol foram mais altos nos brancos, intermediário nos negros, e baixos nos amarelos, mesmo quando emparelhados por idade (24). Entretanto, o 3α -diol é apenas um dos metabólitos da 5α , não podendo se chegar a nenhuma conclusão apenas com sua análise isolada.

A DHT tem papel fundamental na virilização. As duas isoenzimas com seu cofator NADPH tem ampla especificidade para esteróides contendo a configuração $\Delta^4,3$ -keto. A 5α -redução é essencialmente irreversível. Andrógenos fracos como androstenediona desempenham sua função porque são convertidos nos tecidos-alvo a T e a DHT. A T tem papel fundamental em três processos funcionais masculinos: 1º - na regulação da secreção de hormônio luteinizante (LH); 2º - virilização dos ductos de Wolff; 3º - regulação da espermatogênese. As demais ações androgênicas na embriogênese e na vida pós-embriônica são largamente mediadas pela DHT. Ademais, a HPB pode ser induzida em cães pela administração de DHT. A 5α II é a predominante (não exclusiva) no trato urogenital masculino, enquanto que a 5α I está no fígado, e nas glândulas sebáceas da pele não genital (exceto no prepúcio e nas células epiteliais do epidídimo e da próstata que, embora sejam genitais, apresentam predomínio da 5α I). Além de estar no estroma prostático, 5α II está presente nos folículos pilosos do couro cabeludo e no estroma das vesículas seminais. Enquanto a 5α I se relaciona mais com a acne, a 5α II se relaciona mais com a calvície masculina (3, 5, 15).

A 5α redução exclui a aromatização de andrógenos a estrógenos (3), embora haja controvérsia quanto a presença de aromatase na célula prostática (25), e promove acúmulo intracelular de andrógenos (3). Há evidências de que a tanto a T quanto a DHT ajam através de um único tipo de receptor AR, sendo que a estrutura mais plana da DHT favorece uma

ligação mais firme com o receptor. Essa alta afinidade de ligação ocorre também devido à baixa dissociação da DHT em relação ao AR. Evidência convincente de que o maior efeito da 5α redução em animais intactos é o de ampliar o sinal androgênico vem da demonstração de que camundongos com aparente ausência de DHT formam genitais masculinos internos e externos. Porém em humanos há uma profunda interferência na virilização quando ocorre deficiência da 5α r II (ver adiante na parte sobre a hipospádia perineoescrotal pseudovaginal no pseudo-hermafroditismo masculino na síndrome da deficiência da 5α r II). A diferença entre o que ocorre com os camundongos e com os humanos é que enquanto nos homens os níveis de T prostática mudam pouco com a inibição natural da 5α r II, no camundongo o nível desse hormônio aumenta mais de 100 vezes na próstata e nas vesículas seminais quando ocorre inativação de ambas isoenzimas. Em homens e em cães o metabolismo da T a androstenediona mantém os níveis de T tecidual baixos quando a 5α r II está inibida. A clara implicação disso é que altos níveis de T podem provocar as mesmas funções da DHT em baixas concentrações. Sendo assim, o efeito fundamental da DHT é o de ampliar um fraco sinal hormonal (3).

Curiosamente a castração leva ao aumento da síntese de DNA na próstata seguido por 90% de involução epitelial, mas com somente 20% de involução estromal (15). Os andrógenos T e DHT, como dito anteriormente, controlam a transcrição gênica na célula alvo (*exemplo*: próstata) através da ligação com o AR que ocorre no retículo endoplasmático perinuclear. Isso porque a 5α r é hidrofóbica e está mergulhada na bicamada lipídica constituída pelo por esse retículo. O complexo hormônio-receptor é transportado por dentro da membrana até o núcleo da célula (portanto está presente em alta concentração nessa parte) e então atua sobre o DNA estimulando a transcrição de um RNA mensageiro que irá ser traduzido a proteínas que deixarão a célula para exercerem seu efeito

metabólico controlado pelo sinal hormonal (15, 17). A DHT pode ainda ligar-se diretamente aos AR nucleares (4). Modulação intracrina é o fenômeno que acaba por ocorrer no interior da célula prostática, e se refere à ampliação do poder androgênico da T, a partir da transformação no citoplasma da célula-alvo (no retículo endotelial), em seu metabólito androgenicamente mais ativo, a DHT. A T, por ser o principal andrógeno circulante, tem papel fundamental na libido e na função sexual (17).

As propriedades bioquímicas propriamente ditas da 5 α r referem-se ao fato de ambas isoenzimas serem proteínas hidrofóbicas compostas por 260 aminoácidos com peso molecular de 29.000. Os aminoácidos hidrofóbicos estão distribuídos ao longo das supracitadas isoenzimas. A estrutura bioquímica sugere que a 5 α r seja uma enzima de membrana, profundamente circundada por bicamada lipídica. Várias seqüências de aminoácidos são iguais na 5 α r I e na 5 α r II. Para a tipo I o pH ótimo varia de 6,0 a 8,5, ao passo que para a tipo II o pH é de 5,0. Os pH alcalino e ácido são diagnósticos para as 5 α r (diferenciam a 5 α r I da 5 α r II). Em células intactas o pH da 5 α r II tende a ser mais neutro (7,0) que ácido (nas células lisadas dos homogeneizados) (2, 4).

Em relação aos parâmetros cinéticos pode-se dizer que o K_m da 5 α r I para a T é de 1 – 5 μ M. Já o K_m da 5 α r II para a T é submicromolar (0,1 – 1,0 μ M). O K_m para o cofator NADPH é 3 – 10 μ M para ambas isoenzimas. As observações de que a 5 α r II tem mais alta afinidade pela T e é mais eficiente em pH neutro em células lisadas sugere que essa enzima age em pH neutro no interior da célula. Tanto a 5 α r I quanto a 5 α r II tem longa meia-vida ($t_{1/2}$ = 20-30 horas). O $t_{1/2}$ das isoenzimas não é alterado pelos 4-azasteróides (finasterida). Estudos imunohistoquímicos demonstram que a localização da enzima no retículo endoplasmático é perinuclear, conforme já descrito acima. As isoenzimas também apresentam diferentes sensibilidades a diferentes inibidores (4, 14, 17).

GENÉTICA DA 5 α -REDUTASE

Dificuldades em purificar a 5 α r devido a extrema insolubilidade só foram contornadas em 1989 com a clonagem do DNA responsável pela codificação da 5 α r em ratos. Esses estudos levaram à descoberta de dois genes, um para cada isoenzima (5, 16, 17). Em 1992 Jenkins, Andersson, McGinley, Wilson e Russel publicaram um memorável artigo sobre a evidência genética e farmacológica de mais de uma 5 α r em humanos (14).

Dois genes, portanto, codificam a 5 α r (um para cada isoenzima). Embora esses genes estejam localizados em cromossomos diferentes, apresentam uma notável semelhança. Esses genes estão presentes em todas as espécies examinadas até então. Os introns e exons se assemelham em muito (3, 17). Ambos genes para 5 α r apresentam 5 exons e 4 introns, e a posição dos introns é idêntica para os dois, sugerindo que os dois genes devem proceder de uma duplicação original única (de um gene que era único, filogeneticamente falando). Não obstante a estrutura genética seja muito semelhante, o gene que codifica a 5 α r I ocupa um cromossomo diferente do que codifica a 5 α r II. O símbolo para o gene que codifica a 5 α r I é SRD5A1 e o da 5 α r II é SRD5A2. Portanto, somente quando estivermos nos mencionando à enzima (proteína) os símbolos serão 5 α r I e II. Quando mencionarmos os genes que as codificam, respectivamente, escreveremos SRD5A1 e SRD5A2. O SRD5A1 está localizado na parte distal do braço curto do cromossomo **5** (banda p15), ao passo que o SRD5A2 está na banda p23 do cromossomo **2** (4, 13, 15, 17).

O potencial da 5 α r como paradigma para a biologia do desenvolvimento foi percebido graças ao estudo das mutações naturais do gene SRD5A2. As referidas mutações levam a deficiência da 5 α r II com conseqüente alteração na diferenciação sexual masculina.

Há três estágios temporais no desenvolvimento do fenótipo masculino: o primeiro começa com a formação do sexo cromossômico (genótipo 46, XY) que inicia com a fecundação. A segunda etapa é determinada pela presença do cromossomo Y através do gene SRY (denominado gene determinante do testículo) (4). Então se define o sexo gonadal, pois o gene SRY do cromossomo Y determina a diferenciação testicular (e não ovariana) da gônada primordial indiferenciada. Uma vez que a gônada fetal passa ser o testículo, esse, por sua vez, passa a produzir T, iniciando o terceiro estágio do desenvolvimento fenotípico masculino. A T age sobre o AR, e essa interação T-AR desencadeia a formação de estruturas genitais masculinas **internas** tais como os epidídimos, as vesículas seminais, e os ductos deferentes. No trato urogenital embrionário a T é convertida a DHT pela 5 α r, que se liga ao mesmo AR da T, mas com afinidade muito superior (como visto anteriormente). A interação DHT-AR finalmente induz a diferenciação da genitália **externa** (pênis e escroto) e ao desenvolvimento da **próstata**. Essa glândula começa a ser formada na 10^a semana de gestação sob a influência da DHT sobre o segmento uretral do seio urogenital. Isso então completa os estágios de desenvolvimento ontogenético (intra-uterino). Nota-se que o processo que leva a formação dos genitais externos masculinos bem como à formação da próstata não tem interferência nos passos que o antecedem no desenvolvimento sexual. Por isso que caso haja alterações no gene SRD5A2, e por conseguinte na codificação da 5 α r II, a conseqüente diminuição da DHT (diminuição, mas não ausência, posto que o gene SRD5A1 ainda está ativo) leva a alterações importantes no desenvolvimento genital externo e da próstata sem, contudo, haver alterações na formação dos genitais internos (testículos, epidídimos, vesículas seminais, ductos deferentes). O aumento da atividade da 5 α r I na pele durante a puberdade e também a presença contínua dessa isoenzima no fígado, parecem explicar porque a maior parte dos indivíduos acometidos pela deficiência da 5 α r II

acabam virilizando em extensão variável na puberdade. Ajuda a explicar também porque se pode demonstrar a presença de DHT em indivíduos com deficiência da isoenzima tipo II. Como o fígado e a pele representam larga proporção da massa corporal (cerca de 25%) e como esses órgãos expressam substancialmente a 5 α I, parece que a virilização nesses casos é devido a síntese de DHT através da catalisação da 5 α I ao invés da 5 α II (4). Isso sugere que a DHT possa agir também como hormônio circulante, já que a mesma, nesses casos, seria produzida apenas no fígado e na pele, mas seria encontrada na circulação. A DHT como hormônio circulante não teria apenas efeito autócrino e parácrino, mas também endócrino (embora em concentração bem inferior a da T circulante) (4). Todavia cabe-se ressaltar que do ponto de vista endócrino a T é mais importante, ao passo que do ponto de vista autócrino, nas células-alvo para a T, a DHT é mais importante. Por conseguinte pode-se dizer que ainda assim os homens com deficiência da 5 α II não apresentarão desenvolvimento prostático normal, demonstrando claramente a importância da 5 α II, com a conseqüente ação autócrina da DHT, no desenvolvimento da glândula prostática. Nesse contexto se insere a utilidade de inibidores farmacológicos da 5 α II (como a finasterida) no tratamento da HPB (4, 5, 13, 15, 16). Ainda em relação a importância específica da 5 α II no desenvolvimento sexual masculino, em estudos realizados com macacas grávidas em que foi administrada finasterida, observou-se que houve alterações nos fetos masculinos, tais quais as observadas nos casos genéticos congênitos de deficiência da 5 α . Isto é, ocorreram uma série de anormalidades na genitália externa dos referidos fetos, tais como hipospádia, aderências prepúciais à glândula, subdesenvolvimento escrotal, e micropênis. Há de se ressaltar que nos fetos femininos não foram registradas alterações (15).

Tem sido estudado o polimorfismo genético do SRD5A2 e sua relação com o surgimento e com a progressão do CaP. Uma simples substituição no codon 89 resulta

numa troca do aminoácido valina pelo leucina (V89L). Essa troca estaria associada a um aumento da expressão da 5 α II, já que os pacientes com o alelo valina tem alta atividade, ao passo que os com leucina tem atividade enzimática mais baixa (26). No entanto, achados diferentes tem sido encontrados em diferentes estudos (27). Nam *et al.* (26) em 2001 publicaram um estudo do tipo caso-controle (158 casos e 162 controles), assim como Pearce *et al.* (27) em 2002 (921 casos e 1295 controles). No trabalho com menor número de pacientes e publicado anteriormente, o objetivo era demonstrar se o polimorfismo genético supracitado estaria associado ao maior risco de CaP, o que poderia servir de base para o desenvolvimento de novos marcadores tumorais. Para analisarmos os resultados devemos entender que o gene SRD5A2, responsável pela síntese da enzima 5 α II, pode conter seqüências de nucleotídeos correspondentes ao aminoácido de valina nos dois alelos (V/V), leucina nos dois alelos (L/L), ou o genótipo V/L. O desfecho primário do estudo era avaliar histologicamente a presença de adenocarcinoma de próstata e correlacionar com a presença de V ou L. Outro desfecho primário era recorrência bioquímica definida como aumento do PSA em 0,2 ng/ml ou mais em duas medidas consecutivas com intervalo de 3 meses, sendo avaliada então a progressão da doença. Os resultados e as conclusões do estudo de Nam *et al* foram de que pacientes que apresentavam o alelo V no gene tinham um risco duas vezes maior para desenvolver CaP (OR= 1,0 para L/L; OR= 2,76 para V/V com IC 95% 1,17-5,78 e p=0,02), e um risco adicional duas vezes maior de apresentar progressão da doença quando comparados com pacientes com genótipo L/L (OR= 1,0 para L/L; OR= 3,19 para V/L com IC 95% 1,05-16,1 e p=0,04; OR= 4,10 para V/V com IC 95% 1,56-6,64 e p=0,02), ambos resultados significativos do ponto de vista estatístico. Já Pearce *et al.* não obtiveram os mesmos resultados, ou seja, não houve diferença estatística com risco maior entre aqueles com alelo V. Yamada *et al.* (28) também avaliaram o polimorfismo V89L no

gene SRD5A2 através de um estudo de caso-controle (105 casos x 210 controles) conduzido apenas em japoneses (o estudo de Pearce era multirracial). Assim como Pearce *et al.*, Yamada *et al.* não encontraram diferença estatisticamente significativa que conferisse maior risco àqueles que possuísem o alelo V. Portanto, ao que tudo indica, alterações no gene da 5 α II não estão relacionados ao surgimento de CaP, não confirmando os achados de Nam, talvez porque esse tenha realizado um estudo com menor número de pacientes.

PSEUDO-HERMAFRODITISMO MASCULINO POR DEFICIÊNCIA DA 5 α R II

Homens acometidos por essa síndrome apresentam deficiência apenas da 5 α R II. Portanto os mesmos têm uma forma de pseudo-hermafroditismo, haja vista que embora os genitais externos tenham fenótipo feminino (genitália ambígua), os mesmos possuem testículos, epidídimos, vesículas seminais e ductos deferentes normais, bem como cariótipo 46, XY. Nessas pessoas a próstata não se desenvolve, e ainda há uma importante diminuição na ocorrência de acne e calvície com padrão masculino. Na puberdade esses homens com genitais externos femininos virilizam, mas na idade adulta estão, todavia, protegidos da HPB, CaP e da alopecia androgênica. Esse fato natural (ainda que patológico) levou ao desenvolvimento farmacológico de drogas inibidoras da 5 α R II para o tratamento da HPB e para o tratamento da calvície (3-5, 14).

Embora ambas isoenzimas estejam presentes na próstata (5 α R I no epitélio e 5 α R II no estroma), a 5 α R I não supre a ausência da 5 α R II no desenvolvimento prostático, haja vista que a mesma está presente na supracitada forma de pseudo-hermafroditismo (10, 15, 17, 18).

O pseudo-hermafroditismo masculino por deficiência da 5 α R II, também chamado de hipospádia perineoescrotal pseudovaginal, é um importante modelo para o estudo em relação ao que a deficiência ante-natal da 5 α R pode acarretar (16). Outros aspectos também tem sido avaliados, como o papel da DHT na manutenção da massa óssea, pois se sabe que a T está associada à osteopenia, haja visto que pacientes castrados apresentam esse problema. Em um pequeno estudo conduzido por pesquisadores brasileiros do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, verificou-se que pacientes com pseudo-

hermafroditismo masculino por deficiência da 5 α II não apresentavam diminuição da massa óssea, sugerindo que a T tem um papel mais relevante que a DHT em se tratando disso (29).

PRÓSTATA NORMAL, HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA E CÂNCER DE PRÓSTATA

A próstata é uma glândula exócrina derivada de ácinos glandulares com origem no segmento uretral do seio urogenital cuja função é a de facilitar a fertilização por neutralizar a acidez do sêmen e ainda por desfazer o coágulo seminal. É na próstata que desembocam os ductos ejaculadores. Cerca de 20% do líquido seminal é proveniente dessa glândula. Está localizada sob a bexiga e ao redor da uretra prostática. Cranialmente a ela estão as vesículas seminais, estruturas responsáveis por 70% do líquido seminal. A próstata é um órgão pélvico e extraperitoneal. Está coberta pela fâscia endopélvica e pela fâscia de Denonvillier. Anteriormente há gordura pré-vesical e há também o plexo da veia dorsal do pênis (plexo de Santorini). O púbis protege e liga-se à glândula através dos ligamentos pubo-prostáticos. Posteriormente à próstata e à fâscia de Denonvillier está o reto. O esfíncter externo (estriado) está junto ao ápice prostático, na uretra membranosa. A irrigação arterial é realizada por ramos das vesicais inferiores e retais médias (ramos da íliaca interna). A inervação provém do plexo pélvico. McNeal em 1968 dividiu a próstata em zonas: periférica (70% da glândula), de transição (2%), central (20%) e fibromuscular anterior (8 a 30%). Histologicamente a próstata tem uma parte epitelial constituída por ácinos secretores, uma parte muscular lisa que comprime os ácinos, e um estroma conjuntivo que sustenta a glândula (1, 2).

A próstata é sede de várias doenças. Entre elas destacamos os processos inflamatórios, infecciosos ou não, denominados de prostatites, o aumento benigno da glândula chamado de HPB, e o CaP. Sabe-se que a próstata tem seu crescimento mediado por andrógenos. Os principais andrógenos com ação prostática são a T e a DHT, sobretudo

a última como visto anteriormente. Devido ao grande papel dos andrógenos no desenvolvimento prostático, demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (bloqueio hormonal na neoplasia de próstata e na HPB), fica claro que qualquer fator que influencie a atividade desses hormônios acaba tendo significativo papel no processo de divisão celular prostática. Estudos em cães demonstraram que a administração de DHT provocava HPB (3, 8). Também se verificou a importância da conversão da testosterona em DHT, e a influência dessa no desenvolvimento prostático, através do estudo de indivíduos com pseudo-hermafroditismo autossômico recessivo, conforme abordado anteriormente. Esse e outros dados têm demonstrado que a potência da DHT é significativamente maior que a da testosterona no tecido prostático. Portanto, um aumento da disponibilidade da DHT, seja ela mediada por uma maior conversão da testosterona pela ação da 5α , seja ela devido ao aumento primário do substrato (testosterona), levaria a um aumento do metabolismo celular prostático. Baseado nisso foram realizados inúmeros estudos sobre o papel da 5α e do efeito do bloqueio dessa enzima através de inibidores, seletivos ou não, das isoenzimas I e II (3). Antes de detalharmos esse aspecto faremos uma breve revisão sobre duas patologias diretamente influenciadas pela enzima em questão: a HPB e a neoplasia maligna de próstata.

Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A HPB é uma doença de grande prevalência em homens com mais de 50 anos. Em estudos de necropsias verificou-se uma prevalência de 50% de casos dessa doença em homens na sexta década de vida. A medida que a idade aumenta há também uma maior incidência dessa patologia (1, 2, 30). A HPB é uma doença em que ocorre uma proliferação

do tecido da zona de transição, provocando muitas vezes uma síndrome clínica chamada de Sintomas do Trato Urinário Inferior (STUI) ou *LUTS (Lower Urinary Tract Symptoms)* causada pela obstrução infravesical provocada pelo aumento do tecido prostático periuretral. Sabe-se atualmente que a HPB tem seu desenvolvimento mediado por fatores endócrinos e parácrinos (30). Os dois principais fatores envolvidos na gênese da HPB são a idade (envelhecimento) e os andrógenos, sobretudo a DHT. Acredita-se que fatores parácrinos e autócrinos envolvendo as células do estroma e do epitélio prostático estejam envolvidos no processo, bem como uma progressiva falha no processo de apoptose celular. Há um aumento na proliferação celular (hiperplasia) e não um crescimento celular propriamente dito (hipertrofia), tanto no componente estromal (muscular liso e conjuntivo) quanto no epitelial na zona de transição. A contração do músculo liso prostático (do estroma e do colo vesical) é estimulada pela ação simpática mediada pela noradrenalina, que atua em alfa-receptores, sobretudo nos alfa-1. Por isso o bloqueio alfa-adrenérgico alivia a obstrução provocada pela a HPB sem, contudo, que haja diminuição do volume glandular (componente “funcional” da obstrução) (1, 30). Já os inibidores da 5 α II (finasterida) mostraram em estudos como o PLESS uma diminuição dos sintomas às custas de uma redução no volume prostático provocada pela diminuição da DHT (componente “anatômico” da obstrução) (31).

Vários estudos a cerca da história natural da HPB tem sido conduzidos (31). Estima-se um crescimento anual médio de quatro gramas de tecido prostático em indivíduos com HPB. Ademais, as manifestações dessa doença são oscilantes, ou seja, com períodos de agravamento intercalados com de recrudescimento. Os desfechos principais seriam a melhora espontânea, a progressão dos sintomas de esvaziamento (obstrutivos) e de armazenamento (irritativos), a retenção urinária aguda, a insuficiência renal, a litogênese

vesical, e a necessidade de cirurgia. Destaca-se o fato de que o volume da próstata não se relacionar diretamente com a intensidade dos sintomas, havendo próstatas pequenas (+/- 20g) provocando mais sintomas que próstatas até mesmo muito grandes (> 50g). No primeiro caso predominaria o componente “funcional” mediado por receptores adrenérgicos alfa-1; no segundo, o componente “anatômico” determinado pelo aumento volumétrico da glândula (31). Isso explica o melhor funcionamento na finasterida em próstatas grandes quando comparada com as pequenas. A avaliação clínica da síndrome é realizada através dos escores de sintomas obtidos através do questionário auto-aplicável denominado I-PSS (*International Prostatic Score Symptoms*), do toque retal, do exame qualitativo de urina, da urocultura, da determinação sérica do antígeno prostático específico (PSA), da avaliação da função renal pela dosagem da creatinina sérica, da avaliação de resíduo pós-miccional pela ultra-sonografia abdominal, e dos estudos de fluxo (urofluxometria e estudos de pressão-fluxo). Em casos de suspeita de outras causas de STUI que não a HPB ainda podem ser realizados a uretrocistografia retrógrada e miccional, a uretrocistoscopia, a cistometria, a ultra-sonografia transretal com biópsia de próstata, entre outros exames orientados pelas suspeitas clínicas. O tratamento da HPB varia desde a observação até a prostatectomia a céu aberto (transvesical ou retropúbica). Não obstante, entre esses extremos há tratamentos progressivamente mais invasivos, entre eles o uso de fitoterápicos, inibidores da 5 α , alfa-bloqueadores, termoterapia, *stents* uretrais, prostatotomia, ressecção transuretral de próstata (RTU-P). Atualmente o padrão ouro é a RTU-P, embora a prostatectomia promova, em geral, maior alívio dos sintomas quando comparada com a RTU-P. Cada vez mais a HPB tem se tornado uma doença de tratamento clínico farmacológico graças ao advento e ao desenvolvimento de drogas comprovadamente eficazes e seguras conforme mostram vários estudos clínicos de fase III

desenhados para avaliar alfa-bloqueadores e inibidores da 5-alfa-redutase (1, 2, 32). Estudos em que foi usada a finasterida mostraram de 70% a 80% de diminuição na concentração da DHT sérica e intraprostática. Além disso, houve uma diminuição de 15% a 25% no volume prostático, sobretudo na zona periuretral. Quanto maior o volume basal da próstata, maior é a melhora do fluxo e do escore de sintomas prostáticos. Parâmetros relacionados à qualidade de vida também melhoram com o uso da medicação. Quando comparada com alfa-bloqueadores (terazosina e doxazosina), a finasterida consegue alterar a história natural da HPB, ou seja, a droga promove diminuição da chance do paciente ter retenção urinária aguda (RUA) assim como redução na chance do paciente ter de se submeter a procedimentos cirúrgicos para tratamento da HPB. Nem todos os pacientes respondem ao tratamento com finasterida, sobretudo aqueles com próstatas pequenas, mas naqueles que respondem a melhora sintomática tende a ser igual a obtida com a utilização de alfa-bloqueadores. A capacidade de detectar CaP não difere nos grupos tratados ou não com a finasterida, que foi, a propósito, o primeiro inibidor da 5 α r com significativos efeitos bioquímicos, chegando a produzir 64% de redução no volume da próstata de cães (31).

Como escrito acima, vários ensaios clínicos foram delineados para avaliar a eficácia e a segurança da finasterida no tratamento da HPB. Em meta-análise conduzida por Boyle *et al.* um número superior a 2600 pacientes em 6 estudos clínicos randomizados foram avaliados. As conclusões desse estudo, que avaliou conjuntamente o PROSPECT *study* (*Proscar Safety Efficacy Canadian Two-Years Study*), o *North American and International Phase III trials*, o *Early Intervention Trial*, o SCARP *study* (*Scandinavian Study of Reduction of the Prostate*), e ainda o *Veterans Affairs Cooperative Study*, foram que os resultados mais significativos com o uso da droga em estudo foram naqueles casos em que a próstata era maior que 40 ml. Na verdade o volume inicial da próstata foi definitivo como

preditor para desfechos favoráveis em relação ao uso da medicação. O PROSPECT e o SCARP foram dois ensaios clínicos randomizados e duplo-cegos que mostraram melhora no escore de sintomas, melhora no fluxo urinário e diminuição do volume prostático. No PROWES trial (*Proscar Worldwide Efficacy and Safety Study*), que foi um ensaio clínico internacional com dois anos de seguimento, na comparação com placebo a finasterida (Proscar – nome comercial da finasterida desenvolvida pela Merck-Sharp-Dohme) foi superior na melhora dos sintomas, do fluxo urinário, e na diminuição do volume prostático, além de na diminuição da RUA e da realização de cirurgias para tratamento da HPB. Outro importante ensaio clínico randomizado sobre o uso de finasterida no tratamento da HPB foi o PLESS (*Proscar Long Term Efficacy and Safety Study*) onde os investigadores acompanharam pacientes ao longo de 4 anos nos EUA. Os resultados mostraram que 10% dos 1.516 homens do grupo placebo e que 4,5% dos 1.524 do grupo finasterida foram submetidos a cirurgia para tratamento da HPB, e que ocorreu 6,5% de RUA no grupo placebo, enquanto que no grupo tratado foi de apenas 3%. O tratamento com finasterida também melhorou o escore de sintomas e o fluxo urinário (5, 31). *The Finasteride Study Group* em estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, placebo-controlado, avaliou 895 homens com idades entre 40 e 83 anos e com diagnóstico de HPB. O seguimento foi de 12 meses, e os braços de tratamento foram finasterida 1 mg (até agora os estudos haviam usado 5 mg), finasterida 5mg, e placebo. Como nos demais estudos, os desfechos primários foram escore de sintomas, urofluxometria, e volume prostático. A concentração de DHT sérica nesse estudo caiu a níveis de castração nos grupos usando finasterida, sobretudo no com 5 mg, mas a concentração de LH (Hormônio Luteinizante) e de T aumentaram um pouco no início do estudo e logo em seguida caíram para níveis séricos normais e assim permaneceram até o final do estudo. Também o tamanho prostático diminuiu a partir do

terceiro mês de tratamento nos dois grupos tratados com finasterida. O fluxo melhorou e os sintomas também, principalmente nos que usaram 5 mg da medicação. Houve diminuição do PSA nos indivíduos tratados, e a disfunção sexual também foi um pouco maior nos que usaram finasterida nas doses de 1 ou de 5 mg (33). Como se pode ver, o papel da finasterida no tratamento da HPB foi bem estudado, e hoje a droga parece claramente ter seu lugar na terapêutica dessa afecção. No entanto o papel da mesma tem sido investigado também no tratamento e na prevenção do CaP, como veremos adiante. Os estudos clínicos com a utilização de drogas eficazes para HPB, bem como o estudo das alterações advindas do pseudo-hermafroditismo masculino por deficiência da 5 α II deixam claro o papel dessa enzima no que se refere ao desenvolvimento prostático, entretanto ainda há muito o que pesquisar a cerca dos efeitos do bloqueio da 5 α I no tratamento da HPB (estudo COMBAT em andamento) e no CaP (estudo REDUCE em andamento).

Câncer de Próstata (CaP)

É a neoplasia mais comum em homens americanos e a segunda causa de morte por câncer nos Estados Unidos da América (EUA). A prevalência aumenta com a idade, assim como o pico de incidência. Aos 50 anos a chance de um homem ter CaP clinicamente oculto é de 40% (por achado de necropsias), mas de 9,5% para tumores clinicamente presentes (sintomas e sinais). A incidência do CaP tem aumentado nos últimos anos. Desde 1990 essa neoplasia ultrapassou os casos de câncer de pulmão e de cólon. Atualmente de terceira passou a ser a primeira em frequência em homens. Em torno de 40% dos tumores malignos que atingem homens são CaP. Segundo a *American Cancer Society* 19,8% dos homens que no momento têm mais de 50 anos desenvolverão CaP ao longo da vida. A

incidência do adenocarcinoma prostático varia geograficamente, sendo menos comum no oriente (China, Índia, Japão), e mais comum em países escandinavos (Suécia, Noruega e Finlândia) e no Canadá. Acredita-se que o tumor de próstata ocorra em quase 100% dos homens com mais de 100 anos de idade. Entretanto, em grande parte desses indivíduos o tumor será indolente. Devido a campanhas preventivas em que se utiliza o PSA para a detecção precoce da neoplasia, inicialmente houve um aumento dos casos nos EUA, porém hoje o número de novos casos diagnosticados tem declinado, provavelmente em virtude do esgotamento do reservatório (demanda reprimida de casos). No *Prostate Cancer Prevention Trial* (PCPT), ensaio clínico randomizado, duplo-cego, placebo-controlado em que foi estudada a finasterida na quimioprevenção do CaP (ver na parte sobre os inibidores da 5 α os dados a cerca dos resultados desse estudo), de um total de 18.882 homens com mais 55 anos que foram randomizados, 9.060 permaneceram até o final nos grupos finasterida (4.368 pacientes) e placebo (4.692 pacientes). A prevalência de CaP nesses homens com PSA menor ou igual a 3,0 ng/ml foi de 21,52%, mostrando que cerca de 1 em cada 6 homens apresentava CaP (34). Os mesmos autores, em um outro artigo derivado do PCPT, demonstraram que nos homens que receberam placebo, e que cujo PSA em sete anos de seguimento nunca foi maior que 4,0 ng/ml, e cujo toque retal nunca foi suspeito de CaP, a prevalência de CaP foi de surpreendentes 15,2%, sendo que 14,9% apresentavam escore de Gleason maior ou igual a 7. isso foi possível porque todos os participantes do PCPT assinaram um Termo de Consentimento em que estava prevista uma biópsia no final do estudo (portanto após 7 anos de seguimento) independentemente do PSA ou do toque retal. Naqueles cujo PSA era de 0,5 ng/ml a prevalência de CaP foi de 6,6%, nos com PSA entre 0,6 e 1,0 ng/ml foi de 10,1%, nos com PSA entre 2,1 e 3,0 ng/ml foi de 17%, e nos com PSA entre 3,1 e 4,0 ng/ml foi de 26,9 (35). Em Dissertação de Mestrado defendida no

Programa de Pós-Graduação em Medicina (Cirurgia) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 2002, Dini mostrou que de uma amostra de 3.056 pacientes que procuraram o ambulatório do Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre em programa de rastreamento voluntário, 952 (31,15%) tinham indicação de biópsia de próstata. A idade média desses pacientes era de 60,4 anos e no referido programa os métodos de detecção precoce de suspeita de CaP eram o toque retal e o PSA. Nesse estudo a prevalência geral no nosso Serviço foi de 2,61%, porém a mesma chegou a 5,63% em homens com mais de 70 anos (36).

Apesar da elevada prevalência e da elevada incidência da doença, o número de óbitos continua menor que os por neoplasia de pulmão e os por neoplasia de cólon. O caráter muitas vezes indolente do CaP justifica esse fato. A virulência do tumor prostático é muito variável, indo de indolente a muito agressivo. De um modo geral prevalecem os tumores indolentes. O tempo de duplicação do CaP em geral é um dos mais lentos dentre os tumores sólidos que acometem seres humanos. Devido a esse amplo espectro de gravidade, são utilizados vários parâmetros para avaliar o prognóstico de cada caso, bem como a importância relativa da neoplasia em relação à vida do indivíduo. Alguns desses fatores prognósticos são o estágio inicial, o grau de indiferenciação celular, conteúdo de DNA, volume tumoral total, e o PSA. Estádios iniciais baixos (como T1a, onde há menos de 5% de acometimento em próstata operada por via transuretral ou transabdominal para tratamento de HPB), baixo grau (tumores bem diferenciados), diplóides, de baixo volume total, e com PSA baixo, geralmente têm prognóstico melhor. A expressão da 5 α , como veremos em detalhes mais adiante, poderá ser no futuro mais um parâmetro prognóstico. Devido à variabilidade biológica quando se considera o potencial de agressividade do CaP (virulência variável), podemos dizer genericamente que há dois grupos de pacientes pouco

influenciados por qualquer modalidade de tratamento que seja adotada. Os grupos aos quais me refiro são, num extremo, o de muito baixo potencial biológico, ou seja, formado por aqueles em que o tratamento não alterará a expectativa nem a qualidade de vida, e na outra ponta o de alta agressividade, isto é, aquele formado por pacientes que responderão mal independentemente do tratamento empregado. Contudo, entre esses dois extremos há um grande grupo intermediário que sofre capital influência a terapêutica, alterando o desfecho esperado pela história natural da doença sem tratamento. Destaco esse fato através do dado de que até a década de 1980 a maior parte dos pacientes com CaP já apresentavam doença avançada no momento do diagnóstico (previamente ao advento da determinação do PSA sérico). Todavia, hoje em função da melhora da propedêutica, fundamentalmente obtida graças ao PSA e também à biópsia transretal guiada por ultra-sonografia, tem-se diagnosticado mais precocemente a doença, num momento em que a terapêutica possibilita maiores chances de cura. O diagnóstico precoce de neoplasias com considerável potencial biológico é o que está alterando a história natural do CaP (32). Fatores de risco tem sido apontados para o desenvolvimento. A prevenção primária com o controle desses fatores pode alterar as chances do indivíduo apresentar tal patologia não obstante o principal fator permaneça imutável: a idade. Outros fatores são a história familiar em parentes de primeiro grau, afro-americanos (controverso), e aumento da ingestão de gorduras. O gene responsável pelo desenvolvimento do CaP familiar está no cromossomo 1. Outros genes foram identificados nos cromossomos 8p, 10q, 13q, 16q, 17b e 18q. Embora todos tenhamos proto-oncogenes, parte da sua ação é neutralizada por genes protetores (supressores). Esses genes são responsáveis pela promoção da apoptose de células defeituosas. Esse mecanismo é o principal fator protetor de uma transformação neoplásica descontrolada e universal. O CaP surge porque múltiplas divisões celulares são

acompanhadas, com o passar do tempo, por fragmentações cromossômicas que alteram o material genético, permitindo que células defeituosas sobrevivam à apoptose e multipliquem-se sem controle. Isso explica dois dos fatores de risco: a história familiar (fator genético hereditário) e o envelhecimento (a medida que a idade vai aumentando, acumulam-se os defeitos genéticos adquiridos ao longo da vida). Quanto aos fatores dietéticos, alguns estudos têm indicado que o risco aumenta com a dieta rica em gorduras, talvez pelo aumento da biodisponibilidade de andrógenos ocorrida nesses casos. Fatores protetores seriam dieta pobre em gorduras, e rica em vegetais como a soja e o tomate, as fibras vegetais, o selênio, o betacaroteno, o zinco, a vitamina E, e o licopeno (32). A favor da influência ambiental (dietética) estão estudos que mostram que imigrantes orientais que vivem nos EUA têm o risco de CaP aumentado em relação aos que não migraram. Outros fatores, como o tabagismo, também tem sido correlacionados à neoplasia prostática (1, 2, 32).

Interações entre o epitélio e o estroma prostático, pela ação de substâncias com efeito parácrino como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas, parecem modular o desenvolvimento, a diferenciação e a metastatização. Noventa e cinco por cento das neoplasias de próstata são do tipo adenocarcinoma. Os 5% restantes são representados principalmente pelos carcinomas de células transicionais (segundo mais freqüente), carcinoma de pequenas células, carcinoma epidermóide, e pelos sarcomas (1, 37). A Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) é uma lesão precursora do CaP invasivo. O PIN III (alto grau) está associado 80% das vezes à CaP sincrônico. Setenta por cento dos adenocarcinomas de próstata ocorrem na zona periférica (ZP), 10 a 20% na zona de transição (ZT), e 5 a 10% na zona central (ZC). O grau de diferenciação é dado pela graduação de Gleason, cujo somatório de dos pontos representativos configura o escore de

Gleason. O grau vai de 1 a 5. O escore, de 2 a 10, sendo o 2 mais diferenciado e menos agressivos, e o 10 menos diferenciado e mais agressivo (37). O padrão de progressão pode ser local (extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal), regional linfático (acometimento de linfonodos pélvicos), sistêmico hematológico (metástases ósseas ou para qualquer outro órgão ou tecido). O PSA é uma proteína produzida normalmente pela célula prostática cuja função é de dissolver o coágulo seminal. Habitualmente existe uma pequena quantidade no sangue circulante (medido em alguns poucos ng/ml de sangue). A quantidade sérica detectada aumenta quando a permeabilidade do tecido prostático está alterada por um processo inflamatório infeccioso, neoplásico ou inespecífico. O PSA também aumenta em indivíduos portadores de HPB, sobretudo naqueles com glândulas muito volumosas. No entanto, o aumento ocorrido nas prostatites e nas neoplasias em geral é muito maior que na HPB. O PSA é um importante instrumento para detecção, rastreamento, acompanhamento e seguimento pós-operatório de pacientes com CaP. É considerado um dos mais bem sucedidos marcadores tumorais conhecidos. A maioria dos CaP são hormônio dependentes. Essa descoberta rendeu um prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia ao Dr. Huggins em 1966. A resposta do CaP metastático à ablação hormonal ocorre em cerca de 75% dos casos. No caso do bloqueio da testosterona há estudos randomizados como o *Medical Research Council* que mostraram melhora na sobrevida e diminuição das complicações em indivíduos portadores de CaP metastático tratado com bloqueio androgênico. Apesar de toda essa associação dos andrógenos à neoplasia de próstata, esses hormônios não parecem ser agentes carcinogênicos. Entretanto eles claramente aceleram o crescimento da neoplasia quando ela já existe. Além de Huggins, os cientistas Stevens e Hodges, em meados do século XX, participaram da demonstração de que o metabolismo e a divisão das células prostáticas estão associados aos andrógenos

(testosterona e DHT) e a enzima 5α . O complexo DHT-receptor estimula a proliferação de células prostáticas. Outras pesquisas mostram também a influência de fatores autócrinos

HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA, CÂNCER DE PRÓSTATA E 5-ALFA-REDUTASE

Em 1999 Habib *et al.* (38) demonstraram certos fatores controladores da expressão da 5 α r na próstata humana. Os autores basearam-se na hipótese de que a medida que ocorre a transformação da próstata normal em CaP metastático, há uma depleção progressiva da atividade da enzima em questão. Também consideraram que a 5 α r II é a mais afetada no início da neoplasia. Para elucidar o mecanismo desse possível *down-regulation* da atividade enzimática, os autores examinaram a interação entre os componentes epiteliais e estromais da próstata. Foi estudada a hipótese de auto-regulação parácrina da expressão mediada por fatores derivados de fibroblastos do estroma prostático, fatores esses atuantes na conversão de T em DHT ocorrida no epitélio prostático. Os autores basearam-se em estudos iniciais publicados, por eles mesmos, cujos dados demonstraram significativas diferenças na atividade enzimática entre os tecidos acometidos por HPB e CaP, sendo a média de valores do grupo com CaP marcadamente menor que a do grupo com HPB ($p < 0,005$). A medida que o tumor se tornava mais indiferenciado diminuía a metabolização da T catalisada pela 5 α r. Os autores consideram então que a medida da atividade da enzima poderia ser útil na confirmação histopatológica do grau do tumor, incrementando a classificação de Gleason. Outra consideração foi a de que a atividade da 5 α r poderia ser um marcador da responsividade ao tratamento hormonal do CaP. Embora PSA e receptores androgênicos estivessem presentes em metástases linfonodais e em metástases ósseas osteoblásticas, não havia expressão de atividade da 5 α r I e II nessas células que ultrapassaram a cápsula prostática, embora isso não tenha se confirmado em estudos com colônias celulares

derivadas de linfonodos acometidos por CaP em estudos subsequentes. Outro fato interessante é que a suplementação de um meio celular primário com DHT falhou em restaurar a atividade da 5 α , demonstrando que a *down-regulation* da expressão da enzima não estava ligada a privação hormonal, mas como um produto de um outro processo ainda não completamente elucidado. Ademais, havia uma interação entre estroma-epitélio através de substâncias produzidas pelos fibroblastos desse estroma que influenciam a células secretoras desse epitélio por efeito parácrino (controle parácrino da 5 α nas células epiteliais). Foi descoberto um fator derivado do estroma que aumenta a expressão da 5 α II nas células do epitélio prostático humano. Esse fator é uma proteína com aproximadamente 10 KD cuja natureza ainda não está completamente esclarecida, mas que pode ter um papel de grande relevância na transformação oncogénica do epitélio prostático (38).

A presença da 5 α I no epitélio prostático (tecido glandular) e da 5 α II no estroma fibromuscular foi estudada por outros autores. Esse fato é de extrema importância para o raciocínio que faremos a seguir. Mesmo que já saibamos dessa distribuição das formas isoenzimáticas nos tecidos prostáticos, ainda há muitas dúvidas a cerca do significado da 5 α I no desenvolvimento celular prostático. A função dessa isoenzima nesse processo também ainda está indefinida. Em estudos em que foram avaliadas a expressão da 5 α I em cultura de células de CaP humano DU145, através do método *northern blot* para RNAm para 5 α I e II, verificou-se que a expressão da 5 α I foi significativamente elevada. Já a 5 α II não teve alta expressão nessa cultura. Foi escolhida uma cultura de adenocarcinoma de próstata em células humanas DU145 devido ao alto nível de formação de DHT nesse tipo específico de cultura celular. Esse estudo demonstrou que há uma expressão isolada 5 α I no CaP, ou seja, sem aumento da expressão da 5 α II, sendo que isso está de acordo com outros estudos como veremos adiante. Inibidores específicos da 5 α I poderiam então ser

usados no tratamento da CaP. Além do mais, haveria utilidade desses inibidores em tumores andrôgeno-resistentes, talvez abrindo caminho no tratamento das neoplasias com escape hormonal ou nas indiferenciadas. De fato esses e outros estudos têm demonstrado um papel relevante 5 α I especialmente em clones andrôgeno-independentes. E tudo isso é lógico considerando que a 5 α I está no epitélio (a 5 α II no estroma), e que está aumentada no CaP (origem epitelial), ao contrário da 5 α II que está aumentada na HPB (origem estromal) (9). Segundo Kaefer *et al.* a inibição isolada da 5 α II pode não ser uma modalidade terapêutica ideal para o tratamento e prevenção do CaP, como de fato mais adiante foi mostrado pelo ensaio clínico PCPT. Achados consistentes que a 5 α II não está presente no epitélio prostático acometido por neoplasia, mas sim a 5 α I servem de base para a utilização de inibidores para ambas isoenzimas (9).

Em estudo publicado em 1998 por Negri-Cesi *et al.* (25), os autores avaliaram a resposta de culturas celulares de CaP LNCAP (colônia de células oriundas de neoplasia de próstata de metástases linfonodais) através da detecção dos metabólitos DHT, 3 α -dióis, 3 β -dióis a partir de ¹⁴C-T (testosterona marcada radioativamente com carbono 14), e também avaliaram a presença enzimática por meio de imunohistoquímica com a utilização de anticorpos policlonais apenas para 5 α I, e através de PCR-RT para 5 α I e II. Demonstraram que a 5 α I é expressa tanto nos linfonodos metastáticos de CaP quanto na HPB, ao passo que a 5 α II só é expressa na HPB, não tendo atividade nas células neoplásicas cultivadas de adenocarcinoma prostático acometendo linfonodos. Confirmaram também a baixa resposta da 5 α I à finasterida e a alta sensibilidade da 5 α II a essa droga. Portanto parece que a neoplasia de próstata expressa exclusivamente a 5 α I. Os presentes achados são consistentes aos obtidos com a linhagem de células andrôgeno-independentes DU145, e numa preparação pura de células de epitélio prostático humano. É bom lembrar

que a 5 α I praticamente só ocorre no epitélio, e por esse motivo não havia sido identificada antes em estudos com apenas estroma fibromuscular. Por esse motivo é que nos linfonodos com metástases de CaP não há expressão da 5 α II, mas há da 5 α I, pois apenas células neoplásicas prostáticas (origem epitelial) metastatizam para os linfonodos, sendo que a 5 α I é derivada do epitélio, mas a 5 α II é derivada dos fibroblastos estromais (constatações diferentes do estudo de Habib *et al.*, que não encontraram expressão de nenhuma das duas isoenzimas). Como nas metástases só há epitélio prostático, só há também a 5 α I. HPB expressa mais a 5 α II justamente porque nessa doença predomina o estroma (25, 38).

Também em 1999 os autores Iehlé *et al.* (10) publicaram um trabalho que abordava as diferenças na expressão isoenzimática da 5 α entre os tecidos prostáticos normais e patológicos. Para isso os autores usaram a técnica da RT-PCR para RNAm (Northern blot). Segundo o que foi demonstrado, a expressão da 5 α I na próstata normal é menor que a da 5 α II. Entretanto a atividade de ambas aumenta na HPB quando comparadas com seus pares normais. Mas ainda assim a atividade da 5 α II continua proporcionalmente maior que a 5 α I quando comparadas numa próstata com HPB. No CaP a atividade da 5 α I segue aumentando, tanto quando comparada com a próstata normal quanto com a acometida por HPB. Porém a atividade 5 α II não se modifica em relação a próstata normal e inclusive reduz em relação a HPB (isso talvez explique o expressivo funcionamento da finasterida na HPB mas não no CaP). Quando comparamos a atividade da 5 α I com a da 5 α II no CaP verificamos que essa é a única situação das três apresentadas em que a isoenzima I é mais ativa que a II. As conclusões desse trabalho fortalecem a hipótese de que o bloqueio de ambas poderia ter um papel mais relevante no CaP do que o bloqueio isolado da tipo II. A obtenção dos dados do estudo acima foi através de biópsia de congelação de espécimes prostáticos advindos de cirurgia ou biópsia realizadas para

diagnosticar ou tratar CaP e HPB. Além do exame anátomo-patológico foi realizada a hibridização *in situ* e RT-PCR dos tecidos. A diferença entre a expressão da isoenzima 5α

diferença na atividade enzimática e qual era o padrão de expressão (nuclear ou citoplasmática). Os espécimes foram obtidos por prostatectomia radical para tratamento de CaP (23 pacientes) e por ressecção transuretral de próstata (RTU-P) para tratamento de HPB (10 pacientes), e RTU-P para tratamento paliativo de pacientes com CaP avançado e orquiectomizados (30 pacientes). Foi utilizado um anticorpo policlonal direcionado contra 12 aminoácidos da 5 α II e outro anticorpo policlonal direcionado para a 5 α I. A sensibilidade e especificidade desses anticorpos fora testada previamente com ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assays*). A imunoreatividade núcleo-citoplasmática foi avaliada em microscópio óptico com aumento de 100 vezes. Foi correlacionado o grau histológico (de benigno ao mais indiferenciado) com a imunoreatividade. Os resultados apresentados mostraram que havia uma ampla distribuição de ambas isoenzimas em toda a próstata, tanto no estroma quanto no epitélio, bem como nos compartimentos benignos e malignos de cada próstata analisada. No tecido normal e naquele acometido por HPB, a 5 α I estava predominantemente localizada no núcleo das células secretórias luminais. Já na membrana basal a captação foi menor, distintamente do que ocorrera com a 5 α II, que estava mais presente na membrana basal e cuja atividade citoplasmática fora mais fraca que a nuclear. Em geral a tipo I era mais abundante que a tipo II tanto no estroma quanto no epitélio. Numa mesma região que a utilizada para exame anátomo-patológico (tecido circunjacente) foi observado, sucessivamente em vários espécimes diferentes, que havia diferenças significativas nas expressões isoenzimáticas em tecidos normais, com HPB, com neoplasia intraepitelial de alto grau (PIN III) e com carcinomas. PIN III e CaP apresentaram maior imunoreatividade que o tecido benigno ao redor. Também considerando PIN III e CaP verificou-se que a 5 α I aparecia mais abundantemente no citoplasma, porém permanecia inalterada ou levemente aumentada no núcleo,

especialmente em pacientes cujos tumores mais avançados foram tratados com orquiectomia (ablação hormonal). Portanto CaP tem, segundo esse estudo, maior atividade da 5 α I que o tecido normal numa mesma próstata. Outras conclusões referem-se a localização predominante da 5 α II no citoplasma das células basais, enquanto que a 5 α I é igualmente expressa no núcleo e no citoplasma. A 5 α I é fortemente expressa na matrix nuclear das células secretórias luminais, mas a 5 α II não. Isso pode indicar que o processo de formação da DHT no epitélio prostático acometido por CaP é mediado predominantemente pela 5 α I. Outra discussão gerada pelo estudo em questão é que a distribuição das isoenzimas no CaP leva a crer que os andrógenos continuam envolvidos no controle do crescimento tumoral mesmo nos tumores de alto grau ou mesmo naqueles clinicamente resistentes a ablação androgênica. Até mesmo haveria um aumento da atividade da 5 α na neoplasia comparada ao tecido benigno circunjacente. Esse dado contrasta com a de outros estudos vistos acima. Contudo essas diferenças podem ser devidas à interferência da atividade enzimática estromal nas análises bioquímicas e imunohistoquímicas realizadas. Ademais, a diferença na localização subcelular das formas isoenzimáticas da 5 α para a formação de DHT bem como para vias de desativação tem significado ainda desconhecido. Embora células tumorais com diferenciação endócrina percam receptores nucleares nos casos de CaP primário ou recidivante, as células neoplásicas mantêm a via de produção de DHT pela 5 α mesmo em tumores de alto grau e hormônio-refratários. É importante também considerar que a 5 α II é essencial para o desenvolvimento da glândula prostática, conforme já tem sido extensamente demonstrado na literatura. Negar isso seria negar o efeito já clinicamente demonstrado em estudos de fase III com o uso de inibidores seletivos da 5 α II (finasterida) no tratamento da HPB. A

dúvida que agora ocorre refere-se ao papel de cada uma das duas principais isoenzimas no CaP (11).

Bjelfman *et al.*(18) em estudo utilizando 50 amostras obtidas através de ultrasonografias transretais com biópsia de próstata realizadas em 31 pacientes avaliaram a expressão da enzima 5 α . A maior parte dos fragmentos de próstata biopsiados em cada paciente foram para exame anátomo-patológico (AP) sendo fixados em formalina, mas também foram coletados fragmentos vizinhos à área destinada ao AP que imediatamente foram congelados em nitrogênio líquido (-20°C) e armazenados em *freezer* a -80°C para posterior avaliação da expressão enzimática. A expressão enzimática no tecido congelado, portanto, referia-se ao AP da área circunjacente fixada em formalina (biópsias paralelas para 5 α e AP). A atividade da 5 α foi avaliada através de RT-PCR exclusivamente para 5 α II (não foi avaliada a 5 α I). A expressão da 5 α II foi significativamente menor no CaP que no tecido sem neoplasia, provavelmente pela relativa perda de tecido estromal. Como a 5 α I não foi avaliada, não foi estudada a parte epitelial (mais abundante no CaP) (18).

Thomas *et al.* (39) se valeram de vários métodos para avaliar a 5 α em CaP e HPB. Em uma amostra de 26 casos de HPB (obtidos por RTU-P) e 53 de CaP (obtidos por prostatectomia radical) os autores utilizaram anticorpos policlonais para avaliar imunohistoquimicamente a 5 α I. Da mesma forma, usaram anticorpos policlonais para a 5 α II em outros 29 casos de HPB (também obtidos por RTU-P) e em 37 casos de CaP (prostatectomia radical). Avaliaram a expressão enzimática também através da DHT formada a partir de ¹⁴C-T em homogeneizados prostáticos colocados em placa de cromatografia analisados por auto-radiografia. Nenhum caso de HPB demonstrou alta intensidade para 5 α I epitelial, 15 casos de CaP mostraram alta expressão de 5 α I epitelial, e não houve casos de HPB com atividade estromal para 5 α I, mas houve alguma expressão

epitelial da 5 α I no epitélio. Pode-se dizer que a expressão da 5 α I pode variar de nenhuma até máxima atividade em CaP, mas na HPB a atividade tende a ser mais mediana e relativamente mais constante (sem altas expressões, mas geralmente com pelo menos alguma expressão, ainda que apenas epitelial) (39).

usando finasterida (18,4%), e em 1147 dos 4692 usando placebo (24,4%). Entretanto o escore de Gleason maior ou igual a 7 (de 7 a 10) foi mais comum no grupo finasterida (37%) que no grupo placebo (22,2%). As conclusões foram que a finasterida preveniu a ocorrência de CaP e também melhorou os sintomas de HPB concomitante (ambos estatisticamente significativos), porém o risco de desenvolver CaP de alto grau bem como maior diminuição da libido e maior incidência de outros efeitos sexuais (todos estatisticamente significativos) também foi maior no grupo finasterida (34).

A finasterida induz apoptose nas células produtoras de PSA, reduzindo sua concentração sérica. Contudo isso não influencia na detecção do CaP, pois basta multiplicar por dois o PSA sérico nos usuários de finasterida (31). Estudo de Andriole *et al.* (grupo do PLESS) com 3.040 pacientes mostrou que o PSA está preservado na detecção de CaP nos pacientes tratados com finasterida (40). Oesterling *et al.* demonstrou que em dois ensaios clínicos paralelos, duplo-cegos, em homens apenas com HPB e em homens com HPB e CaP que usaram placebo ou finasterida, a diminuição do PSA com a utilização do inibidor da 5 α R II foi a mesma para os com apenas HPB e para os com CaP associado (redução de 50%). Portanto, mais uma vez, basta dobrar o PSA para manter seu valor na detecção do CaP (41).

Em relação ao estudo clínico dos inibidores não-seletivos da 5 α R, ou seja, que inibem tanto a 5 α R I quanto a 5 α R II, estão em curso ensaios randomizados utilizando a dutasterida, pois é possível que essa droga seja mais útil na quimioprevenção do CaP (12). Neste momento está sendo conduzido um trabalho desse tipo (*Reduce trial*, estudo de fase III). Entretanto em um outro ensaio clínico randomizado, multicêntrico, duplo-cego, placebo-controlado, 46 pacientes com prostatectomia radical agendada para tratar adenocarcinoma de próstata com escore de Gleason menor ou igual a 7 e em estágio T1-T2,

foram designados para receber placebo ou a medicação do estudo. Aleatoriamente esses 46 pacientes foram divididos em dois grupos, sendo que 24 receberam placebo (83% desses foram submetidos de fato à cirurgia previamente programada) e 22 receberam 10 mg de dutasterida (91% desses foram à cirurgia). Após sete dias de uso diário de 10 mg da droga do estudo ou de placebo, os pacientes passaram então a receber apenas 5 mg por cinco a dez semanas até a data da cirurgia. A análise das peças cirúrgicas revelou que a dutasterida alterou a citoarquitetura principalmente no epitélio benigno, e que as alterações involutivas foram maiores na zona periférica da próstata. No entanto todas as peças apresentaram CaP estágio pT2 ou pT3, mas os pacientes tratados com dutasterida apresentaram menor volume tumoral. As conclusões foram que a dutasterida induz substanciais alterações histopatológicas tanto no tecido benigno quanto no maligno. Esse estudo serve de base para estudos de quimioprevenção (42).

**BIBLIOGRAFIA DA FUNDAMENTAÇÃO
TEÓRICA**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Presti JC Jr. Neoplasms of prostate gland. In: Tanagho EM, McAninch JW, editor. *Smith's General Urology*. 15 ed: Lange Medical Books; 2000. p. 399-421.
2. Partin AW, Rodriguez R. The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's Urology*. 8 ed: WB Saunders Company; 2002. p. Sec.6, Chap.37.
3. Wilson JD. The role of 5-alpha-reduction in steroid hormone physiology. *Reprod. Fertil. Dev.* 2001;13:673-678.
4. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5-alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 1994; 63:25-61.
5. McConnell JD, Stoner E. 5-alpha-reductase inhibitors. *Advances In Protein Chemistry*. 2001; 56:143-180.
6. Weisser H, Ziemssen T, Krieg M. In vitro modulation of steroid 5-alpha-reductase activity by phospholipases in epithelium and stroma of human benign prostatic hyperplasia. *Steroids*. 2001;66:521-528.
7. Baxter FO, Trivic S, Lee IR. Structure-function studies of human 5-alpha-reductase type 2 using site directed mutagenesis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2001;77:167-175.
8. Span PN, Bokhoven AV, Smals AGH, Sweep CGJ, Schalken JA. Partial sequencing and tissue distribution of the canine isoforms of steroid 5-alpha-reductase type I and type II. *The Prostate*. 2000;44:233-239.
9. Kaefer M, Audia J, Bruchovsky N, Goode RL, Hsiao KC, Leibovitch IY, Krushinski JH, Lee C, Steide CP, Sutkowski DM, Neubauer BL. Characterization of Type I 5-alpha-reductase activity in DU145 human prostatic adenocarcinoma cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1996;58(2):195-205.
10. Iehlé C, Radvanyi F, Medina SGD, Ouafik L, Gérard H, Chopin D, Raynaud JP, Martin PM. Differences in steroid 5-alpha-reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1999;68:189-195.
11. Bonkhoff H, Stein U, Aumüller G, Remberger K. Differential expression of 5alpha-reductase isoenzymes in the human prostate and prostatic carcinomas. *The Prostate*. 1996;29:261-267.
12. Cilotti A, Danza G, Serio M. Clinical application of 5-alpha-reductase inhibitors. *J. Endocrinol. Invest.* 2001; 24:199-203.
13. Novelli G, Margiotti K, Sangiulo F, Reichardt JKV. Pharmacogenetics of human androgens and prostatic diseases. *Pharmacogenomics*. 2001;2(1):65-72.
14. Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell DW. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5-alpha-reductase. *J. Clin. Invest.* 1992;89:293-300.
15. Steers W. 5-alpha-reductase activity in the prostate. *Urology*. 2001;58(6A):17-24.
16. Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5-alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*. 1991;354:159-161.

17. Jin Y, Penning M. Steroid 5 α -reductases and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenases: key enzymes in androgen metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001;15(1):79-94.
18. Bjelfman C, Söderström TG, Brekkan E, Norlén BJ, Egevad L, Unge T, Andersson S, Rane A. Differential gene expression of steroid 5- α -reductase 2 in core needle biopsies from malignant and benign prostatic tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;82(7):2210-2214.
19. Liang T, Cascieri MA, Cheung AH, Reynolds GF, Rasmusson GH. Species differences in prostatic steroid 5 α -reductases of rat, dog, and human. *Endocrinology*. 1985;117(2):571-579.
20. Tsukamoto S, Akaza H, Imada S, Koiso K, Shirai T, Ideyama Y, Kudo M. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by use of finasteride or casodex. *Journal of the National Cancer Institute* 1995;87(11):842-843.
21. Pratis K, O'Donnell L, Ooi GT, McLachlan RI, Robertson DM. Enzyme assay for 5 α -reductase type 2 activity in the presence of 5 α -reductase type 1 activity in rat testis. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2000;75:75-82.
22. Poletti A, Celotti F, Motta M, Martini L. Characterization of rat 5- α -reductase type 1 and type 2 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J*. 1996;314:1047-1052.
23. Normington K, Russell DW. Tissue distribution and kinetic characteristics of rat steroid 5- α -reductase isozymes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(27):19548-19554.
24. Wu AH, Whittemore AS, Kolonel LN, Stanczyk FZ, John EM, Gallagher RP, West DW. Lifestyle determinants of 5- α -reductase metabolites in older african-american, white and asian-american men. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2001;10:533-538.
25. Negri-Cesi P, Poletti A, Colciago A, Magni P, Martini P, Motta M. Presence of 5- α -reductase isozymes and aromatase in human prostate cancer cells and in benign prostate hyperplastic tissue. *The Prostate*. 1998;34:283-291.
26. Nam RK, Toi A, Vesprini M, Ho M, Chu W, Harvie S, Sweet J, Trachtenberg J, Jewett MAS, Narod AS. V89L polymorphism of type-2, 5 α -reductase enzyme gene predicts prostate cancer presence and progression. *Urology* 2001;57(1):199-205.
27. Pearce CL, Makridakis NM, Ross RK, Pike MC, Kolomnel LN, Henderson BE, Reichardt JK. Steroid 5- α -reductase type II V89L substitution is not associated with risk of prostate cancer in a multiethnic population study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2002;11:417-418.
28. Yamada Y, Watanabe M, Murata M, Yamanaka M, Kubota Y, Ito H, Katoh T, Kawamura J, Yatani R, Shiraishi T. Impact of genetic polymorphisms of 17-hydroxylase cytochrome p-450 (CYP17) and steroid 5 α -reductase type II (SRD5A2) genes on prostate-cancer risk among the japanese population. *Int. J. Cancer*. 2001;92:683-686.
29. Costa EMF, Arnhold IJP, Inacio M, Mendonça BB. Normal bone density in male pseudohermaphroditism due to 5- α -reductase 2 deficiency. *Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*. 2001;56(5):139-142.
30. Roehrborn CG, McConnell JD. Etiology, pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's Urology*. 8 ed: WB Saunders Company; 2002. p. Sec.6, Chap. 38.

31. Kaplan SA. 5-alpha-reductase inhibitors: what role should they play? *Urology*. 2001;58(6A):65-70.
32. Reiter RE, deKernion JB. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's Urology*. 8 ed: WB Saunders Company; 2002. p. Sec.11, Chap.85.
33. Gormley GL, Stoner E, Bruskewitz RC, Imperato-McGinley J, Walsh PC, McConnell JD, Andriole GL, Geller J, Bracken BR, Tenover JS, Vaughan ED, Pappas F, Taylor A, Binkowitz B, Ng J. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology*. 2002;167:1102-1107.
34. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes RD, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman CA Jr. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003;349(3):215-224.
35. Thompson IM, Pauler D K, Goodman P J, Tangen C M, Lucia M. S, Parnes H L, Minasian L M, Ford L G, Lippman S M, Crawford E D, Crowley J J, Coltman C A Jr. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level 4.0 ng per Milliliter. *The New England Journal of Medicine* 2004;350(22):2239-2246.
36. Dini LI, Koff W J. Perfil do câncer de próstata em um programa de rastreamento na cidade de Porto Alegre [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.
37. Epstein JI. Pathology of prostatic neoplasia. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's Urology*. 8 ed: WB Saunders Company; 2002. p. Sec.11, Chap. 86.
38. Habib FK, Ross M, Bayne CW. Factors controlling the expression of 5a-reductase in human prostate: A possible new approach for the treatment of prostate cancer. *European Urology*. 1999;35:439-442.
39. Thomas LN, Douglas RC, Vessey JP, Gupta R, Fontaine D, Norman RW, Thompson IM, Troyer DA, Rittmaster RS, Lazier CB. 5-alpha-reductase type 1 immunostaining is enhanced in some prostate cancers compared with benign prostatic hyperplasia epithelium. *The Journal of Urology*. 2003;170:2019-2025.
40. Andriole GL, Guess HA, Epstein JI, Wise H, Kadmon D, Crawford ED, Hudson P, Jacson CL, Romas NA, Patterson L, Cook TJ, Waldstreicher J. Treatment with finasteride preserves usefulness of prostate specific antigen in the detection of prostate cancer: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Urology* 1998;52(2):195-202.
41. Oesterling JE, Roy J, Agha A, Shown T, Krarup T, Johansen T, Lagerkvist M, Gormley G, Bach M, Waldstreicher J, Finasteride PSA Study Group. Biologic variability of prostate specif antigen and its usefulness as a marker for prostate cancer: effects of finasteride. *Urology* 1998;51((Suppl 4A)):58-63.
42. Iczkowski KA, Qiu J, Qian J, Somerville MC, Rittmaster RS, Andriole GL, Bostwick DG. The dual 5-alpha-reductase inhibitor dutasteride induces atrophic changes and decreases relative cancer volume in human prostate. *Urology*. 2005;65(1):77-82.

OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

OBJETIVO

Desenvolver uma técnica para avaliação da expressão das isoenzimas 5α I e II em tecido prostático humano.

JUSTIFICATIVA

Permitir o desenvolvimento de uma linha de pesquisa sobre o papel das isoenzimas 5α I e II em tecido prostático.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

ADAPTAÇÃO DE UMA TÉCNICA PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ISOENZIMAS 5-ALFA-REDUTASE I E II EM TECIDO PROSTÁTICO

EMANUEL BURCK DOS SANTOS, WALTER JOSÉ KOFF, OSMAR LUIZ
MAGALHÃES DE OLIVEIRA, FRANCINE MURARO, RODRIGO WEY RODRIGUES,
VERA MARIA TREIS TRINDADE

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

Objetivos: adaptar um método para avaliação da expressão das isoenzimas 5-alfa-redutase tipo I e tipo II, em tecido prostático humano para utilização em estudos que correlacionem a expressão enzimática com câncer de próstata.

Material e Métodos: nós adaptamos um método, de acordo com Thomas et al. (1), e conforme estudo piloto desenvolvido por Oliveira (2). Para isso coletamos amostras através de biópsia de próstata. De uma mesma região da próstata foram coletadas duas amostras, sendo que uma foi enviada para exame anátomo-patológico e a outra para avaliação da atividade da 5-alfa-redutase. A atividade da enzima foi medida após a separação da mesma em placa de cromatografia onde havia ocorrido a migração de DHT. Essa fora formada a partir de ¹⁴C-testosterona com a participação do co-fator NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). A emissão de radiação foi detectada por auto-radiografia e as áreas identificadas como testosterona e DHT foram raspadas e contadas em líquido de cintilação.

Resultados: conseguimos demonstrar a expressão de ambas isoenzimas no tecido prostático.

Conclusões: Sugerimos aqui a adaptação e implementação de um método bioquímico para avaliação da expressão das isoenzimas 5 α -redutase tipo I e II em tecido prostático humano.

Palavras Chaves: próstata; neoplasia prostática; andrógenos; 5 α -redutase

INTRODUÇÃO

A relação entre os andrógenos e o câncer de próstata não está completamente definida. A Diidrotestosterona (DHT) é o andrógeno mais potente na próstata. A DHT é o resultado de uma reação irreversível que ocorre no citoplasma da célula prostática, onde a testosterona (T) é metabolizada pela ação catalisadora da enzima 5-alfa-redutase (5 α r) com a presença do co-fator NADPH. Tanto a T quanto a DHT atuam sobre o mesmo receptor androgênico (AR), sendo que a DHT tem maior afinidade pelo AR. A interação entre esse hormônio e o receptor nuclear desencadeia o processo de transcrição que é traduzido em proteínas que atuam nas células-alvo (3-5). A importância da DHT e o papel da 5 α r foi bem estudado no pseudohermafroditismo masculino por deficiência dessa enzima. Na verdade, existem duas formas isoenzimáticas da 5 α r: a tipo I (5 α r I), presente na pele, no fígado, e no epitélio prostático, e a tipo II (5 α r II), presente abundantemente no estroma e, em menor quantidade, no epitélio prostático (6-8). No pseudohermafroditismo masculino ocorre uma mutação apenas no gene responsável pela produção da 5 α r II (gene SRDA52) presente no braço curto do cromossomo 2 (banda p23). Essa deficiência leva a chamada hipospádia perineoescrotal pseudovaginal. Nessa síndrome genética ocorre desenvolvimento dos órgãos masculinos internos, sem que, entretanto, ocorra desenvolvimento da próstata ou dos genitais externos com fenótipo masculino. Ademais esses paciente não desenvolvem hiperplasia prostática benigna (HPB), câncer de próstata (CaP) ou alopecia androgênica (6, 9, 10). Baseado nisso e também em estudos em que a administração de DHT em cães provocava HPB, foram realizados ensaios clínicos randomizados em que um inibidor seletivo para a 5 α r II (finasterida) reduziu o tamanho da próstata em aproximadamente 25%, além de ter alterado a história natural da HPB em próstatas volumosas, melhorando

escore de sintomas, fluxo urinário, e diminuindo as chances de retenção urinária aguda e de tratamento cirúrgico para HPB (11, 12). Devido ao sucesso com o uso dessa medicação nessa patologia, aventou-se a possibilidade de utilizar a finasterida com intuito de prevenir CaP. Para tanto foi desenhado e conduzido o *Prostate Cancer Prevention Trial* (PCPT) (13). A finasterida nesse estudo pareceu prevenir a ocorrência de CaP, todavia aumentou a chance de CaP de alto grau. Aventa-se a hipótese de talvez a 5 α I necessite ser também bloqueada para que de fato a estratégia de quimioprevenção do CaP seja bem sucedida. Em estudos pré-clínicos, foi demonstrado por métodos imunohistoquímicos que é a expressão da 5 α I que está aumentada no CaP, e não a da 5 α II. Na verdade a isoenzima II teria uma expressão até menor que na próstata normal, já que o componente estromal estaria mais preservado. Já na HPB a 5 α II teria a expressão aumentada, explicando porque os bloqueadores dessa isoenzima tem uma ação tão marcada (14). Como a 5 α I predomina no epitélio alterado pelo adenocarcinoma de próstata, mas a 5 α II está aumentada apenas no estroma, foi demonstrado em alguns estudos que apenas a 5 α I é expressa em metástases linfonodais de CaP (1, 8, 14-18). Todavia há um trabalho que demonstra através de RT-PCR para o DNA dos genes que codificam as enzimas 5 α I e II (análise tipo *Southern blot*) que há expressão dos genes de ambas isoenzimas em metástases de câncer de próstata (19).

No Hospital de Clínicas de Porto Alegre e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul adaptamos um método de avaliação da expressão da enzima 5 α I e II em tecido prostático obtido por biópsia transretal de próstata.

MATERIAL & MÉTODOS

Pacientes e amostras:

Pacientes submetidos à ultra-sonografia transretal com biópsia de próstata devido a suspeita de neoplasia maligna de próstata (nódulos duros ao toque retal, ou PSA elevado) tiveram suas próstatas analisadas por exame anátomo-patológico e para a atividade das enzimas 5 α I e II, conforme demonstrado por Thomas et al. (1). O estudo foi aprovado pelo Grupo de Pesquisa e Graduação e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras fixadas em formalina foram encaminhadas para exame anátomo-patológico (AP), e uma pequena amostra foi congelada

imediatamente em nitrogênio líquido a -20°C e armazenada em *freezer* a -80°C para posterior avaliação da atividade da 5α .

Ensaio da 5α

O tecido prostático congelado foi descongelado e homogeneizado em homogeneizador Polytron PT 1200 CL (fabricado por Kinematica). No homogeneizado de tecido prostático nós adicionaríamos um tampão Tris-Citrato 0,3M para pH 5,0 (5α II) e para pH 7,0 (5α I). Testosterona marcada (^{14}C -T) $1,4\ \mu\text{M}$ ($2,1\ \text{GBq}/\text{mmol}$, Amersham Biosciences) seria adicionada com 0,5mM de co-fator NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, Sigma), com um volume final de 500 μl . A ^{14}C -T adicionada à solução reagiria com a $5\ \alpha$ -redutase do homogeneizado de tecido prostático, formando então diidrotestosterona marcada (^{14}C -DHT). A solução seria incubada a 37°C por 0, 20, 30 e 60 minutos para que essa reação ocorresse na temperatura equivalente a intracorpórea. Após, a reação seria interrompida pela adição de acetato de etila gelado. A solução seria agitada por 5 minutos (para misturar) e logo após seria centrifugada por igual período (para separar o acetato de etila com os esteróides do resíduo aquoso, sendo que os resíduos esteróides, lipofílicos) ficariam sobre a água. Nessa solução já haveria, portanto, ^{14}C -DHT formada a partir da ^{14}C -T pela ação da enzima $5\ \alpha$ -redutase. O pH controlado pela adição

seria calculada e expressa em picomoles de diidrotestosterona formada por 1 mg de proteína durante 1 minuto (pmol DHT/mg protein/min) (17, 20-25)

RESULTADOS

As amostras de próstata obtidas e processadas através do método em questão revelaram a expressão de bandas correspondentes à testosterona, à DHT e aos dióis e trióis. Através de padrão de DHT verificamos a posição da mesma na auto-radiografia (figura 1) e então fizemos a contagem em câmara de cintilação através de raspagem das respectivas bandas na placa de cromatografia. As contagens obtidas no estudo piloto (figura 1) são de 0,03 e 0,065 picomoles DHT/mg de proteína/min para pH 5 e pH 7, respectivamente.

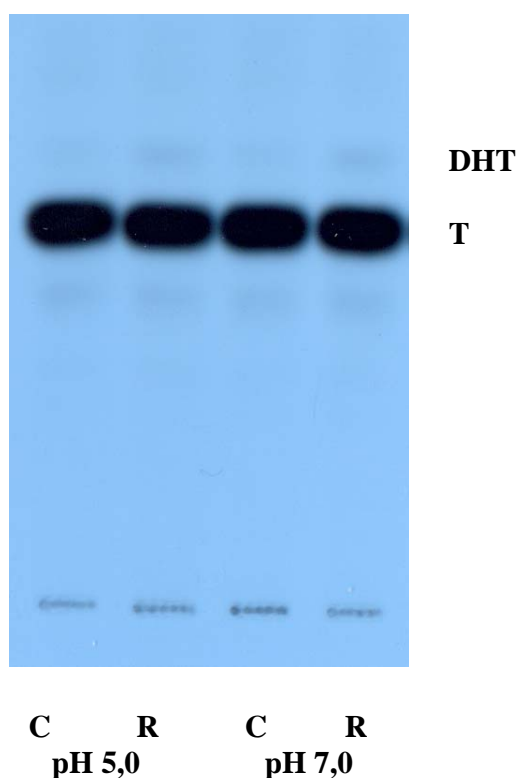


Figura 1. Auto-radiografia da placa de cromatografia em que a análise dos extratos lipídicos do sistema enzimático 5 α -R2 foi realizada (**R**) em pH 5,0 e em pH 7,0 com 100 μ g of proteína (biópsia prostática), incubada por 60 minutos, na presença de NADPH. Controles incubados sem NADPH (**C**).

DISCUSSÃO

A avaliação das isoenzimas 5 α I e II poderia ter sido realizada através de diferentes métodos. A escolha de um levou em consideração a factibilidade do mesmo, bem como o

prostática benigna. Futuramente poderemos avaliar também a expressão enzimática na presença de bloqueio androgênico central ou periférico. Ademais pretendemos

REFERÊNCIAS

1. Thomas LN, Douglas RC, Vessey JP, Gupta R, Fontaine D, Norman RW, Thompson IM, Troyer DA, Rittmaster RS, Lazier CB. 5-alpha-reductase type 1 immunostaining is enhanced in some prostate cancers compared with benign prostatic hyperplasia epithelium. *The Journal of Urology*. 2003;170:2019-2025.
2. Oliveira OLM. Activity assessment of 5-alpha-reductase em prostate tissue [PhD Thesis]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
3. Partin AW, Rodriguez R. The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's Urology*. 8 ed: WB Saunders Company; 2002. p. Sec.6, Chap.37.
4. Wilson JD. The role of 5-alpha-reduction in steroid hormone physiology. *Reprod. Fertil. Dev.* 2001;13:673-678.
5. Steers W. 5-alpha-reductase activity in the prostate. *Urology*. 2001;58(6A):17-24.
6. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5-alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 1994; 63:25-61.
7. Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell DW. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5-alpha-reductase. *J. Clin. Invest.* 1992;89:293-300.
8. Iehlé C, Radvanyi F, Medina SGD, Ouafik L, Gérard H, Chopin D, Raynaud JP, Martin PM. Differences in steroid 5-alpha-reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1999;68:189-195.
9. Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5-alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*. 1991;354:159-161.
10. McConnell JD, Stoner E. 5-alpha-reductase inhibitors. *Advances In Protein Chemistry*. 2001; 56:143-180.
11. Gormley GL, Stoner E, Bruskevitz RC, Imperato-McGinley J, Walsh PC, McConnell JD, Andriole GL, Geller J, Bracken BR, Tenover JS, Vaughan ED, Pappas F, Taylor A, Binkowitz B, Ng J. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology*. 2002;167:1102-1107.
12. Kaplan SA. 5-alpha-reductase inhibitors: what role should they play? *Urology*. 2001;58(6A):65-70.
13. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes RD, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman CA Jr. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003;349(3):215-224.
14. Kaefer M, Audia J, Bruchovsky N, Goode RL, Hsiao KC, Leibovitch IY, Krushinski JH, Lee C, Steide CP, Sutkowski DM, Neubauer BL. Characterization of Type I 5-alpha-reductase activity in DU145 human prostatic adenocarcinoma cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1996;58(2):195-205.
15. Habib FK, Ross M, Bayne CW. Factors controlling the expression of 5-alpha-reductase in human prostate: A possible new approach for the treatment of prostate cancer. *European Urology*. 1999;35:439-442.

16. Bonkhoff H, Stein U, Aumüller G, Remberger K. Differential expression of 5 α -reductase isoenzymes in the human prostate and prostatic carcinomas. *The Prostate*. 1996;29:261-267.
17. Negri-Cesi P, Poletti A, Colciago A, Magni P, Martini P, Motta M. Presence of 5-alpha-reductase isozymes and aromatase in human prostate cancer cells and in benign prostate hyperplastic tissue. *The Prostate*. 1998;34:283-291.
18. Bjelfman C, Söderström TG, Brekkan E, Norlén BJ, Egevad L, Unge T, Andersson S, Rane A. Differential gene expression of steroid 5-alpha-reductase 2 in core needle biopsies from malignant and benign prostatic tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;82(7):2210-2214.
19. Zhu YS, Cai LQ, You X, Cordero JJ, Huang Y, Imperato-McGinley J. Androgen-induced prostate-specific antigen gene expression is mediated via dihydrotestosterone in LNCaP cells. *Journal of Andrology* 2003 Sep-Oct;24(5):681-687.
20. Furuta S, Fukuda Y, Sugimoto T, Miyahara H, Kamada E, Sano H, Takei M, Kurimoto T. Pharmacodynamic analysis of steroid 5-alpha-reductase inhibitory actions of Z-350 in rat prostate. *European Journal of Pharmacology* 2001;426:105-111.
21. Pratis K, O'Donnell L, Ooi GT, McLachlan RI, Robertson DM. Enzyme assay for 5 α -reductase type 2 activity in the presence of 5 α -reductase type 1 activity in rat testis. *Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2000;75:75-82.
22. Hirosumi J, Nakayama O, Fagan T, Sawada K, Chida N, Inami M, Takahashi S, Kojo H, Notsu Y, Okuhara M. FK143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5-alpha-reductase: (1) in vitro effects on human and animal prostatic enzymes. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 1995;4:357-363.
23. Grisenti P, Magni A, Olgiati V, Manzocchi A, Ferraboschi P, Villani V, Pucciariello R, Celotti F. Substrate interaction with 5-alpha-reductase enzyme: influence of the 17 β -chain chirality in the mechanism of action of 4-azasteroid inhibitors. *Steroids*. 2001;66:803-810.
24. Weisser H, Ziemssen T, Krieg M. In vitro modulation of steroid 5-alpha-reductase

ARTIGO EM INGLÊS

**ADAPTATION OF AN EVALUATION METHOD OF TYPES ONE
AND TWO 5-ALPHA-REDUCTASE ENZYME ACTIVITIES IN
PROSTATE TISSUE**

EMANUEL BURCK DOS SANTOS, WALTER JOSÉ KOFF, OSMAR LUIZ
MAGALHÃES DE OLIVEIRA, FRANCINE MURARO, RODRIGO WEY RODRIGUES,
VERA MARIA TREIS TRINDADE

*Programa de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas
de Porto Alegre, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul*

ABSTRACT

Objectives: we are proposing the adaptation of a method for the assessment of the activity of types 1 and 2 5-alpha-reductases isoenzymes in human prostate tissue to be used in studies of the relationship of enzymatic activity and cancer.

Material and Methods: we have been developing a method, based on Thomas et al. (1) , which consists on collect human prostate samples and performer 5-alpha-reductase activity assessment. We are proposing a method where we would use samples obtained by prostate biopsies, according to a pilot study developed by Oliveira et al. (2). We have collected two samples of the same region of prostate, and our idea is sending one of these samples for pathological examination and another for 5-alpha-reductase evaluation. We will do that through a thin layer chromatography with ¹⁴C-testosterone and NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) cofactor. Radioactive spots were detected by

autoradiography and the areas associated with testosterone and its metabolite DHT (dihydrotestosterone) were scrapped and counted with a scintillation chamber.

Results: we think that it is possible to demonstrate the activity of 5-alpha-reductase through the adaptation of this biochemistry method.

Conclusions: this method is feasible and can be utilized to assess types 1 and 2 5-alpha-reductase activity in prostate tissue samples.

Key Words: prostate; prostate neoplasms; androgens; 5 α -reductase

INTRODUCTION

The relation between the androgens and the cancer of prostate is not completely established. The dihydrotestosterone (DHT) is the most powerful androgen in the prostate. The DHT is the result of an irreversible reaction that occurs in the cytoplasm of the prostate cell, where the testosterone (T) is metabolized by the catalytic action of the enzyme 5-alpha-reductase with the presence of cofactor NADPH. T and DHT act on the same androgenic receptor (AR), being that DHT has greater affinity for AR. The interaction of this hormone with the nuclear receptor triggers the transcription process that is translated to proteins that act in the cell-target (3-5). The importance of the DHT and the paper of 5-alpha-reductase were studied in the masculine pseudohermaphroditism for deficiency of this enzyme. Actually, two isoenzymatic forms of 5-alpha-reductase exist: type 1, present in the skin, in the liver, and in the prostate epithelium, and type 2, present abundantly in stroma and, in a smaller amount, in the prostate epithelium (6-8). In the masculine pseudohermaphroditism there is a mutation only in the responsible gene for the production of 5-alpha-reductase 2 (gene SRDA52) present in the short arm of chromosome 2 (band p23). This deficiency is called pseudovaginal perineoescrotal hipospadia. In this genetic syndrome, the development of the internal male structures occurs, however without the development of the prostate or genital external with male phenotype. In addition, this patient does not develop benign prostate hyperplasia (BPH), prostate cancer or androgenic alopecia (6, 9, 10). Based on this and also on studies where the administration of DHT in dogs provoked BPH, randomized clinical trials had been performed, where a selective inhibitor to 5-alpha-reductase 2 (finasteride) reduced the size of the prostate in approximately 25%. Besides that, finasteride, according to these trials, has modified the natural history of the BPH in voluminous prostates, improving International Prostatic Score Symptoms, urinary flow, and diminishing

the possibilities of acute urinary retention and surgical treatment for BPH (11, 12). Due to the success of the use of this medication in this pathology, the possibility of using finasteride to prevent prostate cancer was considered. To solve this question the Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT) was designed and performed (13). Although finasteride has prevented the occurrence of prostate cancer in this study, the group that received the treatment with this drug has increased the possibility of prostate cancer of high grade. Hypothetically, perhaps 5-alpha-reductase type 1 also needs to be blocked to improve the chemoprevention strategy in prostate cancer. In preclinical studies it was demonstrated by immunohistochemical methods that it is the expression of 5-alpha-reductase type 1 that is increased in prostate cancer, and not the one of 5-alpha-reductase type 2. Actually, the isoenzyme type 2 could have minor expression than in the normal prostate, since the stromal component would be less preserved in cancer. In the BPH the 5-alpha-reductase type 2 would have the increased expression, explaining why the inhibitors of this isoenzyme (finasteride) has such a remarkable action in this disease (14). As 5-alpha-reductase type 1 predominates in the epithelium modified by the adenocarcinome of prostate, but 5-alpha-reductase type 2 is increased only in strome, some studies have demonstrated that only 5-alpha-reductase type 1 is expressed in lymphatic node metastasis of prostate cancer (1, 8, 14-18). However there is a study that demonstrates, through DNA amplification, using the Reversal Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and detected by probes (Southern blot), that there is an expression of the genes of both isoenzymes in metastasis of prostate cancer (19). In the Clínicas Hospital of Porto Alegre and in the Federal University of Rio Grande do Sul we adapted an evaluation method of the 5-alpha-reductase types 1 and 2 isoenzymes in human prostate tissue. In the present study we are showing the

development of an assessment method for evaluation of both isoenzymes in prostate tissue obtained from transrectal prostate biopsies.

MATERIAL & METHODS

Patient and samples:

Patients submitted to transrectal ultra-sound prostate biopsies due to suspicious of malignancy (hard nodules on digital rectal examination, or PSA alterations) had their prostates analyzed by pathological examination. We have collected samples to perform an adaptation of a method similar to the method demonstrated by Thomas et al. (1) to evaluate types 1 and 2 5-alpha-reductase activities. Nevertheless, in our study, we have been using human prostate obtained from biopsies. The study was approved by the Committee of Ethics in Research of the Clínicas Hospital of Porto Alegre. Samples had been put in formaline before pathological examination, but one sample had been immediately frozen in liquid nitrogen at -20°C and stored in freezer at -80°C for late evaluation of the 5-alpha-reductase activities.

5-alpha-reductase Assay

The frozen prostate tissue would be defrosted and homogenized with Polytron PT 1200 CL (manufactured for Kinematica). In the prostate homogenized tissue we could add 0.3M Tris-Citrate for pH 5.0 (to 5-alpha-reductase type 2) and for pH 7.0 (to 5-alpha-reductase type 1). Radioactive testosterone (¹⁴C-T) 1.4 μM (2.1 GBq /mmol, Amersham Biosciences) would be added and then we would add 0.5mM NADPH (nicotinamide dinucleotide adenine phosphate) (Sigma), cofactor, with a final volume of 500μl. The ¹⁴C-T

added to the solution should react with the 5-alpha-reductase of the homogenized tissue, forming radioactive dihydrotestosterone (^{14}C -DHT). The solution would be incubating (37°C) for zero, twenty, third, and sixty minutes so that this reaction would occur in intracorporeal equivalent temperature. After that, the reaction would be interrupted by the addition of frozen ethyl acetate. The solution would be agitated for 5 minutes and, soon after, would be centrifuged by an equal period (to separate ethyl acetate with the steroids from the watery residue). In this solution ^{14}C -DHT would be formed from the ^{14}C -T by the action of 5-alpha-reductase. The pH should be controlled by the addition of Tris-Citrate to differentiate the action of isoenzymes type 1 and 2. The organic phase will be separated and evaporated under nitrogen (ethyl acetate has high volatileness), and the residues would be dissolved in ethyl acetate again (but in a small amount, only enough to transfer them from the assay to the chromatography plate). After the application in the chromatography plate (Kieselgel 60 F254, Merck), these residues will be migrated in ethyl acetate: benzene (2:1), separating ^{14}C -DHT from the ^{14}C -T. The radioactive points would be detected by autoradiography, and the areas corresponding to testosterone and its metabolite, ^{14}C -DHT, would be scraped and put inside of vials with POP-POPOP. We can tell that it is ^{14}C -DHT because we also have a standard DHT that formed a band in the same position of the ^{14}C -DHT obtained from the ^{14}C -T by Oliveira (2). The radioactive vials with material should be evaluated in a scintillation liquid counter, and enzymatic activity expressed as picomoles of dihydrotestosterone formed by 1 mg of protein during 1 minute (pmol DHT/mg protein/min)(17, 20-25).

RESULTS

The processed samples of prostate through the method in question should reveal the presence of testosterone, DHT, diols and triols corresponding bands. Through DHT standard we could verify the position of the same one in the autoradiography (**Figure 1**) and then we would make the counting in a scintillation chamber through the scraping of the respective bands from the chromatography plate. The activities obtained from Figure 1 are 0.03 and 0.065 picomoles DHT/mg protein/min for pH 5 and pH 7, respectively.

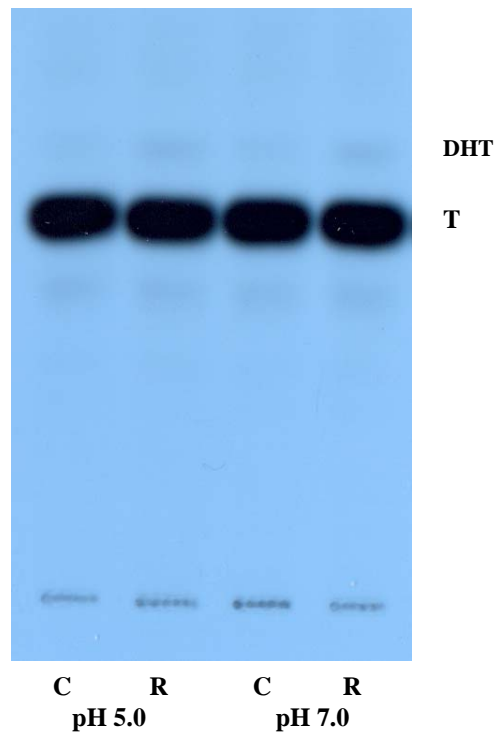


Figure 1. Autoradiography of the thin layer chromatography analysis of radioactive lipid extracts from enzymatic system of 5α -R2 performed (**R**) at pH 5.0 and pH 7.0 with 100 μ g of biopsy protein, incubated during 60 minutes, in presence of NADPH. Control reaction incubated without NADPH (**C**).

DISCUSSION

The evaluation of both 5-alpha-reductases could have been carried out through different methods. The choice of a certain method would take into consideration the feasibility, as well as the cost and the usefulness in future research. Some methods would require the importation of antibodies or DNA or RNA probes. As the proposal was to evaluate the action of the prostate enzyme, we chose a biochemical method which evaluates the activity of the enzyme through the DHT formation. We differentiated isoenzymes 1 and 2 through the pH values of the homogenate solutions. Thomas *et al.* (1) had validated a new antibody to 5-alpha-reductase. For this validation the related researchers compared the immunohistochemical findings to the expression of the enzyme by the formation of ^{14}C -DHT from ^{14}C -T. The DHT migration in the chromatography plate was very similar to ours (1).

The adaptation of a method for the 5-alpha-reductase activity evaluation opens the possibility of innumerable studies related to the hormonal mechanisms of the prostate neoplasm. It could also be used in studies with 5-alpha-reductase inhibitors, prognostic studies, just to name a few examples.

The method in question is relatively cheap, and the importation of antibodies or probes of nucleic acids has not been necessary, but only the necessity of acquisition of radioactive testosterone, as well as of the NADPH cofactor. But the incorporated technology, as the homogenizator and the standard of DHT, can permanently be used in coming studies. In this study we do not show the pathological examination data, because we are preparing, and the objective of this work do not involve the pathological examination.

From the present study we pass then to lead another one where we are evaluating the enzymatic activity of 5-alpha-reductase in radical prostatectomy samples of patients with

prostate cancer. Simultaneously we are carrying out another comparative study between biopsies obtained by transretal ultrasound in patients with and without diagnosis of prostate cancer. Now we are going to evaluate the activities of the two isoenzymes in prostate cancer and in benign prostate hyperplasia. In a near future we also will be able to evaluate the enzymatic expression in androgenic blockade patients. Moreover we intend to correlate this with the tumor virulence and grade, and with PSA. DHT was the main inductor of the PSA increasing according to a study that evaluated isoenzymes type 1 and 2 in lymph nodes with prostate cancer metastasis, where the used methods were PCR and Southern blot (19). However, I did not find in literature any study of correlation between PSA and the activity of the enzyme 5-alpha-reductase using a method similar to ours. Therefore we are checking the possibility of studying these aspects from what we have developed so far. We are also planning to evaluate the activity of the enzyme in lymph nodes metastasis using the method developed by us. Later on, we will also be able to compare our findings to others obtained by immunohistochemistry, and see if they are equivalents, like Thomas et al. did (1). At the moment we did not make the comparison mentioned above due to financial limitations.

We believe that these studies are only the beginning of a new and promissory research line that we are developing from the present work.

CONCLUSIONS

We suggest an adaptation of a biochemist method for evaluation of the 5-alpha-reductase types 1 and 2 activities in human prostate tissue samples.

SPONSORING

Study sponsored by Fundo de Incentivo a Pesquisa e a Eventos (FIPE) and Fundação Médica do Rio Grande do Sul.

REFERENCES

1. Thomas LN, Douglas RC, Vessey JP, Gupta R, Fontaine D, Norman RW, Thompson IM, Troyer DA, Rittmaster RS, Lazier CB. 5-alpha-reductase type 1 immunostaining is enhanced in some prostate cancers compared with benign prostatic hyperplasia epithelium. *The Journal of Urology*. 2003;170:2019-2025.
2. Oliveira OLM. Activity assessment of 5-alpha-reductase em prostate tissue [PhD Thesis]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
3. Partin AW, Rodriguez R. The molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's Urology*. 8 ed: WB Saunders Company; 2002. p. Sec.6, Chap.37.
4. Wilson JD. The role of 5-alpha-reduction in steroid hormone physiology. *Reprod. Fertil. Dev.* 2001;13:673-678.
5. Steers W. 5-alpha-reductase activity in the prostate. *Urology*. 2001;58(6A):17-24.
6. Russell DW, Wilson JD. Steroid 5-alpha-reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 1994; 63:25-61.
7. Jenkins EP, Andersson S, Imperato-McGinley J, Wilson JD, Russell DW. Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5-alpha-reductase. *J. Clin. Invest.* 1992;89:293-300.
8. Iehlé C, Radvanyi F, Medina SGD, Ouafik L, Gérard H, Chopin D, Raynaud JP, Martin PM. Differences in steroid 5-alpha-reductase iso-enzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1999;68:189-195.
9. Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW. Deletion of steroid 5-alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature*. 1991;354:159-161.
10. McConnell JD, Stoner E. 5-alpha-reductase inhibitors. *Advances In Protein Chemistry*. 2001; 56:143-180.
11. Gormley GL, Stoner E, Bruskewitz RC, Imperato-McGinley J, Walsh PC, McConnell JD, Andriole GL, Geller J, Bracken BR, Tenover JS, Vaughan ED, Pappas F, Taylor A, Binkowitz B, Ng J. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology*. 2002;167:1102-1107.
12. Kaplan SA. 5-alpha-reductase inhibitors: what role should they play? *Urology*. 2001;58(6A):65-70.
13. Thompson IM, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Miller GJ, Ford LG, Lieber MM, Cespedes RD, Atkins JN, Lippman SM, Carlin SM, Ryan A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman CA Jr. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *The New England Journal of Medicine* 2003;349(3):215-224.
14. Kaefer M, Audia J, Bruchovsky N, Goode RL, Hsiao KC, Leibovitch IY, Krushinski JH, Lee C, Steide CP, Sutkowski DM, Neubauer BL. Characterization of Type I

ANEXOS

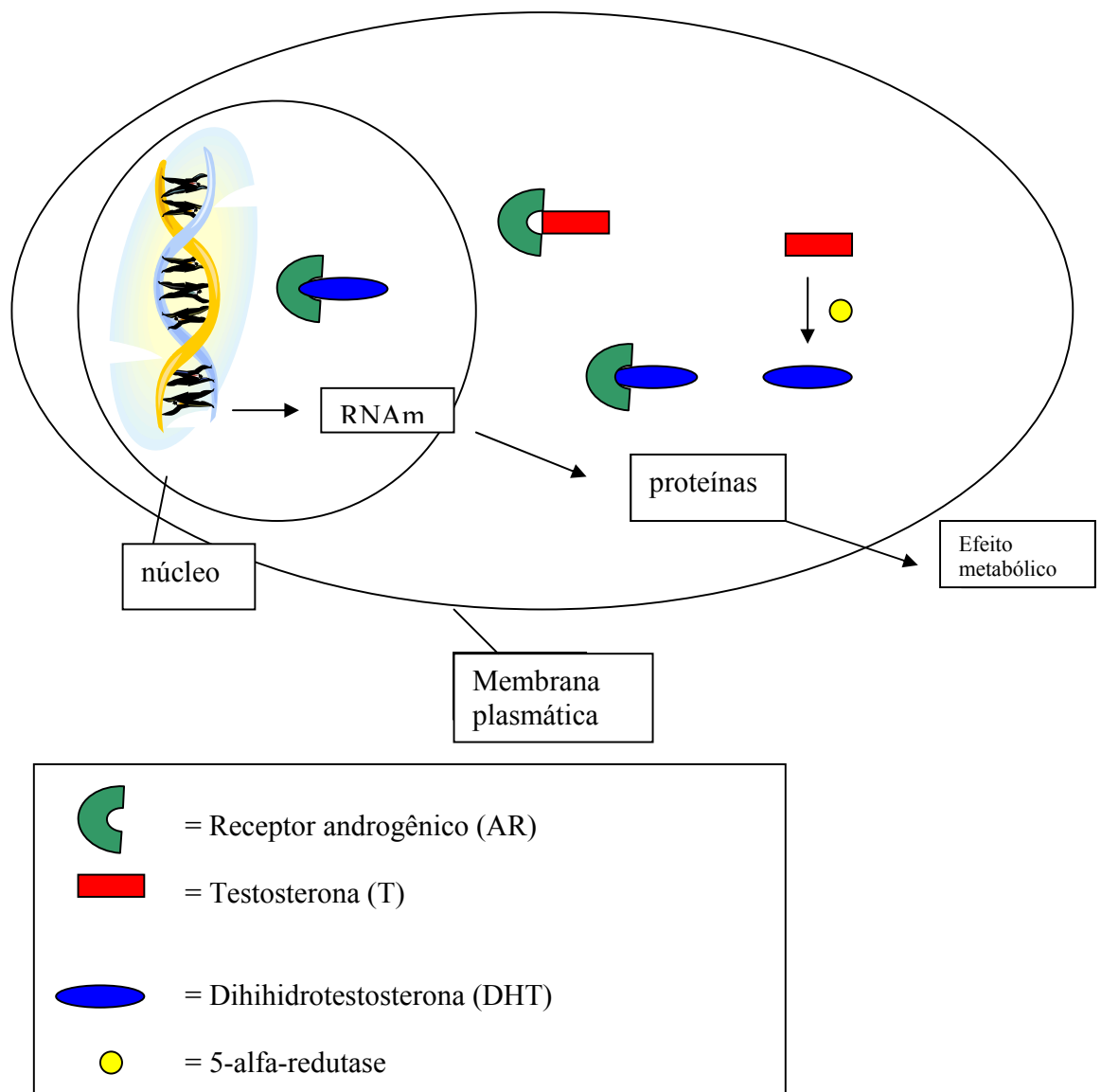


Figura 1: conversão da T em DHT na célula prostática catalisada pela 5-alfa-redutase. Pode-se ver a maior afinidade da DHT pelo AR (mesmo tipo de AR para T e para DHT). Devido à alta afinidade da DHT a mesma amplia os efeitos metabólicos da T.

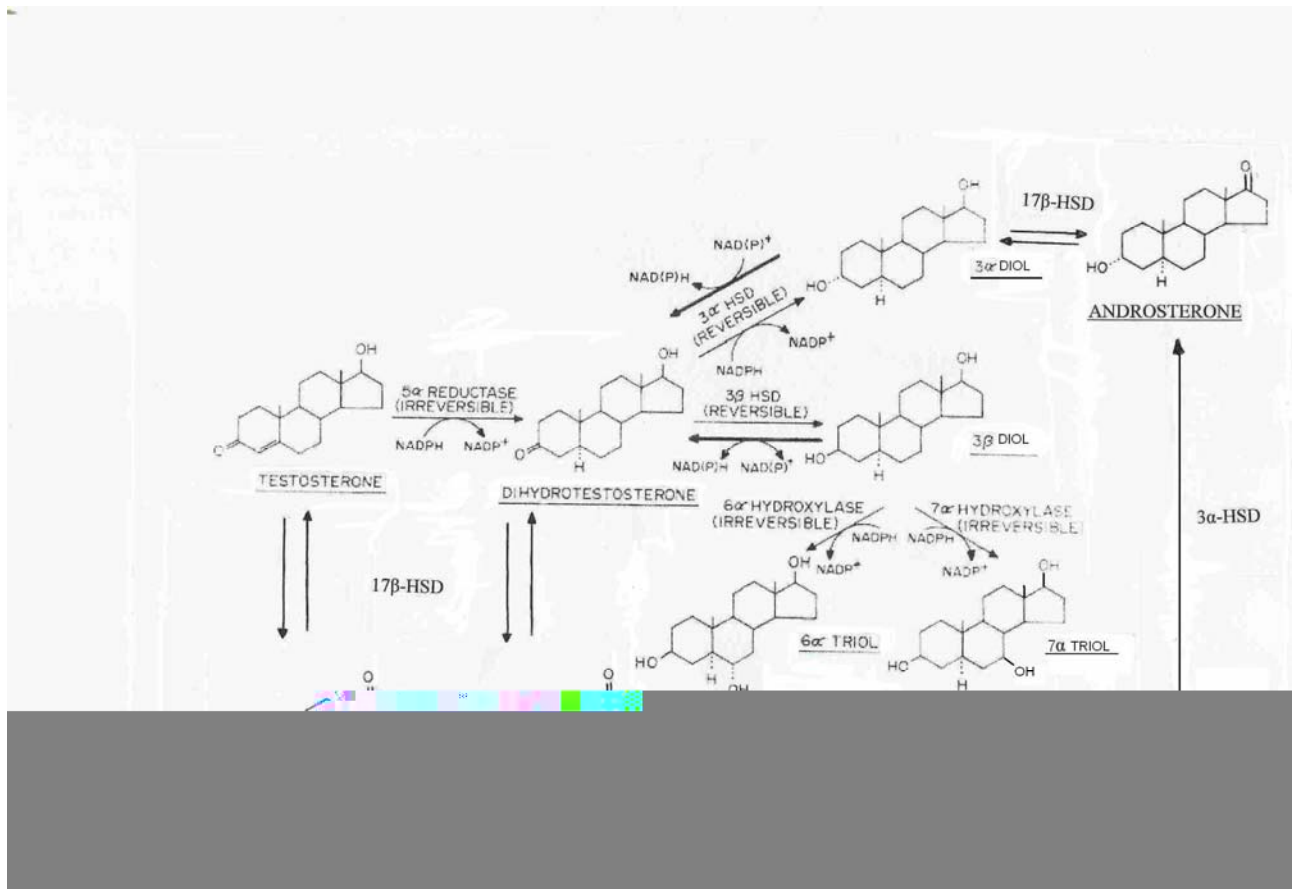


Figura 2: metabolismo da testosterona na célula prostática. (2, 3, 5, 17, 18)

PROTOCOLO CINCO-ALFA-REDUTASE

1. DATA: ____/____/____
2. Iniciais do paciente: ____ ____ ____
3. N.º do prontuário no HCPA: _____
4. Raça: **(B)** **(N)** **(A)** **(O)**
5. Idade: _____ anos
6. PSA: 6.1.Total: _____; 6.2. Livre: _____; (data do PSA ____/____/____)
7. Medicamentos em uso: **(finasterida)** **(testosterona)** **(alfa-bloqueador)** **(dutasterida)**
(outros): _____
8. Procedimento realizado: **(Bx)** **(RTUP)** **(PS)** **(PRR)**
9. Indicação do procedimento: **(PSA elevado)** **(Nódulo)** **(STUI/RU/HPB)** **(CaP)**
10. Urocultura pré-operatória: (+) (-) **(n.s.)**
11. Diagnóstico anátomo-patológico: **(CaP)** **(HPB)** **(Prostatite)** **(tecido normal)**
(PIN alto grau) **(PIN baixo grau)**
12. Se CaP:
 - 12.1. Gleason pré-operatório: escore (de 2 a 10)____ (__+__)
 - 12.2. Gleason pós-operatório: escore (de 2 a 10)____ (__+__)
 - 12.3. Estádio pré-operatório (TNM): _____
 - 12.4. Estádio pós-operatório (TNM): _____
 - 12.5. Nadir do PSA: _____
 - 12.6. Cintilografia óssea pré-operatória: (+) (-) **(indeterminada)** **(não realizada)**

LEGENDA: B = branco; N = negro; A = amarelo; O = outras / Bx = biópsia guiada por ecografia transretal de próstata;
RTUP= ressecção transuretral de próstata; PS= prostatectomia simples; PRR= prostatectomia radical retropúbica / STUI =
sintomas do trato urinário inferior/ RU= retenção urinária; HPB= hiperplasia prostática benigna; CaP= adenocarcinoma de
próstata/ n.s.= não solicitada.

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

SERVIÇO DE UROLOGIA

Estamos realizando um estudo científico que envolve a utilização de amostras de próstata. Essa pesquisa tem por finalidade trazer avanços no conhecimento de algumas doenças que atingem o órgão em questão. Esse conhecimento poderá ser útil, no futuro, para o aumento da acurácia no diagnóstico (detecção) de câncer de próstata, bem como para potenciais benefícios terapêuticos (melhores tratamentos). Para tanto, necessitamos pequenas amostras obtidas através de biópsias ou de cirurgias. Os colaboradores serão os pacientes que tenham biópsias ou cirurgias já indicadas e agendadas por critérios médicos independentes deste estudo, ou seja, o paciente não fará o procedimento de biópsia exclusivamente para a pesquisa, mas sim como parte da investigação a que está sendo submetido. Para as biópsias transretais de próstata realizadas no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, são coletados usualmente doze fragmentos para fins assistenciais. Solicitamos sua permissão para coletarmos apenas mais dois fragmentos, além dos supra-citados, para fins de pesquisa. Somente estes dois fragmentos serão utilizados no estudo, sem interferir na capacidade do procedimento em diagnosticar a doença que o atinge. Seu consentimento deverá ser VOLUNTÁRIO, LIVRE E ESCLARECIDO, sendo que o senhor poderá aceitar livremente participar ou não do nosso estudo. Ademais asseguramos a confidencialidade da sua identidade.

Eu,RG....., após ter lido este documento e após tê-lo compreendido, aceito voluntariamente colaborar com o estudo científico em questão, concordando, portanto, que sejam coletadas duas amostras de próstata a mais do que as doze habituais no procedimento a que necessito ser submetido por razões médicas independentes do presente estudo científico.

Paciente:

_____/_____/_____
data

Pesquisadores:

_____/_____/_____
data

Dr. Osmar Luiz Magalhães de Oliveira (Telefone 91123000)
Dr. Emanuel Burck dos Santos (Telefone 99972121)
Serviço de Urologia do HCPA (Telefone 33168286)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)