



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MONYSE DE NÓBREGA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS  
GENES *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* E *AMACR* EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE PRÓSTATA**



**Universidade Estadual de Londrina**



**Instituto Agronômico do Paraná**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

---

MONYSE DE NÓBREGA

**Estudo de associação de polimorfismos nos genes *PTEN*, *PI3K*,  
*AKT1*, *AR* e *AMACR* em pacientes com câncer de próstata**

---

Londrina  
2018

MONYSE DE NÓBREGA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS  
GENES *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* E *AMACR* EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos  
Cólus

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana Mara  
Serpeloni

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Nobrega, Monyse.

Estudo de associação de polimorfismos nos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* e *AMACR* em pacientes com câncer de próstata / Monyse Nobrega. - Londrina, 2018.  
92 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Coorientador: Juliana Mara Serpeloni.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Câncer de próstata - Tese. 2. Biomarcadores moleculares - Tese. 3. Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) - Tese. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Serpeloni, Juliana Mara. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

MONYSE DE NÓBREGA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES  
*PTEN, PI3K, AKT1, AR E AMACR* EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Co-Orientadora: Profa. Dra. Juliana Mara  
Serpeloni  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Danielle Malheiros Ferreira  
Universidade Federal Do Paraná - UFPR

---

Profa. Dra. Mariana Bisarro dos Reis  
Hospital de Câncer de Barretos

Londrina, 27 de fevereiro de 2018.

## *Dedicatória*

À minha família, especialmente aos meus pais, pelas inúmeras vezes que deixei de estar presente em momentos especiais, e vocês mostravam compreensão e retribuíam com amor. Obrigado pelos abraços fora de hora. Eles foram revigorantes e com certeza, a sustentação para que eu pudesse chegar até este momento.

## **AGRADECIMENTOS**

### **APOIO FINANCEIRO**

- Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Convênio 185/2014 - Financiamento da pesquisa.
- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - PROAP e concessão da bolsa de mestrado.

### **APOIOS INSTITUCIONAIS**

- Universidade Estadual de Londrina (UEL).
- Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM).
- Hospital do Câncer de Londrina (HCL).
- Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema (CISMEPAR).
- Irmandade Santa Casa de Londrina.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** por poder viver, sonhar e realizar meus sonhos.

À **Dra Ilce Mara de Syllos Cólus**, orientadora e amiga, por me aceitar como sua aluna e me dar a oportunidade de participar deste projeto. Você é um grande exemplo de mulher, inteligência, honestidade e dedicação. É um prazer poder conviver e aprender um pouco com você; apesar dos ‘fumos’, me fez evoluir muito até aqui. Muito obrigada!

À **Dra Juliana Mara Serpeloni**, co-orientadora querida, pela ajuda incessante nos momentos de dúvidas e correção deste trabalho. Muito obrigada!

Aos professores do curso, em especial à **Dra Silvia Helena Sofia**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Aos meus pais **Luiz** e **Cecília**, sem vocês eu jamais teria chegado até aqui, reconheço que apesar das dificuldades, vocês fazem de tudo para realizar meus sonhos. Obrigada por me darem tanto amor e apoio. Amo vocês!

À minha irmã **Marcela Nóbrega**, minha grande companheira da vida, que apesar de vivermos entre tapas e beijos, se faz sempre presente oferecendo seu apoio e carinho. Amo você!

Ao meu namorado **André Abou Faissal**, agradeço o apoio, paciência e amor que tem comigo. Você foi essencial, muito obrigada. Amo você!

À **Dra Marilesia Ferreira de Souza**, por transmitir um pouco do seu conhecimento em oncogenética e câncer de próstata. Obrigada por espalhar seu amor pela ciência e contagiar os que estão a sua volta. Aprendi muito com você, muito obrigada!

À **Ms. Milene Roldão de Souza**, pela dedicação em me ensinar desde técnicas básicas do laboratório até ensaios mais difíceis, sempre com muito amor e paciência. Obrigada por ter me acolhido e pelos bons momentos que vivemos.

À **Dra Heloísa Lizotti Cilião**, exemplo de aluna e pesquisadora. Agradeço as dicas que sempre deu e por compartilhar seus conhecimentos estatísticos. Você foi fundamental para realização deste trabalho, muito obrigada!

Aos amigos do LAMON: **Higor Lopes, Kátiuska Tuttis, Rossana Camargo, Mariana Stinglin Rosa, Maiara Piva** e aos ICs **Larissa Oliveira, Gabriela Weiss, Hector Furini**, por toda ajuda gratuita e pela amizade construída. Em especial à **Beatriz Mattos** pelo companheirismo e pelos ‘tecos’ depois do almoço.

Às minhas amigas de infância **Alana Vertuan, Marcela Mendes, Marcela Voltarelli, Mayara Manginelli** e **Michelle Bavia**, pelo companheirismo de sempre.

À minhas amigas de apartamento **Laura Perez, Janeth Escobar** e **Patrícia Shinohara**, obrigada pela boa convivência e pelos momentos felizes compartilhados. Cada uma seguindo seu caminho, mas vou levar vocês para sempre no coração.

A todos os homens que gentilmente aceitaram participar deste trabalho.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Não existe triunfo sem perda,  
Não há vitória sem sofrimento,  
Não há liberdade sem sacrifício”  
*O Senhor dos Anéis*

NÓBREGA, Monyse. **Associação dos polimorfismos nos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* e *AMACR* em pacientes com câncer de próstata.** 2018. 92 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biológica Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

### ABSTRACT

Por ser uma doença heterogênea e multifatorial, o câncer de próstata (CaP) tem demandado a busca por métodos de triagem mais específicos para o prognóstico e agressividade da doença. Com o objetivo de contribuir para isso, este estudo avaliou variantes polimórficas nos genes *PTEN* (rs2735343), *PI3K* (rs2699887), *AKT1* (rs2494750), *AR* (rs17302090) e *P504S(AMACR)* (rs3195676) como possíveis marcadores moleculares de suscetibilidade, prognóstico e progressão para o CaP em um estudo do tipo caso-controle e transversal. Amostras de sangue periférico foram obtidas de 277 pacientes que apresentaram confirmação histopatológica do carcinoma e seus controles pareados (PSA inferiores a 2 ng/mL). As genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real usando sonda de hidrólise. A associação entre a ocorrência de CaP com as variantes polimórficas foi calculada por *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95%, obtida por regressão logística multivariada dos dados. Demonstraram associação com proteção para a doença o genótipo do gene *AKT1* (CG; p=0,045), assim como os genótipos associados dos genes *AKT1+AR* (CG+A; p=0,041). A combinação dos genótipos com os dados histopatológicos do tumor indicou associação das variantes alélicas de *AMACR* (GA p=0,033; GA+AA p=0,039) com proteção para invasão de vesícula seminal. Os polimorfismos combinados em pares foram associados com proteção para bilateralidade do tumor (*AKT1+AR*; p=0,042) e (*PI3K+AR*; p=0,040) e para invasão de vesícula seminal (*AKT1+AR*; p=0,043) e (*AKT1+AMACR*; p=0,015). As combinações dos genótipos (*PTEN+AMACR*; p=0,049) e (*PTEN+AR*; p=0,042; p=0,039) foram associadas a risco para extensão extracapsular. Os dados obtidos permitem inferir que os SNPs estudados dos genes *AKT1(CC)*, *AMACR (GA e GA+AA)* e *PI3K (GG)* estão associados a melhor prognóstico e a CaP não agressivo, enquanto a associação de genótipos dos genes *PTEN+AMACR (CG+GG)* e *PTEN+AR (CG+G e CG+A)* estão associados a pior prognóstico dos pacientes. Portanto, esses polimorfismos merecem novos estudos para serem confirmados como marcadores de suscetibilidade e prognósticos para CaP.

**Palavras-chave:** SNP. Parâmetros histopatológicos. Prognóstico. Gene *AKT1*. Gene *PTEN*.

NÓBREGA, Monyse. **Association of polymorphisms in *PTEN*, *AKT1*, *PI3K*, *AR* and *AMACR* genes in patients with prostate cancer.** 2018. 92 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

for more specific screening methods for the prognosis of the disease. In order to contribute to this, the present study evaluated polymorphic variants in aggressiveness (rs2735343) *PTEN*, (rs2494750) *AKT1*, (rs2699887) *PI3K*, (rs17302090) *AR* and (rs3195676) *P504S* (*AMACR*) genes as potential molecular markers of susceptibility, prognosis and progression to PCa in a case-control and cross-sectional study. Peripheral blood samples were obtained from 277 patients who presented histopathological confirmation of the carcinoma and their matched controls (PSA less than 2 ng/mL). Genotyping were performed by real-time PCR using hydrolysis probe. The association between the occurrence of PCa and polymorphic variants was calculated by Odds Ratio (OR) with 95% confidence interval, obtained by multivariate logistic regression of the data. The *AKT1* gene genotype (CG;  $p = 0.045$ ), as well as the associated genotypes of the *AKT1+AR* genes (CG+A;  $p = 0.041$ ) shown protection to the disease. The combination of the genotypes with the histopathological data of tumor indicated association of the allelic variants of *AMACR* (GA  $p = 0.033$ , GA+AA  $p = 0.039$ ) with protection for seminal vesicle invasion. Combined polymorphisms in pairs were associated with protection for tumor bilateral (*AKT1+AR*;  $p = 0.042$  and *PI3K+AR*;  $p = 0.040$ ) and for seminal vesicle invasion (*AKT1+AR*;  $p = 0.043$ ) and (*AKT1+AMACR*,  $p = 0.015$ ). The combinations of genotypes (*PTEN+AMACR*;  $p = 0.049$ ) and (*PTEN+AR*;  $p = 0.042$ ;  $p = 0.039$ ) were associated with risk for extracapsular extension. The data obtained allow us to infer that the studied SNPs of the *AKT1* (CC), *AMACR* (GA and GA + AA) and *PI3K* (GG) genes are associated with a better prognosis and non-aggressive CaP, whereas the association of genotypes of the *PTEN + AMACR* (CG + GG) and *PTEN + AR* (CG+G and CG+A) are associated with poorer prognosis. Therefore, these polymorphisms deserve further studies to be confirmed as markers of susceptibility and prognosis for CaP.

**Key words:** SNP. Histopathological parameters. Prognosis. *AKT1* gene. *PTEN* gene.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Frequências de Incidência e mortalidade devido ao câncer de próstata em diferentes regiões do mundo. Taxa padronizada por 100.000 homens.....	19
<b>Figura 2</b> - Zonas da glândula prostática: posição e relação com outros órgãos.....	23
<b>Figura 3</b> - Classificação morfológica de células da próstata.....	26
<b>Figura 4</b> - Estadiamento do CaP baseado em TNM (tamanho, comprometimento de linfonodos e metástase) .....	27
<b>Figura 5</b> - Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) sítios no genoma onde duas ou mais variantes de um nucleotídeo são comuns na população.....	33
<b>Figura 6</b> - Importância das vias de sinalização dos genes <i>PTEN/AKT/PI3K</i> e vias relacionadas a vários processos celulares .....	35
<b>Figura 7</b> - Estrutura da proteína PTEN indicando suas respectivas regiões .....	36
<b>Figura 8</b> - Estrutura da proteína AKT indicando suas respectivas regiões.....	39
<b>Figura 9</b> - Ação do andrógeno .....	41

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Tabela 1** - Classificação TNM do câncer de próstata.....28

**Tabela 2** - Genes, localização cromossômica e variantes avaliados no presente estudo.....34

### MANUSCRITO

**Tabela 1** - Análise univariada de características clínicas e sócio culturais de pacientes com câncer de próstata e indivíduos controles.....52

**Tabela 2** - Frequências genotípicas dos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* e *AMACR* e associação com câncer de próstata ..... 53

**Tabela 3** - Associação entre os genótipos dos genes *AKT1+AR* com câncer de próstata.....54

**Tabela 4** - Análise dos níveis de PSA e das características histopatológicas dos tumores de pacientes com câncer de próstata (n=277) .....56

**Tabela 5** - Associação dos dados histopatológicos de tumores de pacientes com CaP com os genótipos dos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* e *AMACR*.....57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT1	Serina/Treonina cinase 1
AMACR	Alfa-Metil Coenzima A Racemase
AR	Do inglês, <i>Androgen Receptor</i>
ARE	Do inglês, <i>Androgen Response Element</i>
DBD	Do inglês, <i>DNA Binding Domain</i>
CaP	Câncer de próstata
DHT	Di-hidrotestosterona
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
GWAS	Do inglês, <i>Genome Wide Association Studies</i>
HSG	Do inglês, <i>Heat-Schock Proteins</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISUP	Do inglês, <i>International Society of Urological Pathology</i>
KLK3	Do inglês, <i>Kallikrein related peptidase 3</i>
LBD	Do inglês, <i>Ligand-binding domain</i>
mRNA	RNA mensageiro
NCI	Do inglês, <i>National Cancer Institute</i>
NTD	Domínio N - Terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAP	Do inglês, <i>Prostatic Acid Phosphatase</i>
PCA3	Do inglês, <i>Prostate Cancer Antigen 3</i>
PH	Proteína Plecstrina
PHI	Do inglês, <i>Prostate Health Index</i>
PI3K	Do inglês, <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PIP2	Do inglês, <i>Phosphatidylinositol (4,5) - Bisphosphate</i>
PIP3	Do inglês, <i>Phosphatidylinositol (3,4,5) - Trisphosphate</i>
PSA	Do inglês, <i>Prostate Specific Antigen</i>
PTEN	Do inglês, <i>Phosphatase and Tensin Homologue</i>
SHBG	Do inglês, <i>Sex Hormone-Binding Globulin</i>
SNP	Do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TR	Toque Retal

UICC	Do inglês, <i>Union for International Cancer Control</i>
USPSTF	Do inglês, <i>The United States Preventive Services Task Force</i>
VA	Vigilância Ativa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>19</b>
2.1 Epidemiologia do câncer de próstata .....	19
2.2 Próstata.....	21
2.2.1 Câncer de próstata .....	24
2.2.2 Biomarcadores para câncer de próstata .....	29
2.2.3 Polimorfismos Genéticos .....	32
2.2.4 Genes candidatos a biomarcadores para câncer de próstata .....	34
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
3.1 Objetivo Geral .....	45
3.2 Objetivos Específicos .....	45
<b>4. MANUSCRITO.....</b>	<b>46</b>
<b>5. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>6 APÊNDICES .....</b>	<b>81</b>
APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes .....	81
APÊNDICE B - Consentimento pós informado para pacientes .....	83
APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos controles.....	84
APÊNDICE D - Consentimento pós-informado para indivíduos controles .....	86
<b>6 ANEXO .....</b>	<b>92</b>
ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEL .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de tumor mais frequente na população masculina e a quinta causa de morte devido ao câncer (TORRE et al., 2015). No Brasil, após o câncer de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais incidente em homens, estimam-se 68.220 casos novos de CaP para cada ano do biênio 2018-2019 o que representa uma incidência de 66,12 casos a cada 100 mil homens; anualmente, 13.772 homens vão a óbito em consequência deste tumor no Brasil (INCA, 2018).

Mais do que qualquer outro tipo, o CaP é considerado um câncer da terceira idade, já que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos (INCA, 2014). Os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese e na progressão desta doença ainda não foram totalmente esclarecidos. Sabe-se que é uma doença heterogênea, pois o tumor pode ser latente (com crescimento lento e não atrapalhar a qualidade de vida e sobrevida do paciente) ou agressivo (de crescimento rápido e levando o indivíduo a óbito em consequência do tumor) (CRAWFORD, 2009).

A triagem para este tipo de tumor vem sendo realizada por dois exames principais, o Toque Digital Retal e o Antígeno Prostático Específico (do inglês, *prostate specific antigen* - PSA). Entretanto, estudos recentes demonstraram que a inclusão do exame PSA na triagem tem ocasionado, devido à sua baixa especificidade, o diagnóstico e tratamento de milhares de homens com a forma latente da doença; ou seja, milhares de pacientes vêm sendo diagnosticados e tratados desnecessariamente. Além disso, foi demonstrado que a inclusão deste exame na triagem praticamente não promoveu impacto na redução da mortalidade devido à doença (SAINI, 2016).

Os fatores mencionados implicaram no não aconselhamento do uso do PSA para rastreamento do CaP em vários países, incluindo o Brasil (USPSTF, 2012; INCA, 2013). Entretanto, até o momento, este é o melhor marcador disponível e o mais utilizado para acompanhamento do paciente pós-diagnóstico (HALPERN et al., 2017). Em vista disso, a descoberta de novos marcadores é imprescindível para tornar o diagnóstico e tratamento desta doença mais precisos, o que tem estimulado pesquisas em todo o mundo. A busca por marcadores moleculares tem se intensificado nos últimos anos, com o objetivo principalmente de se encontrar biomarcadores pouco invasivos, de baixo custo, que sejam sensíveis/específicos e diferenciem os casos de tumores de próstata latentes e agressivos (WHO, 2017; LIU et al., 2009).

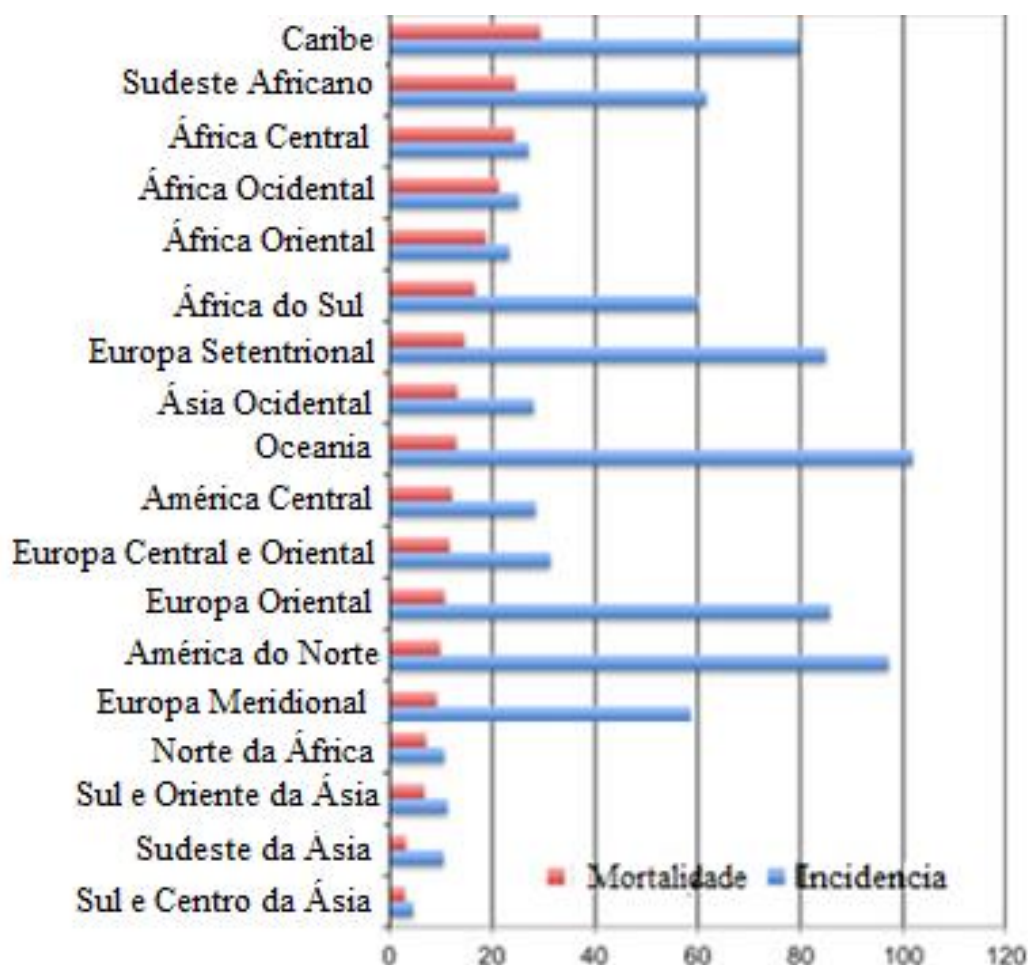
Diante dos desafios clínicos para triagem, diagnóstico, prognóstico e tratamento do CaP, o presente estudo teve como objetivo a busca de novos marcadores moleculares para esta doença. Foram escolhidos os genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* e *P504S (AMACR)*, nos quais foram investigados polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) como potenciais marcadores para este carcinoma, contribuindo para melhorar o prognóstico dessa doença, assim como compreender fatores biológicos que possam influenciar no desenvolvimento e progressão deste tipo tumoral.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Epidemiologia do câncer de próstata

O CaP é um problema de saúde pública mundial, sendo o segundo tipo mais comum de tumor sólido, atrás somente das neoplasias pulmonares, e a quinta causa de morte relacionada ao câncer em homens. Globalmente foram diagnosticados um milhão e cem mil novos casos em 2012 (TORRE et al., 2015). A taxa de incidência do CaP nos países desenvolvidos é maior do que a dos países em desenvolvimento. Embora as taxas de incidência e mortalidade variem substancialmente na população, como por exemplo nas regiões leste e centro-sul da Ásia, a população afro-americana é a mais acometida (Figura 1) (REBBECK, 2017).

**Figura 1** – Frequências de incidência e mortalidade devido ao câncer de próstata em diferentes regiões do mundo. Taxa padronizada por 100.000 homens



Fonte: Rebbeck (2017)

O Instituto Nacional de Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde responsável pela prevenção e controle de câncer no Brasil, apontou o câncer de próstata como o mais incidente em todas as regiões do país, e estimou para 2018 o surgimento de 68.220 novos casos. Em média 13.772 indivíduos vão a óbito por ano no Brasil, em consequência deste tumor (INCA, 2018).

A taxa de desenvolvimento do carcinoma prostático varia substancialmente de acordo com idade, fatores geográficos, suscetibilidade genética, exposição a diferentes fatores de risco como exposição ambiental e obesidade, considerados fatores de risco primários no desenvolvimento do CaP (REBBECK, 2017; O'CONNOR, 2015).

O fator de risco mais conhecido para CaP é o envelhecimento, uma vez que o CaP é raramente diagnosticado antes dos 45 anos. Nas comunidades ocidentais, a taxa de incidência acomete principalmente homens entre os 65 e 75 anos. Dados presentes na literatura, demonstram que a alta incidência do CaP associada ao aumento da idade pode ocorrer em consequência do acúmulo de danos no DNA (O'CONNOR, 2015). Uma meta-análise feita a partir de 29 estudos realizados em mais de 20 países, que consistiu em autópsia em homens que morreram por outras causas e apresentavam alterações malignas na próstata, demonstrou que 5% (IC 95%: 3-8%) possuíam menos de 30 anos e 59% (IC 95%: 48-71%) mais de 79 anos (BELL et al., 2015). Isso confirma um dos maiores dilemas atuais no diagnóstico de CaP: a maioria dos homens que sofre de CaP morre com a doença, não da doença. A questão da pesquisa neste tipo de tumor é a identificação de testes discriminatórios que possam prever com precisão o CaP letal e indolente.

Além da idade, o histórico familiar de câncer positivo é outro fator de risco bem estabelecido para CaP. Homens que possuem parentes de primeiro grau afetados carregam um risco aumentado de duas a três vezes de serem diagnosticados com a doença. Foi estimado que 5-10% dos casos de CaP possuem causa hereditária (CREMERS et al., 2016), mas a identificação de genes envolvidos na transformação maligna da próstata parece ser muito mais problemática do que, por exemplo, para o câncer de mama. Aparentemente, o câncer de próstata familiar é uma doença muito heterogênea com contribuições de muitos loci genéticos, quando comparado a outros tipos de câncer (LIU et al., 2011).

A incidência do CaP também varia de acordo com a ancestralidade da população. Os homens afro-descendentes possuem níveis elevados de testosterona, que foram associados com aumento de risco de CaP. Este tipo de tumor é menos incidente em homens de descendência asiática, enquanto aqueles que vivem na América do Norte e no Norte Europeu têm um alto risco de CaP. Isto é ilustrado mais claramente por resultados de estudos de migração, que

reportaram a baixa incidência de câncer em homens asiáticos e alta incidência em asiáticos que migraram para os EUA, devido à mudança no estilo de vida e à exposição a novos fatores de risco, apresentando aumento significativo de CaP. No entanto, a taxa de incidência ainda é menor em asiáticos que vivem na América do Norte quando comparados aos americanos nativos (COOK; GOLDOFT, SCHWARTZ et al., 1999).

A obesidade é um fator frequentemente associado ao CaP avançado e este fato pode ser consequência do sobrepeso influenciando os níveis de hormônios esteroides e fatores de crescimento, como a insulina e leptina, promovendo o crescimento desordenado das células. Além disso, a obesidade está associada a um menor nível de testosterona. Os baixos níveis de testosterona não parecem ter um forte efeito sobre o risco de CaP, mas a diminuição deste hormônio pode facilitar o crescimento da próstata menos diferenciada, resultando em um fenótipo agressivo do câncer (RODDAM et al., 2008). A obesidade também está associada com um estado inflamatório crônico de baixo grau. A ativação das vias inflamatórias pode levar à desregulação de genes e promover o desenvolvimento do câncer (SFANOS; ISAACS, MARZO, 2013). Um estudo de meta-análise envolvendo 11.149 homens confirmou a hipótese de CaP avançado relacionado com obesidade, demonstrando um risco de 8% para homens com aumento de  $5 \text{ kg/m}^2$  no índice de massa corporal (IMC) (THOMPSON et al., 2003).

Embora o diagnóstico e tratamento para CaP tenham evoluído, a etiologia e patogênese da doença ainda não foram completamente elucidadas. Além disso, até o presente momento os casos metastáticos são dificilmente curáveis. A identificação de novos marcadores moleculares contribui para um prognóstico e diagnóstico mais confiável, como também pode permitir selecionar o melhor método terapêutico. O cenário ideal seria um painel de marcadores moleculares auxiliando na identificação da suscetibilidade, prognóstico e diagnóstico da doença (PONIAH et al., 2017).

## 2.2 Próstata

A próstata é uma glândula exócrina que auxilia no sistema genital masculino. Localiza-se na parte baixa do abdômen, em frente ao reto, embaixo da bexiga, envolvendo a porção inicial da uretra. A próstata se desenvolve no período gestacional e até o nascimento tem cerca de 1,5 g, permanecendo assim até a puberdade precoce, quando em uma fase de crescimento aumenta de tamanho para uma média de  $20 \pm 6 \text{ g}$  em adultos jovens (JARVIS; CHUGHTAI, KAPLAN, 2015).

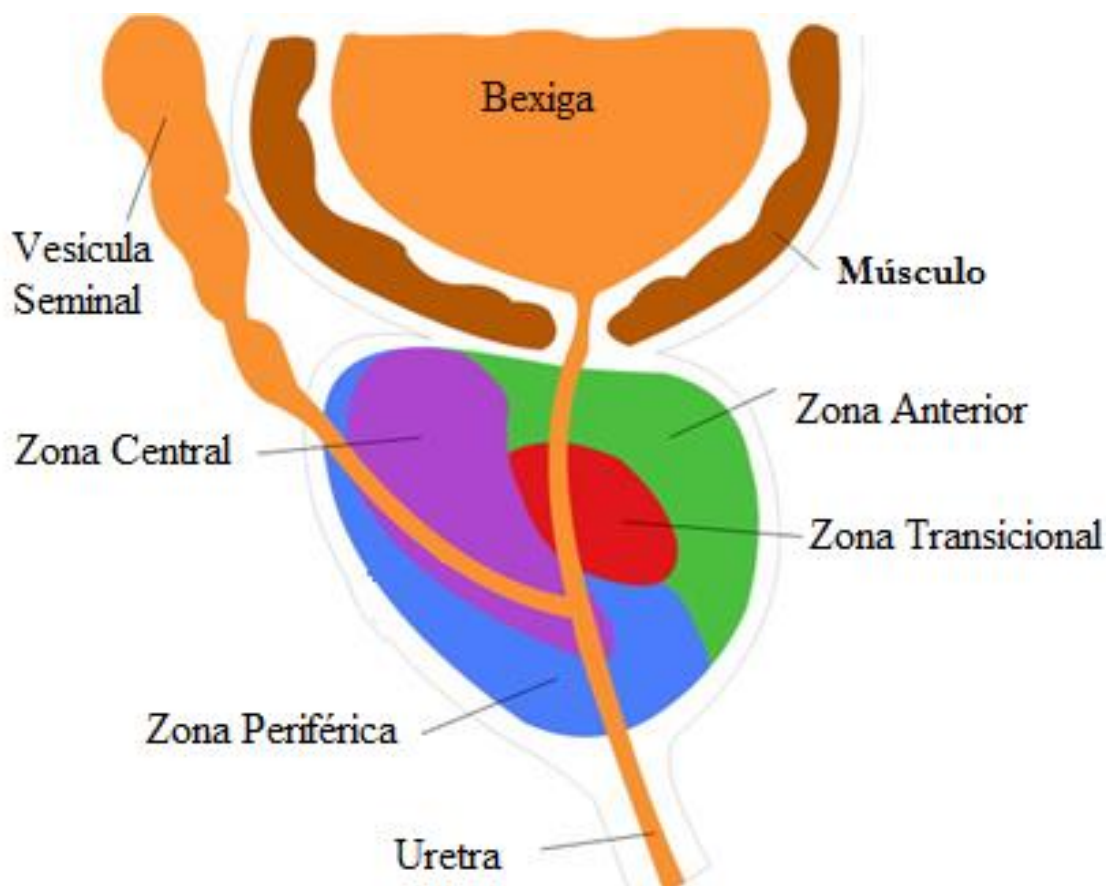
O crescimento prostático depende de hormônios masculinos denominados andrógenos, sendo o principal deles a testosterona produzida nos testículos, que será convertida em di-

hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5-alfa redutase. A DHT atua na ativação do receptor de andrógeno com importante papel na transcrição de genes alvo específicos da próstata, relacionados com proliferação e progressão celular e transcrição do antígeno prostático específico (PSA) (ROBBINS et al., 2016).

Histologicamente a próstata é composta pelo estroma fibromuscular e pelo epitélio glandular. O estroma fibromuscular envolve a glândula, que pode ser dividida em quatro regiões: zonas periférica, central, transicional e anterior, esta última também denominada fibromuscular. Todas possuem atividades biológicas e anatomia diferentes (Figura 2). Com exceção da zona anterior, a próstata é constituída de tecido glandular com epitélio colunar pseudoestratificado secretor, incorporado pelo estroma fibromuscular. Em razão dessas divergências teciduais da próstata, as lesões proliferativas se comportam diferentemente em cada região; na zona de transição normalmente ocorrem processos de hiperplasias, enquanto a maioria dos adenocarcinomas têm origem na zona periférica. Os processos patológicos que afetam a próstata com maior frequência são o aumento nodular benigno, tumores e inflamação. No entanto, o mais comum dos três é o aumento nodular benigno que, devido à sua elevada incidência na população masculina idosa, pode ser considerado um processo normal do envelhecimento (FRANZ et al., 2013). O estroma fibromuscular além de dividir a glândula, possui atividade contrátil, auxiliando na eliminação do fluído seminal durante a ejaculação. O epitélio glandular consiste em 70% da próstata e possui quatro tipos de células: (I) as secretoras, que produzem as enzimas (fosfatase ácida e PSA) e secreções prostáticas; (II) células basais, que são precursoras das células secretoras; (III) células neuroendócrinas, produtoras de substâncias como serotonina, hormônio tireotrófico e calcitonina e (IV) as células transicionais, localizadas ao redor da uretra supramontanal, região que compõe cerca de 5% da próstata e é formada por dois ductos mais complexos e sistema acinar mais desenvolvido (MCNEAL, 1988).

A principal função da próstata é produzir a proteína PSA, que compõe o fluido seminal (cerca de 20% do volume) um líquido ligeiramente ácido (pH 6 ~ 6,4). O líquido seminal, produzido pelo tecido glandular prostático, drena para 12 a 20 ductos excretores e, então, para a uretra (SCHROEDER, 2008; VANACORE et al., 2017). O PSA é a principal proteína do sêmen, com uma concentração que varia entre 0,5 e 2,0 mg/mL, aproximadamente um milhão de vezes mais que sua concentração plasmática (LOVGREN et al., 1999).

**Figura 2** – Zonas da glândula prostática humana: posição e relação com outros órgãos.



**Fonte:** Franz et al. (2013)

Como a próstata possui vasos sanguíneos, a enzima consegue com facilidade atingir a corrente sanguínea, onde se detecta pequena quantidade de PSA livre. Outra forma de PSA presente na corrente sanguínea é a complexada com outras proteínas, porém em menor quantidade, pois torna-se uma molécula grande e com dificuldade de atravessar a membrana dos vasos sanguíneos. Quando ocorre lesão na membrana da próstata, a perda da arquitetura tecidual facilita o acesso do PSA complexado ao espaço extracelular e à corrente sanguínea, (STAMEY et al., 1988), o que leva ao seu uso como biomarcador.

Em casos de alterações na próstata, o PSA complexado se encontra aumentado. No entanto, devido à dificuldade em se analisar todas as proteínas com as quais o PSA se complexa, é realizada a dosagem total do PSA no soro, a qual é obtida através da soma do PSA complexado

e PSA livre. Este resultado sugere ao clínico possíveis alterações na próstata (STENMAN; 2001).

### 2.2.1 Câncer de próstata

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento desregulado das células que vão gerar clones com crescimento autônomo e com capacidade de invasão e metástase em outros tecidos (WEINBERG, 2007).

Na maioria dos casos, o CaP possui uma taxa de evolução lenta, a forma indolente. No entanto, também pode manifestar-se de forma agressiva com potencial para invasão de órgãos vizinhos como vesículas seminais, bexiga e reto. As células de CaP se disseminam por meio da corrente sanguínea e formam metástases, principalmente nos linfonodos e ossos (PONIAH et al., 2017).

Devido à alta incidência e mortalidade por CaP nos Estados Unidos da América (EUA), métodos de diagnóstico para a doença foram implementados na década de 1980. Os protocolos iniciais para triagem consistiam exclusivamente no exame toque retal (TR), que fornece informações quanto ao tamanho, consistência, assimetria glandular e irregularidade superficial do órgão. A importância do TR se justifica pelo fato de que cerca de 80% das transformações malignas ocorrem nas células secretoras da região periférica da próstata, podendo ser apalpadas através do reto. No entanto, o TR possui limitações, podendo apresentar um resultado falso-negativo quando o tumor não está localizado na zona periférica da próstata, que neste caso mantém a característica conservada da glândula na periferia (HALPERN et al., 2017). Devido à ausência de benefícios relacionados com a mortalidade, foram requeridos novos exames que proporcionassem melhor taxa de sobrevivência aos indivíduos.

No início dos anos 90 o exame de PSA foi inserido no mercado; este método de diagnóstico devido à sua alta sensibilidade, proporcionou muitos casos de super-diagnóstico e super-tratamento de pacientes com a doença clinicamente indolente (BERMAN; EPSTEIN, 2014).

Os marcadores para doenças são classificados pelo serviço preventivo dos EUA (USPSTF, do inglês *The U.S. Preventive Services Task Force*), em ordem crescente de recomendação, em graus que variam de A a D e marcador I. O exame PSA foi reclassificado em 2012 por esta agência, em grau D, indicando que este método não apresenta benefício ao paciente. Segundo o USPSTF, o rastreamento baseado na quantificação do PSA plasmático resulta na detecção de mais casos de CaP, mas sua capacidade de diminuir a mortalidade é mínima. Estes achados se tornam mais relevantes ao se considerar que a terapia para o CaP

pode ocasionar efeitos adversos importantes na vida do homem, como incontinência urinária e impotência sexual (USPSTF, 2012).

No entanto, a USPSTF não abordou explicitamente o TR, sugerindo novas pesquisas para avaliar seu papel como exame na triagem. Aproximadamente 18% dos exames de TR revelam CaP, independentemente do nível de PSA estar alterado, sendo o tumor detectado exclusivamente através do TR (HALPERN et al., 2017).

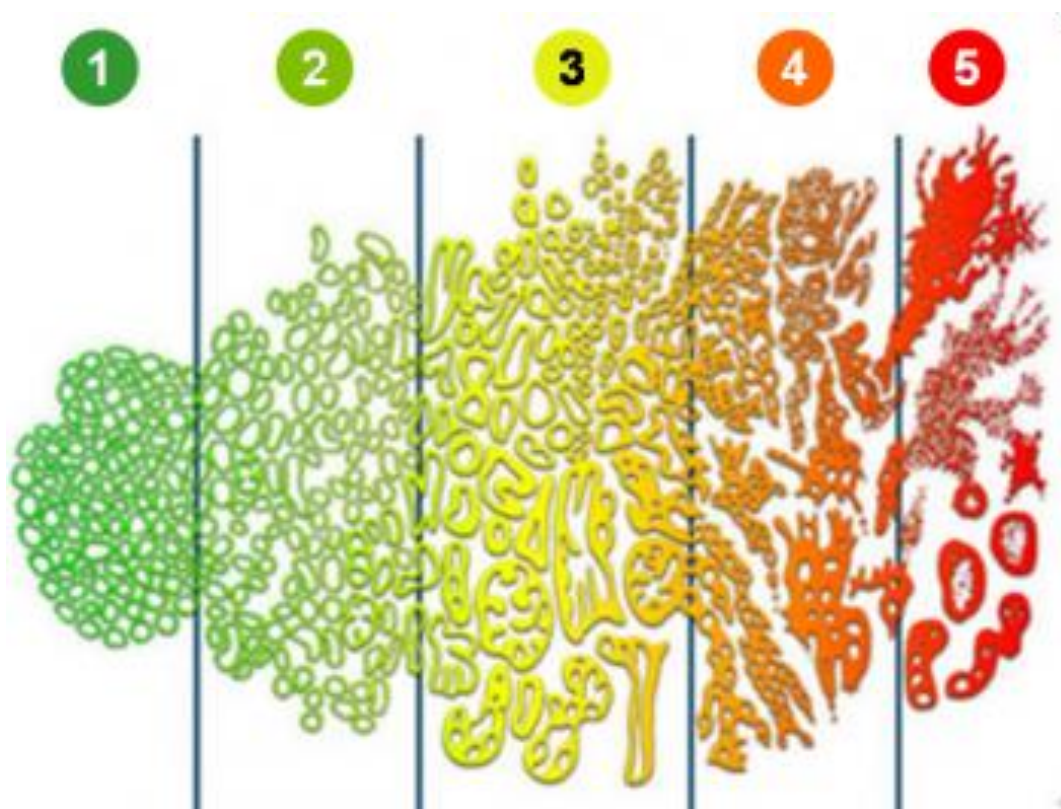
Atualmente a biópsia por agulha, realizada preferencialmente por via transretal guiada pela ultrassonografia, é considerada o padrão-ouro para diagnóstico definitivo para CaP. Por se tratar de exame invasivo com riscos de complicações, sua realização deve ser limitada a pacientes com suspeita de CaP, determinada por alterações malignas previamente confirmadas por exames de triagem. O resultado da biópsia é obtido através da análise morfológica das células prostáticas, e cálculo do escore de Gleason (VANACORE et al., 2017).

O escore de Gleason permite classificar o tumor de acordo com seu grau relativo de diferenciação baseado em sua aparência microscópica. Esta pontuação é obtida através da soma das características celulares mais presentes na amostra. O padrão arquitetural da amostra consiste de grau 1 quando é bem diferenciado e grau 5 pobremente diferenciado (Figura 3) (EPSTEIN et al., 2016; SAINI, 2016).

A Sociedade Internacional de Urologia Patológica (ISUP) (do inglês, *International Society of Urological Pathology*) adotou em 2014 um novo sistema de classificação para CaP e posteriormente foi incorporado à classificação atual da OMS, fornecendo uma classificação mais simples e também uma estratificação tumoral mais precisa (EPSTEIN et al., 2016). Anteriormente eram reconhecidos cinco padrões morfológicos do CaP que, quando combinados em pares, geravam um escore final que variava de 2 a 10 (por exemplo  $1+1=2$ ,  $3+4=7$ ,  $4+5=9$ ). Com a evolução da medicina e das tecnologias, pesquisadores passaram a considerar que os padrões 1 e 2 eram alterações precoces, que não correspondiam necessariamente ao câncer, e foram retirados da classificação. Assim, atualmente o grau varia de 6 ( $3+3=6$ ) até 10 ( $5+5=10$ ) (HUMPHREY et al., 2016).

Embora seja um poderoso indicador de prognóstico, o escore de Gleason não pode prever agressividade da doença e pacientes com tumores com padrões histopatológicos semelhantes, não necessariamente percorrerão o mesmo caminho clínico (SAINI, 2016).

**Figura 3** – Classificação morfológica de células da próstata



- 1- Glândulas pequenas e uniformes; 2- Estroma entre as glândulas; 3- Margens distintamente infiltradas; 4- Massas irregulares de glândulas neoplásicas; 5- Apenas ocasionalmente formação de glândulas.

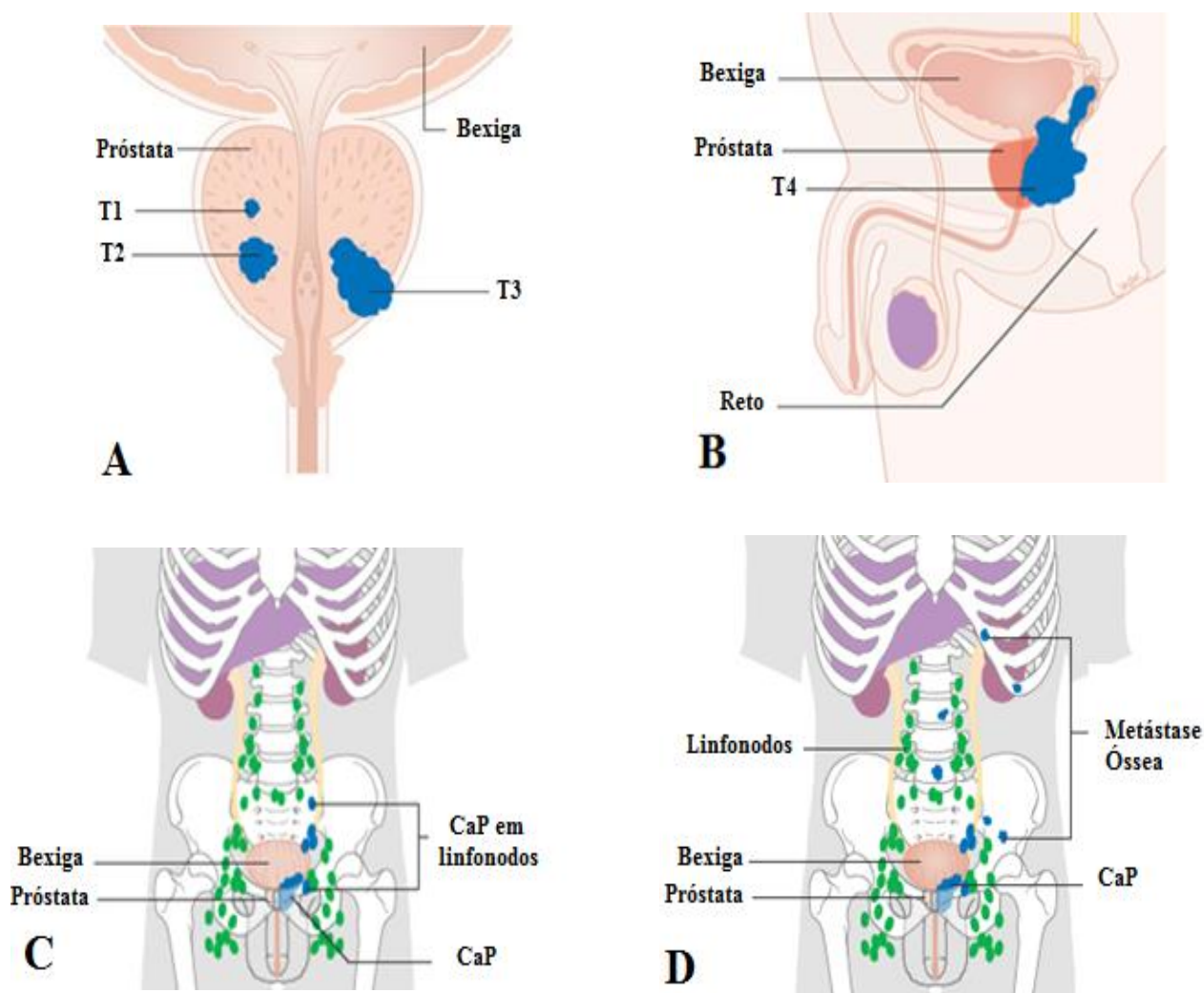
**Fonte:** Gleason (1977)

A análise do estadiamento do CaP constitui uma fase obrigatória após o diagnóstico para o planejamento terapêutico e a avaliação prognóstica. A classificação utilizada atualmente é a TNM da UICC (*Union for International Cancer Control*), versão 2009. O estadiamento irá avaliar o tamanho do tumor primário (T), o comprometimento dos linfonodos (N) e a existência de metástase (M) (Tabela 1) (HAAS et al., 2008).

Segundo a Sociedade Europeia de Urologia e a Sociedade Americana de Urologia, os pacientes com CaP clinicamente confinado (T1-T2), escore de Gleason < 6, três ou menos biópsias envolvidas com câncer, sendo que menos de 50% dessas biópsias devem estar envolvidas com câncer e PSA < 10 ng/mL, são considerados de baixo risco. Os pacientes com CaP de alto risco ou metastático, são os que apresentam o estágio clínico T ≥ T2c e/ou escore de Gleason ≥ 8 e/ou nível de PSA > 20ng/mL. Existem ainda casos considerados de médio

risco, que são os pacientes que apresentam tumor agressivo com escore de Gleason igual a 7 (que pode resultar da soma 3+4 ou 4+3), sendo este último, de pior prognóstico porque o padrão histológico mais agressivo (4) é o predominante (HEIDENREICH et al., 2011; MOHLER et al., 2010; THOMPSON et al., 2007).

**FIGURA 4** - Estadiamento do câncer de próstata baseado em TNM (tamanho, acometimento de linfonodos e presença de metástase)



**A** - T1 (tumor muito pequeno para ser visto em varredura e sentido durante o TR); T2 (tumor completamente confinado na próstata) e T3 (tumor se estende para fora da capsula da próstata); **B** - T4 (tumor fixo ou invade outras estruturas adjacentes); **C** - Linfonodos acometidos; **D** - Metástase óssea (tumor presente em mais de um local; os ossos são os locais mais comuns).

**Fonte:** Cancer Research UK (2016)

**Tabela 1** - Classificação TNM do câncer de próstata

<b>T – Tumor primário:</b> Utilizado para descrever o tamanho do tumor.	
<b>TX</b>	O tumor primário não pode ser avaliado.
<b>T0</b>	Não há evidência de câncer.
<b>T1</b>	O tumor é muito pequeno para ser visto em uma varredura, ou sentido durante o exame de toque da próstata (Figura 4a).
	<b>T1a</b> Achado por outros motivos; ocupa menos de 5% do tecido ressecado.
	<b>T1b</b> Achado por outros motivos; corresponde a mais de 5% do tecido ressecado.
	<b>T1c</b> Achado por biópsia de agulha, após um nível elevado de PSA.
<b>T2</b>	O tumor está completamente dentro da próstata (Figura 4a).
	<b>T2a</b> tumor localizado em apenas metade de um lado da próstata.
	<b>T2b</b> tumor localizado em mais da metade de um lado da próstata.
	<b>T2c</b> tumor ocupa ambos os lados.
<b>T3</b>	Tumor se estende a cápsula da próstata (Figura 4a).
	<b>T3a</b> Extensão extracapsular (uni ou bilateral).
	<b>T3b</b> O tumor invade as vesículas seminais.
<b>T4</b>	Tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes, que não as vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores e/ou parede pélvica (Figura 4b).
<b>N – Linfonodos regionais:</b> São nódulos da pelve verdadeira, os quais são essencialmente os nódulos abaixo da bifurcação ilíaca comum (Figura 4c).	
<b>NX</b>	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
<b>N0</b>	Ausência de metástase no linfonodo.
<b>N1</b>	Metástase em linfonodo regional.
<b>M – Metástase a distância:</b> Quando o tumor está presente em mais de uma localização (Figura 4d).	
<b>M0</b>	Ausência de metástase.
<b>M1</b>	Metástase a distância.
	<b>M1a</b> linfonodos não regionais.
	<b>M1b</b> Osso (s).
	<b>M1c</b> Outra (s) localização (ões).

Fonte: Cancer Research UK (2016)

### 2.2.2 Biomarcadores para câncer de próstata

O Instituto Nacional de Câncer Americano (NCI) (do inglês, *National Cancer Institute*) define como biomarcador uma molécula biológica que possa ser identificada nos fluídos corporais, sangue e tecidos, e possa ser precisamente medida, comprovando um processo biológico normal, alterado ou patológico (SAINI, 2016).

O biomarcador ideal deve possuir múltiplas características, como: I) especificidade para a doença; II) pouco invasivo; III) economicamente viável; IV) ensaio reproduzível com alta sensibilidade e especificidade; V) correlação verdadeira com o resultado da doença (LIN, 2009).

No caso de marcador tumoral, considera-se um marcador ideal aquele que se encontra em níveis alterados somente em caso de malignidade, preferencialmente nos estágios iniciais do processo neoplásico e não sofre alteração em doença inflamatória ou infecciosa (PONIAH et al., 2017).

Na prática clínica, o uso de marcadores são de extrema importância, pois eles podem prever indivíduos com maior suscetibilidade para desenvolver câncer, distinguir os estágios da doença e também selecionar o melhor tratamento para cada caso, ao invés de escolher um tratamento baseado em estatística populacional (SCHROEDER, 2008). Segundo o FDA (2018), os biomarcadores para câncer podem ser classificados em sete categorias: monitoramento, toxicidade, diagnóstico, suscetibilidade/risco, prognóstico, preditivo e resposta farmacodinâmica. No entanto, vários autores discutem principalmente a importância de três categorias: prognóstico, preditivo e farmacodinâmico (ESFAHANI; ATA EI, PANJEHPUR, 2015; MADU; LU, 2010; SAWYERS, 2008). Os biomarcadores prognósticos preveem o curso natural do câncer e permitem inferir o resultado do tumor. Os preditivos avaliam a possível vantagem de um tratamento personalizado. Os impactos terapêuticos de uma droga em um tumor são avaliados por biomarcadores farmacodinâmicos; esses biomarcadores têm como objetivo determinar a dosagem adequada do fármaco para o tratamento do tumor (ESFAHANI; ATA EI, PANJEHPUR, 2015).

A busca por marcadores moleculares tumorais é amplamente estudado e os polimorfismos genéticos têm se destacado nesse sentido, pois sua presença pode ter grande impacto nos níveis de proteínas. As alterações genéticas no câncer podem oferecer maneiras de identificar os três tipos de marcadores. No caso de marcadores preditivos esses esforços foram bem sucedidos para alguns tipos de câncer, como por exemplo, o câncer de mama e ovário hereditário que envolvem os genes mutados *BRCA1* e *BRCA2* (TOSS et al., 2015).

Ao contrário do câncer de mama familiar que possui alto risco de desenvolvimento tumoral para os indivíduos que possuem mutações patogênicas, o CaP é uma neoplasia heterogênea com múltiplos fatores de risco envolvidos (SAINI, 2016).

O primeiro marcador para diagnóstico de CaP foi identificado no soro em 1930 e denominado Fosfatase Ácida Prostática (PAP, do inglês *prostatic acid phosphatase*), cujos níveis se encontravam elevados em pacientes com metástase. Em 1980, foi substituído pelo PSA que ainda é o marcador mais utilizado na prática clínica. O PSA é uma glicoproteína codificada pelo gene peptidase 3 de caliceínas (*KLK3*), secretada pelas células epiteliais da próstata com função de liquefazer o sêmen. O método de diagnóstico baseado no PSA foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1994, que definiu em 4ng/mL seu limite superior normal. Contudo, a especificidade do PSA é limitada, sendo a biópsia positiva em somente 25% dos pacientes com concentrações séricas de PSA entre 2 e 10 ng/mL (TORRE et al., 2015).

Estudos demonstram que não existe relação entre os níveis de PSA e o desenvolvimento maligno da doença, pois embora o PSA seja uma enzima específica da próstata, não é marcador específico para o câncer. O aumento nos níveis de PSA pode ser explicado por outras condições que não o câncer, como prostatites, aumento nodular benigno (hiperplasia benigna), biópsias de próstata, medicamentos e cirurgias (HENDRIKS; VAN OORT, SCHALKEN, 2017).

Devido a essa carência de especificidade, o PSA não proporciona aos pacientes uma redução substancial nos índices de mortalidade. Os níveis elevados de PSA podem sugerir tratamento de casos de CaP que não comprometeriam a qualidade de vida do paciente. As preocupações acerca da triagem de CaP baseada no ensaio de PSA decorrem, em grande parte, do alto grau de super-diagnóstico e consequências causadas pelos procedimentos cirúrgicos ou farmacológicos, sem a real necessidade, pois se trata de um tumor indolente, de evolução lenta que não iria interferir na qualidade de vida dos pacientes (HAMDY et al., 2016).

Embora seja compreendida a baixa especificidade do PSA em distinguir os diferentes graus de alterações prostáticas, ele é o biomarcador mais utilizado até o momento (SAINI, 2016) pois a quantificação desta enzima é uma importante ferramenta para acompanhamento de progressão da doença e análise de recidiva do tumor e vigilância ativa (VA).

O objetivo da VA é reduzir o tratamento excessivo em pacientes com o tumor confinado e de baixo risco, sem descartar tratamento curativo caso o paciente apresente evolução do tumor (WELTY; COOPERBEG, CARROLL, 2014). De acordo com diferentes estudos, a VA mostra-se uma alternativa factível e segura comparada à intervenção radical imediata nos pacientes com tumores de baixo risco (KLOTZ et al., 2015). Embora as taxas de mortalidade ainda sejam

incertas, a conduta da vigilância reduz os efeitos adversos do tratamento radical e tem potencial de manter a qualidade de vida sem alterar as taxas de sobrevida câncer-específica (HALPERN et al., 2017).

Dados de estudos prospectivos sugerem que 41% a 80% dos homens submetidos a tratamento ativo (cirúrgico ou radioterápico) para tumores indolentes estariam sendo tratados desnecessariamente. Essa afirmação tem suporte em estudos que avaliaram os resultados clínicos de grupos de pacientes submetidos ao regime de VA, revelando sobrevida câncer-específica de 100% em 2 anos, 99,7% em 5 anos e 97,2% em 10 anos (KLOTZ et al., 2015; TOSOIAN et al., 2016).

Atualmente na prática clínica já estão disponíveis novos marcadores aprovados pelo FDA que podem ser obtidos a partir de amostras do sangue e urina. O Antígeno do Câncer de Próstata 3 (PCA3) aprovado pelo FDA em 2012, é um RNA não codificante de função desconhecida, altamente expresso em indivíduos com tumor maligno e com baixo nível de expressão em casos de aumento nodular benigno. É indicado quando o paciente apresenta suspeita de tumor, porém, com exames como biópsia, PSA e TR negativos (LOEB et al., 2016; SAINI, 2016). A desvantagem deste exame, é o desconforto proporcionado ao paciente em sua execução, pois é necessário massagem na próstata antes da coleta da urina para melhor sensibilidade do exame. A massagem é um procedimento importante, pois irá liberar as células epiteliais da próstata através do ducto prostático para o trato urinário, permitindo a quantificação da expressão de PCA3 (GEN-PROBE® 2010).

Em 2012 também foi aprovado pelo FDA o Índice de Saúde da Próstata (PHI), que consiste em um cálculo utilizando marcadores da próstata por meio da seguinte fórmula matemática:  $([-2] \text{proPSA}/\text{free PSA}) \times \sqrt{\text{PSA}}$ , onde:

- $[-2] \text{proPSA}$  = Precusores inativos de PSA, também chamados de p2PSA;
- Free PSA = PSA livre;
- PSA = PSA total;

Este índice permite distinguir as formas benignas das malignas da doença em homens com idade superior a 50 anos que não demonstram alterações no TR e nos níveis de PSA. Como resultado, os pacientes que têm mais risco ao CaP apresentam altos níveis de PSA e p2PSA, além de baixo nível de PSA livre. Dessa forma, é possível orientar os pacientes a fazerem ou não biópsia quando se tem níveis de PSA total entre 4 e 10 ng/mL, reduzindo, assim, biópsias desnecessárias. No entanto, este teste possui limitações, já que a secreção desta enzima pela próstata se dá tanto por células malignas quanto benignas (CULLEN et al., 2015).

O teste comercial *Confirm MDX* também já está disponível nos EUA e detecta alterações em tecidos histopatologicamente normais da próstata, baseado na presença de “campo de cancerização”, caracterizado por alterações epigenéticas. É detectada hipermetilação nos genes *GSTP1*, *APC* e *RASSF1*, que tem como objetivo complementar a rotina do exame histopatológico, diminuindo o número de repetição de biópsias (STEWART et al., 2013). O kit Prolaris (*Prolaris, Myriad Genetics Inc., Salt Lake City, UT, EUA*) é uma ferramenta prognóstica que irá avaliar a expressão de genes relacionados com a progressão do ciclo celular, utilizando um painel de 46 genes, constituído de 31 genes de progressão do ciclo celular e 15 genes *housekeeping*. Este teste tem como objetivo prever o risco de recidiva bioquímica e mortalidade por CaP localizado (SOMMARIVA et al., 2016).

Estudos vêm sendo realizados para se detectar novos marcadores para CaP, principalmente biomarcadores que sejam capazes de distinguir entre as formas indolentes e agressivas do tumor. Embora tenha evoluído o diagnóstico para CaP, os marcadores disponíveis atualmente na prática clínica ainda são de difícil acesso para a população devido ao alto custo e são marcadores observados a partir de testes invasivos como a biópsia por agulha, um procedimento doloroso para os pacientes, que não é livre de complicações. Em consequência disso, existe um grande interesse na aplicação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) para prognóstico dos pacientes com CaP, tendo em vista que podem ser futuros marcadores prognósticos com um protocolo fácil de realizar, seguro, eficaz e com baixas taxas de complicações.

### 2.2.3 Polimorfismos Genéticos

Ao se comparar a sequência genética de diferentes indivíduos em relação ao mesmo cromossomo, é possível notar que grande parte dela é completamente similar para todos os indivíduos de uma mesma espécie. No entanto, também é evidente que algumas sequências de nucleotídeos variam de um indivíduo para outro. Os seres humanos do mesmo sexo compartilham aproximadamente 99% de sua sequência genética, o que permite aos estudiosos moleculares trabalharem com uma única sequência de referência, onde pequenas variações genômicas fundamentam a variabilidade fenotípica interindividual (GRIFFITS et al., 2016).

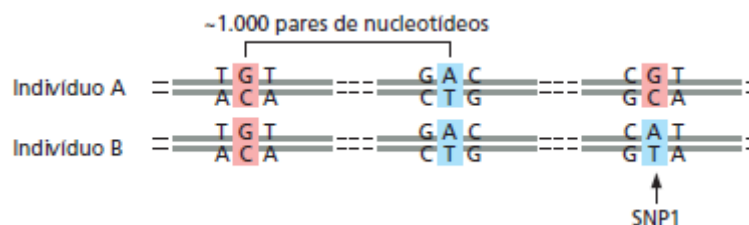
Polimorfismos são mutações na sequência de DNA que podem ser encontradas em toda a sequência genômica dos eucariotos. A variante polimórfica deve estar presente em pelo menos 1% em uma determinada população para ser classificado como polimorfismo. Se a frequência for menor que 1%, a alteração é denominada somente mutação (BALDING, 2006). A maioria localiza-se em regiões intrônicas, ou seja, regiões não codificantes e, portanto, não alteram a

sequência da proteína. No entanto, se o polimorfismo no íntron estiver localizado em um sítio de *splicing*, ele pode alterar a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) ou da proteína que vai ser produzida a partir deste mRNA. Os polimorfismos localizados nas regiões codificantes como a promotora e exônica podem alterar diretamente a expressão do gene. Dessa maneira, as referidas diferenças na sequência gênica, denominadas polimorfismos genéticos, podem ser utilizadas como marcadores moleculares. Os dois principais polimorfismos genéticos presentes nos seres humanos são os polimorfismos de comprimento de sequência simples e os SNPs (JANG et al., 2013; GRIFFITS et al., 2016).

Além desses, também são considerados polimorfismos as duplicações, inserções e deleções que são herdadas dos parentais, e as sequências de nucleotídeos repetidas que são particularmente propensas a novas mutações. A diferença no número de cópias repetidas é utilizada principalmente para identificação de indivíduos pela análise de DNA em investigações criminais, confirmação de paternidade, entre outras aplicações forenses (CHASMAN; ADAMS, 2001).

Os SNPs representam uma variação na sequência de DNA quando apenas um único nucleotídeo (A, T, C ou G) é trocado na sequência do gene (Figura 5). Dois genomas escolhidos ao acaso na população mundial diferirão por aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  SNPs que são dispersos no genoma. Visto que este tipo de polimorfismo tem alta densidade, eles são utilizados como marcadores genéticos e podem associar-se a uma característica específica, sendo usados principalmente para estudar a suscetibilidade a doenças e as diferenças entre indivíduos quanto a insensibilidade a algumas drogas e tratamentos (GIBSON, 2009).

**FIGURA 5** - Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) - sítios no genoma onde duas ou mais variantes de um nucleotídeo são comuns na população



Fonte: Alberts et al., (2017)

Devido à sua frequência e distribuição no genoma, os SNPs já estudados estão disponíveis em diversos bancos de dados, entre eles o SNP500Cancer que fornece a sequência

e o genótipo de SNPs utilizados para mapear doenças complexas como o câncer (PACKER et al., 2004). Até o presente momento, diferentes estudos já demonstraram relação entre SNPs e risco de CaP, ressaltando que são clinicamente relevantes como fatores que determinam a suscetibilidade ao câncer (JANG et al., 2013), o prognóstico (PU et al., 2012) e resposta ao tratamento (LINDSTROM et al., 2007).

Os pacientes com tumores metastáticos apresentam variação na resposta aos tratamentos à base de hormônio. Um passo importante para desvendar a heterogeneidade clínica observada nos indivíduos com CaP é por meio da descoberta de alterações moleculares, que permitirão compreender as variações que ocorrem neste tumor (BELTRAN; RUBIN, 2013).

#### 2.2.4 Genes candidatos a biomarcadores para câncer de próstata

Considerando o importante papel que os polimorfismos genéticos têm apresentado como biomarcadores em diversos tipos de doenças, foram escolhidos alguns genes para a avaliação de SNPs candidatos à suscetibilidade e prognóstico ao CaP, que estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2** - Genes, localização cromossômica e variantes avaliados no presente estudo

Genes	Cromossomo	Localização	SNP	Substituição
<i>PTEN</i>	10q23.3	Íntron	rs2735343	(C>G)
<i>PI3K</i>	3q26.3	3' UTR	rs2699887	(G>A)
<i>AKT1</i>	14q32.33	5' UTR	rs2494750	(C>G)
<i>AR</i>	Xq11.12	Promotor	rs17302090	(G>A)
<i>AMACR</i>	5p13.3	Éxon 1	rs3195676	(G>A)

Fonte: Próprio autor (2017)

Os três primeiros genes da Tabela 2, consistem do supressor tumoral *PTEN* e dos proto-oncogenes *AKT1* e *PI3K*. Estes genes atuam em vários processos implicados no câncer, incluindo o crescimento, proliferação, sobrevivência e metabolismo celular (VIVANCO; SAWYERS, 2002).

Os andrógenos desempenham um papel importante no câncer de próstata. Como suas equivalentes normais, o crescimento e a sobrevivência das células de CaP dependem de andrógenos, que se ligam aos seus receptores (*AR*) e induzem a expressão de genes pró-crescimento e inibidores de apoptose (HEINLEN; CHANG, 2004; CRONA; MILOWSKY, WHANG, 2015).

O gene *AMACR* foi escolhido pois codifica uma enzima mitocondrial e peroxissomal com papel chave na beta-oxidação de ácidos graxos de cadeia ramificada e ácidos biliares. O metabolismo dos ácidos graxos resulta em produção de espécies reativas de oxigênio, que

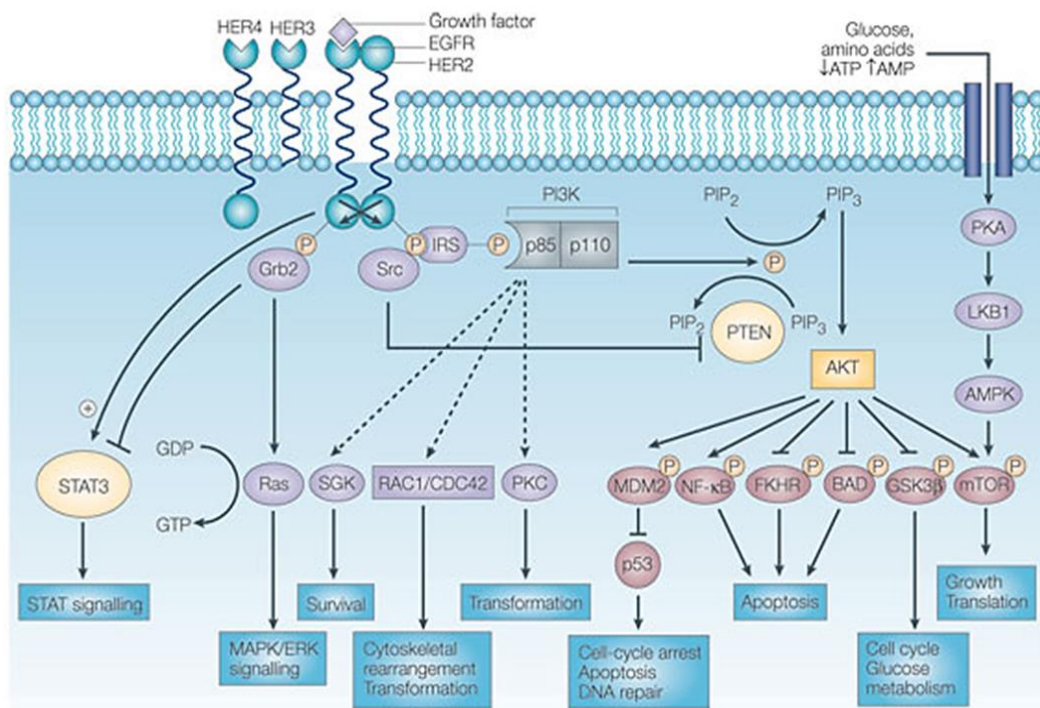
podem levar a danos no DNA, sendo que em pacientes com CaP agressivo o gene *AMACR* encontra-se superexpresso, contribuindo para o prognóstico e diagnóstico deste tumor (WRIGHT et al., 2011). O consumo de carne vermelha, principal fonte de ácidos graxos, é um dos fatores de risco para CaP.

#### Via de sinalização dos genes *PTEN-PI3K-AKT1*

Essa via é uma das cascatas de quinases mais importantes associadas à fisiologia celular, com diferentes funções em fases do ciclo celular, diferenciação, adesão, migração celular, sobrevivência e inibição da apoptose (Figura 6) (CRUMBAKER; KHOJA, JOSHUA, 2017; LIN et al., 2015).

A ativação da proteína PI3K depende da sinalização de fatores de crescimento, e após ativada, esta proteína fosforila o fosfolipídio PIP2 transformando-o em PIP3, um segundo mensageiro. A proteína de sinalização intracelular AKT se liga ao PIP3 via o domínio de interação específico de homologia à proteína pleqstrina (PH). Assim, a proteína AKT, tem uma função-chave na promoção da sobrevivência e no crescimento de muitos tipos celulares (LUO et al., 2003; ZHU et al., 2016).

**Figura 6** – Importância das vias de sinalização dos genes *PTEN-PI3K-AKT* e vias relacionadas para vários processos celulares



Fonte: Hennessy et al., (2005)

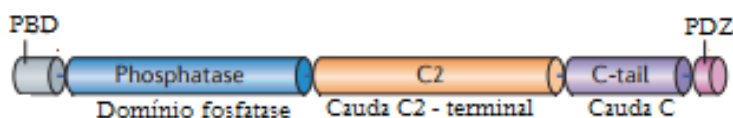
O gene *PTEN* codifica uma proteína de mesmo nome que possui atividade na regulação negativa do processo de sinalização de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e AKT, cuja forma ativa proporciona um importante controle no crescimento, proliferação celular e apoptose. A proteína PTEN mantém os níveis de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3) baixos, removendo o 3º grupo fosfato e convertendo-o em fosfatidilinositol (3,4,5)-difosfato (PIP2). As mutações na PTEN são encontradas em muitos tipos de cânceres: elas promovem crescimento celular descontrolado, porque prolongam a sinalização pela PI3K. (LUO et al., 2003; ZHU et al., 2016) (Figura 6).

### Gene *PTEN*

A proteína PTEN é uma fosfatase que pode atuar nos substratos como polipeptídeos e fosfoinosítídeos; contém um domínio tirosina fosfatase com característica que se assemelha às fosfatases específicas dual, que são capazes de desfosforilar tanto resíduos de serina/treonina como tirosina. Apesar dessa especificidade dual, o principal substrato da PTEN é o lipídeo PIP3 presente na membrana plasmática (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000).

A proteína PTEN possui 403 aminoácidos. É composta por cinco domínios funcionais: domínio de ligação a PIP2 (PBD); domínio catalítico fosfatase; domínio C2, responsável pela ligação na membrana e desfosforilação de PIP3; uma região caudal C-terminal com 50 aminoácidos, que possui domínios PEST e um domínio de ligação PDZ, região onde proteínas regulatórias irão se ligar e também região que vai se ligar à membrana plasmática (JANG et al., 2013).

**Figura 7** - Estrutura da proteína PTEN indicando suas respectivas regiões



PBD: região N-terminal - domínio de ligação a PIP2 e domínio de fosfatase; C2: Região C-terminal e PDZ: final - motivo de interação com proteínas regulatórias.

**Fonte:** Molinari; Frantini, (2014)

O gene *PTEN* (do inglês *Phosphatase and Tensin Homologue*), também conhecido como *MMAC1* (*mutated in multiple advanced cancers*) está mapeado no cromossomo 10q23.3

e sua função de supressor tumoral depende somente de sua capacidade de fosfatase lipídica (WORBY; DIXON, 2014). A inativação de um gene supressor tumoral é um processo realizado por diferentes mecanismos, como deleção, mutação, silenciamento epigenético, atividade anormal de microRNAs e *splicing* aberrante (INOUE; FRY, 2017).

Embora a perda completa de genes supressores tumorais seja comum nos cânceres humanos, conforme previsto pela hipótese de Knudson, diversos estudos demonstraram que um processo incompleto, denominado "haploinsuficiência", ou seja, a perda de um único alelo, em alguns supressores tumorais, incluindo o *PTEN*, contribui para o desenvolvimento e progressão de muitos tipos de câncer (KNUDSON, 1971).

O SNP do gene *PTEN* rs2735343 localiza-se em região não codificante (íntron) e resulta em uma troca C>G. Não altera o aminoácido codificado mas pode influenciar na expressão da proteína, no *splicing* e interferir na regulação do ciclo celular, acarretando no desenvolvimento tumoral (JANG et al., 2013). Este polimorfismo foi associado ao aumento significativo de risco de carcinoma epidermóide de esôfago nos pacientes que possuíam o genótipo GG ou o alelo G (JANG et al., 2013). Wang et al. (2016) demonstraram que este SNP aumenta a eficácia da radioterapia e a sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão e portadores do alelo G, sugerindo que este SNP pode ser utilizado como biomarcador para acompanhamento e tratamento individualizado de pacientes com este e outros tipos de câncer.

Devido à função de supressor tumoral, a perda de função do gene *PTEN* resulta na sinalização alterada da via. É um evento bastante reconhecido na iniciação e desenvolvimento do CaP. O rs2735343 parece não ter sido associado anteriormente com CaP, mas foi associado a um pior prognóstico para câncer epidermóide de células escamosas de esôfago (JANG et al., 2013; MA et al., 2012). A ocorrência de perda de função do *PTEN* é maior na doença metastática agressiva, o que permite utilizar este gene como biomarcador prognóstico e de suscetibilidade, para distinguir tumores indolentes daqueles que tendem a ser mais agressivos (WISE; HERMIDA, LESLIE, 2017).

### Gene *PI3K*

As PI3Ks constituem uma família de quinases lipídicas e possuem atividade anabólica e catabólica na célula por meio da capacidade de fosforilar os fosfoinosítídeos na posição 3'OH do anel de inositol. Estas proteínas são categorizadas em três classes (I - III) de acordo com suas preferências por substrato e homologia de sequência. As PI3Ks classe I são as mais relevantes para os cânceres e são divididas em duas subclasses: IA (PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$ ) e IB (PI3K $3\gamma$ ) (WANG et al., 2016).

As PI3Ks formam heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade reguladora (p85). A subclasse IA é ativada por receptores de tirosina quinase e a subclasse IB é ativada por receptores acoplados às proteínas-G. O receptor de fator de crescimento tirosina quinase ativa a PI3K através de proteínas adaptadoras. Estas proteínas adaptadoras se ligam ao domínio amino-terminal das subunidades reguladoras p85 por meio de motivos YXXM para reverter a inibição da subunidade catalítica p110 e levam ao movimento do heterodímero p85 - p110 para a membrana, onde p110 pode fosforilar PIP2 em PIP3. Em seguida, PIP3 recruta um subconjunto de proteínas de sinalização com domínio de homologia à proteína plectrina (PH) para membrana plasmática, incluindo PDK1/AKT (ZHANG et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

O gene *PI3K* quando mutado foi relatado por influenciar na tumorigênese e no desenvolvimento neoplásico, atuando como um oncogene. Localiza-se no cromossomo 3q26.3 e produz uma proteína denominada fosfatidinositol 3 quinase (PI3Ks) (WANG et al., 2016).

O SNP do gene *PI3K*, rs2699887, localiza-se na região 3' *UTR*, conferindo uma troca G>A que não altera o aminoácido. Há relatos de que este polimorfismo influencia vários tipos de cânceres como câncer de mama (LI et al., 2017), endométrio (WANG et al., 2012), colorretal (LIN et al., 2015) e câncer de pulmão de células não pequenas (WANG et al., 2016; LI et al., 2013); no entanto, a associação deste polimorfismo com CaP ainda não foi investigada.

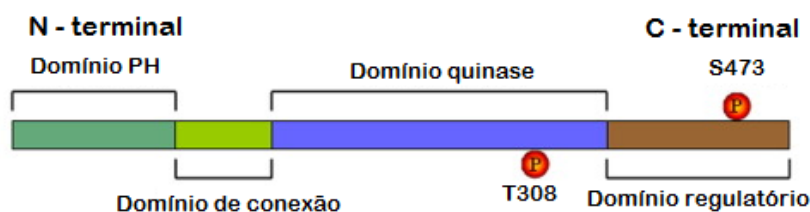
Em pacientes com câncer de pulmão que portavam este polimorfismo e recebiam quimioterapia a base de platina, foi encontrado pior prognóstico e muitos efeitos adversos ao tratamento associados à superexpressão deste gene (PU et al., 2010). Posteriormente Wang et al. (2016) estudando o mesmo tipo de tumor, demonstraram que os pacientes com genótipo heterozigoto para este polimorfismo apresentavam maior taxa de sobrevida e melhor resposta aos tratamento de radio-quimioterapia. Li et al. (2015) encontraram associação dos genótipos heterozigoto e homozigoto raro deste polimorfismo com alto risco de metástase cerebral também em pacientes com câncer de pulmão.

Tendo em vista a importância deste gene na sinalização da via *PI3K/AKT* e sua expressão na próstata, é importante delinear o papel deste polimorfismo, o que pode auxiliar na melhor compreensão do prognóstico e na suscetibilidade ao CaP.

### Gene *AKT1*

A proteína AKT é uma quinase serina/treonina com 58 kDA, que possui três domínios: um PH N-terminal, um catalítico quinase central e um regulador curto C-terminal (Figura 8).

**Figura 8** - Estrutura da proteína AKT indicando suas respectivas regiões



Domínio PH: característico de homologia de pleqstrina na região n- terminal; domínio quinase e domínio regulador c-terminal.

Fonte: Zhang et al. (2015)

Existem três isoformas desta proteína descritas em mamíferos, *PKB $\alpha$* , *PKB $\beta$*  e *PKB $\gamma$*  que são codificadas, respectivamente, por genes distintos *AKT1*, *AKT2* e *AKT3*. As proteínas codificadas por estes genes possuem alta homologia em nível de aminoácidos e são ativadas através de dois eventos principais de fosforilação (CICCARESE et al., 2016).

A AKT é parcialmente ativada através de uma fosforilação inicial na treonina 308 pelo domínio de quinase PDK-1 e S473 pelo complexo mTOR, o que aumenta sua atividade quinase. A proteína AKT ativada desloca-se da membrana plasmática para o citoplasma e o núcleo, onde irá atuar nos mecanismos de fosforilação, ativação de outras vias ou suprimir muitos alvos a jusante para regular várias funções celulares (MOHLER et al., 2012).

Como citado acima, a AKT desempenha importante função em diversas vias relacionadas à tumorigênese, portanto, estudos têm demonstrado que SNPs no gene *AKT1* podem alterar a sua expressão e/ou a função da proteína, modificando assim, a suscetibilidade ao câncer, desempenhando um papel importante na patogênese do tumor. *AKT1* é um subtipo de AKT e desempenha um papel importante na sobrevivência da célula por meio de sua atividade anti-apoptótica. A superexpressão desta proteína está relacionada com progressão do CaP e recidiva do tumor (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

O gene *AKT1*, localizado na região 14q32.3, é um proto-oncogene que atua na viabilidade e proliferação celular, exercendo função principalmente na inibição de apoptose, promoção da célula no ciclo celular e na diferenciação celular. Dentre as funções da proteína AKT, ela atua no metabolismo da glicose, angiogênese, *splicing* e outras funções nucleares importantes, como a condensação de cromatina e ativação de várias vias celulares (HERS; VINCENT, TAVARÉ, 2011).

Recentemente têm sido relatados vários polimorfismos em *AKT1* associados com risco de desenvolver diferentes tipos de tumores com destaque para o SNP rs2494750. Localizado na

região 5' UTR do gene, este SNP é caracterizado pela troca de G > C. Esse polimorfismo foi associado a vários tipos de doenças como Alzheimer, câncer esofágico escamoso e câncer endometrial (FELDMAN; FELDMAN, 2001). No entanto, poucos estudos foram realizados em CaP.

Karyadi et al. (2015) demonstraram que em chineses portadores do genótipo GG, a mortalidade em pacientes com CaP aumentou significativamente. Fallah et al. (2015) não encontraram associação deste SNP com câncer de endométrio. Esses resultados controversos despertam interesse na realização de mais estudos para verificar a associação deste polimorfismo com CaP em outras populações.

### Gene AR

Os andrógenos são os principais hormônios esteroides masculinos, responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo masculino durante a embriogênese e pela maturação sexual na puberdade. Durante a fase adulta, os andrógenos permanecem essenciais para reprodução, além de possuírem uma ação em tecidos como pele, ósseo, muscular e adiposo. Como consequência, alterações na produção ou ação dos andrógenos podem influenciar diferentes órgãos com um grau de gravidade variável, que vai desde síndromes de insensibilidade aos andrógenos até CaP (HEEMERS; TINDALL, 2007).

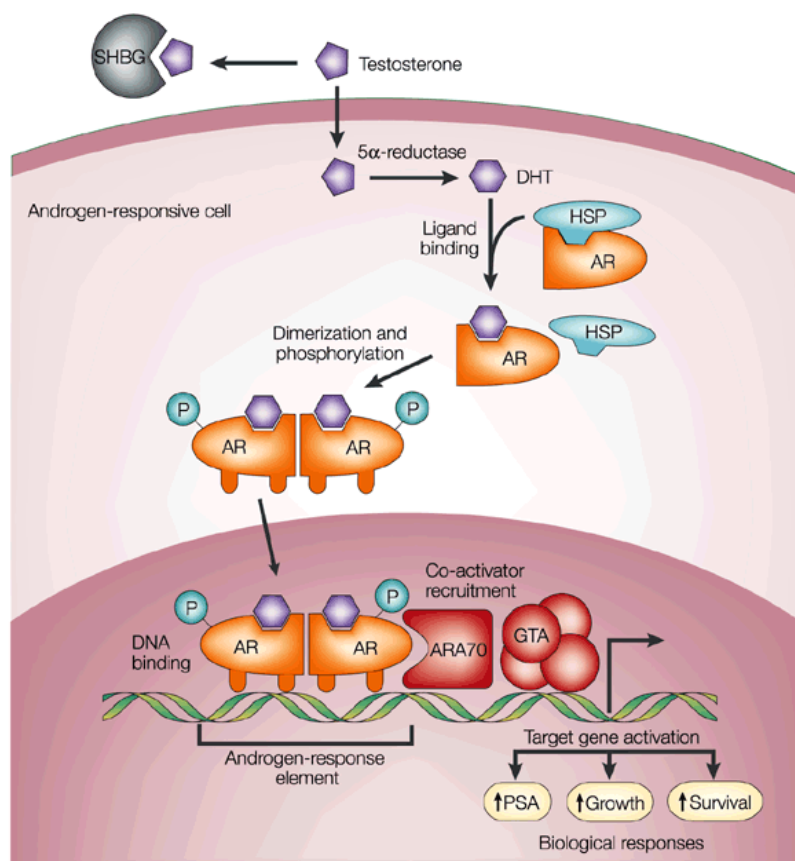
O receptor de andrógeno (AR) possui importante papel no crescimento e diferenciação da próstata normal, mas também é responsável pelo desenvolvimento e progressão do CaP. A função do AR é regular a expressão gênica quando ligado a hormônios como testosterona e di-hidrotestosterona (DHT) (LONERGAN; TINDALL, 2011).

A testosterona é secretada principalmente pelos testículos, sendo que uma pequena porcentagem é formada pela conversão periférica de esteroides adrenais. É o esteroide prevalente na corrente sanguínea, onde é ligado à albumina e globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG), com uma pequena fração livre no soro. Quando a testosterona livre entra nas células da próstata, 90% é convertida em DHT pela enzima 5-alfa redutase. A forma DHT possui cinco vezes mais afinidade com AR do que a testosterona, fazendo uma ligação mais forte e mais estável com o receptor de andrógeno (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

A ativação do receptor AR ocorre quando o androgênio se liga a ele, decorrendo uma alteração na conformação do receptor que se dissocia das proteínas HSPs (*Heat-shock proteins*), resultando na fosforilação do receptor e em sua dimerização. O dímero ativado se transloca do citoplasma para o núcleo onde, junto com o complexo-hormônio-receptor, se liga a um elemento de resposta a andrógeno (ARE) nas regiões promotora e potenciadora, levando

à transcrição de genes de interesse e contribuindo para codificar proteínas relacionadas ao crescimento, proliferação e sobrevivência celular (Figura 9) (CRONA; MILOWSKY, WHANG, 2015).

**Figura 9 - Ação do andrógeno**



A testosterona circula no sangue ligada à albumina (não mostrado) e SHBG. A testosterona livre entra nas células da próstata, é convertida em DHT que se liga ao AR, induzindo a dissociação de HSPs e fosforilação do receptor. O AR se dimeriza e se liga a elementos de resposta ao androgênio nas regiões promotoras dos genes alvo. Co-ativadores (como ARA70) e co-repressores (não mostrados) também se ligam ao complexo AR facilitando ou prevenindo, respectivamente, sua interação com o GTA. A ativação (ou repressão) dos genes-alvo leva a respostas biológicas, incluindo crescimento, sobrevivência e produção de PSA; **SHBG**: Globulina carreadora de hormônios sexuais; **DHT**: di-hidrotestosterona; **HSP**: Heat-shock proteins; **ARA70**: co-ativadores; **GTA**: aparato geral de transcrição; **AR**: receptor de andrógeno; **PSA**: antígeno prostático específico.

**Fonte:** Feldman; Feldman, (2001)

Na ausência desses andrógenos ligados, o AR é sequestrado por proteínas chaperonas no citoplasma, como por exemplo HSP90, e permanece inativado; porém, esta estrutura ainda possui afinidade pelo ligante. Se em algum momento ocorrer a ligação do andrógeno na região LBD do AR, fosforila o receptor e ocorre a dimerização. A partir da ligação do complexo AR-hormônio ocorre uma sequência de eventos celulares que resultam na translocação do AR para

dentro do núcleo e o receptor atuará na transcrição de genes alvos (CRONA; MILOWSKY, WHANG, 2015).

Deste modo, apesar dos hormônios por si só não induzirem alteração maligna na próstata, a ação do andrógeno e do estado funcional do gene *AR* são importantes mediadores da progressão da carcinogênese na próstata (HEINLEIN; CHANG, 2004).

O gene *AR*, localizado no cromossomo X (Xq11-12), codifica o receptor de andrógeno que é um fator de transcrição nuclear na superfamília do receptor de hormônio esteroide. A estrutura desta proteína é semelhante ao receptor de estrógeno e progesterona; contém 8 éxons, tendo cada um funções distintas e quatro domínios funcionais conservados: (I) um domínio N-terminal (NTD) que é relativamente longo, apresenta uma maior variabilidade de sequências entre os receptores nucleares e é responsável pela regulação transcricional (codificado pelo éxon 1); (II) o domínio de ligação ao DNA (DBD), codificado pelos éxons 2 e 3, (III) uma região “dobradiça” que contém uma sequência de localização nuclear codificada pelo éxon 4 e (IV) o domínio de ligação do ligante (LBD) codificado pelos éxons 5 a 8 (FELDMAN; FELDMAN, 2001).

O SNP rs17302090 está mapeado na região -9586 do promotor do gene *AR*. Este SNP (genótipo A) parece proporcionar pior prognóstico aos pacientes que fazem tratamento à base de hormônio, levando a óbito por CaP (LINDSTROM et al., 2007). Lindström et al. (2006) encontraram proteção para CaP em indivíduos suecos portadores do alelo A. O mesmo grupo de estudo em 2007 não encontrou associação entre o SNP rs17302090 com CaP e com os parâmetros escore de Gleason, estadiamento do tumor e níveis de PSA. Posteriormente Sun et al. (2010) avaliaram o polimorfismo rs1204038, que tem um forte desequilíbrio de ligação com o polimorfismo 17302090 e não encontraram associação com agressividade em CaP, propondo então que este SNP atua, provavelmente, como um modificador de efeito hormonal.

#### Gene *AMACR*

A *AMACR* é uma enzima peroxissomal e mitocondrial que está envolvida na biossíntese e beta-oxidação de ácidos graxos provenientes da dieta (LI et al., 2014; WRIGHT et al., 2011). O metabolismo dos ácidos graxos representa um processo chave que influencia várias vias e características celulares, incluindo sinalização da célula, processamento energético, fluidez da membrana, entre outros (LIU et al., 2006).

A beta-oxidação de ácidos graxos é a reação de oxidação mais proeminente para os ácidos gordurosos e ocorre tanto nos peroxissomos como nas mitocôndrias. É necessário que a *AMACR* catalise o éster acil-COA de cadeia ramificada (R) na forma de esteroisômero S

(processo de racemização) e somente a forma S pode servir como substrato para acil-CoA de cadeia ramificada durante a subsequente oxidação beta-peroxissomal. A beta-oxidação peroxissômica não contribui diretamente para produção de energia, mas é necessária para a oxidação inicial de ácidos graxos de cadeia muito longa, ácidos graxos de cadeia ramificada, intermediários de ácido biliar e outros derivados de ácido graxo que não são oxidados pela mitocôndria (LEE et al., 2013; WRIGHT et al., 2011).

Estudos epidemiológicos demonstraram que carne vermelha e produtos lácteos são ricos em ácido fitânico e são as principais fontes de ácido graxo de cadeia ramificada. Quando a AMACR metaboliza os ácidos graxos, o primeiro substrato que ela produz é o ácido fitolítico que pode aumentar a expressão de AMACR em células da próstata humana. Além disso, o metabolismo de ácido fitânico resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, que podem levar a danos no DNA. Finalmente, o ácido fitânico e seus metabólitos se ligam a receptores de hormônios nucleares (RARs) e o receptor ativado na proliferação dos peroxissomos (PPAR $\alpha$ ), que foram associados ao risco elevado de CaP (LEE et al., 2013; WRIGHT et al., 2011).

A acetil-CoA é a precursora de todos os átomos de carbono presentes no colesterol (C<sub>27</sub>) e o agente redutor é o mesmo da síntese de ácido graxos, ou seja, NADPH. As enzimas que catalisam a síntese de colesterol localizam-se no citosol e no retículo endoplasmático. O colesterol, além de ser um componente estrutural de membranas, é precursor dos ácidos biliares, oxisteroides, hormônios esteroides e da vitamina D. A síntese de hormônios esteroides inicia-se com a hidroxilação da cadeia lateral do colesterol, catalisada por um citocromo P<sub>450</sub> mitocondrial, com participação do NADPH e O<sub>2</sub> (LEHNINGER et al., 2011).

Na próstata a análise enzimática de AMACR é reconhecida como um marcador de tecido tumoral, pois já foi demonstrado que essa proteína pode diferenciar casos benignos de malignos e é utilizada na prática clínica para diagnóstico concomitante com outros testes clínicos (MARTIN et al., 2012).

Até o presente momento não foi demonstrado em que fase do desenvolvimento tumoral a AMACR está envolvida: início, progressão ou mecanismo regulador. No entanto, dados *in vitro* mostraram que esta enzima é importante para o crescimento prostático independente de androgênio. Apesar da comprovada importância deste gene no CaP, mecanismos genéticos e epigenéticos que levam à superexpressão dele ainda não foram elucidados (PAINTER et al., 2016).

A alfa-metil-coenzima A racemase (AMACR) composta por 382 aminoácidos é codificada pelo gene AMACR também conhecido como *P504S* localiza-se no cromossomo

5p13.3 e é expressa em órgãos como rim, fígado, glândulas salivares, vesícula biliar e próstata (LEE et al., 2013; WRIGHT et al., 2011).

O SNP rs3195676, presente no éxon 1 deste gene, é uma variante que sofreu alteração do alelo G>A no códon 9, resultando na substituição de valina por metionina. Pesquisas foram realizadas com o objetivo de correlacionar este polimorfismo à suscetibilidade e prognóstico do adenocarcinoma prostático. Lee et al. (2013) mostraram aumento de risco em um grupo de coreanos com CaP que apresentavam escore de Gleason  $\geq 7$  e  $\geq$  pT2c e portavam o alelo G.

Em vista do exposto, podemos sugerir que os SNPs nos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR*, *AMACR (P504S)* podem apresentar influência no prognóstico e suscetibilidade do CaP, e serem utilizados como biomarcadores para prever o curso clínico do tumor.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Identificar novos marcadores moleculares genéticos de suscetibilidade e prognóstico para o câncer de próstata.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para avaliar a possível associação entre variantes polimórficas dos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *P504S (AMACR)* e *AR* com a proteção e suscetibilidade ao câncer de próstata.
- Correlacionar os dados do estudo de associação com os parâmetros clínico (PSA) e histopatológicos (escore de Gleason, extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, invasão perineural, bilateralidade), avaliando o potencial de algumas dessas variantes como marcadores moleculares de agressividade e progressão de tumor.

#### 4. MANUSCRITO

Associação dos polimorfismos nos genes *PTEN*, *AKT1*, *PI3K*, *AR* e *AMACR (P504S)* em pacientes com câncer de próstata

Monyse de Nóbrega<sup>1</sup>, Marilesia Ferreira de Souza<sup>1</sup>, Milene Roldão de Souza<sup>1</sup>, Heloísa Lizotti Cilião<sup>1</sup>, Paulo Emilio Fuganti<sup>2</sup>, Juliana Mara Serpeloni<sup>1</sup>, Ilce Mara de Syllos Cólus\*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Hospital do Câncer de Londrina, Paraná, Brasil.

\*Autor correspondente: Ilce Mara de Syllos Cólus

Tel: +55 43 33715149

Endereço de e-mail: ilcecolus@gmail.com

Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380, CEP: 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil.

## Resumo

Por ser uma doença heterogênea e multifatorial, o câncer de próstata (CaP) tem demandado a busca por métodos de triagem mais específicos para o prognóstico da doença. Com o objetivo de contribuir para isso, este estudo avaliou variantes polimórficas nos genes *PTEN* (rs2735343), *PI3K* (rs2699887), *AKT1* (rs2494750), *AR* (rs17302090) e *AMACR* (*P504S*) (rs3195676) como possíveis marcadores moleculares de suscetibilidade, prognóstico e progressão para o CaP em um estudo do tipo caso-controle e transversal. Amostras de sangue periférico foram obtidas de 277 pacientes submetidos a prostatectomia, com confirmação histopatológica do carcinoma. Os pacientes foram pareados com indivíduos controles de acordo com idade, ancestralidade, hábito etilista e tabagista. O critério de inclusão dos indivíduos controles foi apresentarem níveis de PSA inferiores a 2ng/mL e livres de câncer. As genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real usando sonda de hidrólise. A associação entre a ocorrência de CaP com as variantes polimórficas foi calculada por *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95%, obtida por regressão logística multivariada dos dados. Demonstraram associação com o proteção para a doença os genótipos dos genes (*AKT1*; p=0,041) assim como os genótipos associados dos genes (*AKT1+AR*; p=0,045). A combinação dos SNPs com os dados histopatológicos do tumor indicou associação das variantes alélicas de (*AMACR*; p=0,033 e 0,039) com proteção para invasão de vesícula seminal. Os polimorfismos combinados em pares foram associados com proteção para bilateralidade do tumor (*AKT1+AR*; p=0,042), (*PI3K+AR*; p=0,040) e para invasão de vesícula seminal (*AKT1+AR*; p=0,043), (*AKT1+AMACR*; p=0,015). As combinações dos genótipos (*PTEN+AMACR*; p=0,049) e (*PTEN+AR*; p=0,042) foram associadas a risco para extensão extracapsular. Os dados obtidos permitem inferir que os SNPs estudados dos genes *AKT1*, *AMACR* e *PI3K* estão associados a melhor prognóstico e a CaP não agressivo, enquanto que o SNP do gene *PTEN* está associado a pior prognóstico dos pacientes. Portanto, esses polimorfismos merecem novos estudos para serem confirmados como marcadores prognósticos para CaP.

**Palavras-chave:** SNP, parâmetros histopatológicos, prognóstico, gene *AKT1*, gene *PTEN*.

## Introdução

O câncer de próstata (CaP) é uma patologia heterogênea e multifatorial, que apresenta tumores indolentes ou muito agressivos e causa significativa morbidade na população masculina; em alguns países ainda apresenta alta taxa de mortalidade (GLOBOCAN, 2012; SAINI, 2016). Os métodos mais utilizados para prognóstico deste tipo de tumor é o estadiamento TNM e o escore de Gleason (VAIDYANATHAN et al., 2017). No entanto, as aplicações clínicas desses indicadores são limitadas. Estudos relatando associação de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) com diferentes doenças têm aumentado e estão sendo cada vez mais utilizados como marcadores associados a câncer, inclusive ao CaP. Em consequência disso, os SNPs receberam uma atenção considerável para serem utilizados como indicadores prognósticos pré e pós-tratamento de pacientes com CaP (QI et al., 2017).

Nas últimas décadas, diferentes SNPs foram associados com importantes vias celulares, incluindo a via de sinalização PI3K/PTEN/AKT (JANG et al., 2013), via de ação do andrógeno (PRENCIPE et al., 2015) e a via de metabolização de ácidos graxos (JIANG et al., 2013), tendo portanto, relação com o desenvolvimento de adenocarcinoma de próstata.

O gene *PTEN* é um supressor tumoral com especificidade dual e o seu principal substrato é o fosfatidilinositol (3,4,5) – trifosfato (PIP3). A proteína PTEN atua como antagonista na via PI3K/AKT, mantendo os níveis de PIP3 baixos. Quanto maior a concentração de PIP3, maior a sinalização da via PI3K/AKT, o que promove a progressão do ciclo celular, migração, metástase e inibição de apoptose. A ocorrência de perda de função do gene *PTEN* é maior na doença metastática agressiva, o que permite utilizar este gene como biomarcador de prognóstico para distinguir os tumores indolentes daqueles que tendem se tornar agressivos (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000; JANG et al., 2013; WISE; HERMIDA, LESLIE, 2017).

O gene *PI3K* é um proto-oncogene; a proteína homônima tem função de desfosforilar o fosfatidilinositol (3,4,5) – difosfato (PIP2) em PIP3. Tendo em vista a complexidade dessa cascata de sinalização intracelular e sua associação com o desenvolvimento do CaP, é importante delinear o papel de polimorfismos neste gene quanto ao prognóstico e a suscetibilidade para este câncer (TOREN; ZOUBEIDI, 2014).

O gene *AKT1* é um proto-oncogene cuja proteína tem função de regular eventos a jusante da via de transdução de sinal da PI3K. A proteína AKT1 desempenha um importante papel na viabilidade celular, proliferação, diferenciação e inibição de apoptose (VIVANCO; SAWYERS, 2002). A superexpressão deste gene está relacionada com diferentes tipos de

câncer e foi relacionada com progressão e recidiva bioquímica do tumor no CaP (KARYADI et al., 2015; FELDMAN; FELDMAN, 2001).

O gene *AR* codifica o receptor de andrógeno, um fator de transcrição nuclear que está envolvido no desenvolvimento, na manutenção e na regulação do sistema reprodutor masculino (FELDMAN; FELDMAN, 2001). Mutações no gene *AR* são associadas a uma série de doenças, como síndrome da insensibilidade aos andrógenos, até câncer de próstata (HEEMERS; TINDALL, 2007). Entre as mutações que acometem este gene, os SNPs são o tipo de alteração mais frequente e apenas uma simples troca de aminoácidos pode resultar tanto em um aumento da expressão como na perda de função do gene (SUN et al., 2010; WRIGHT et al., 2011).

A enzima peroxissomal e mitocondrial, alfa-metil-coenzima A racemase (*AMACR*), é codificada pelo gene *P504S (AMACR)* e está envolvida na biossíntese e beta-oxidação de ácidos graxos provenientes da dieta (LI et al., 2014). O metabolismo de ácidos graxos representa um processo chave que influencia diferentes vias e características celulares, incluindo sinalização celular, processamento energético, fluidez da membrana, entre outros (LIU et al., 2006).

Tendo em vista que a maioria dos casos de CaP são indolentes, busca-se marcadores que permitam classificar o grau de agressividade do tumor e individualizar o tratamento, de acordo com as características genéticas de cada paciente. Nesse sentido, no presente trabalho foram realizados estudos de associação do tipo caso-controle para avaliar a possível associação entre as variantes polimórficas dos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *P504S (AMACR)* e *AR* com a suscetibilidade ao câncer de próstata. Também foram correlacionados os dados do estudo de associação com os parâmetros clínicos dos pacientes e histopatológicos dos tumores a fim de se estabelecer marcadores moleculares de prognóstico ao CaP.

## **Materiais e Métodos**

### **Casuística**

Foram estudados 554 indivíduos do sexo masculino, sendo 277 indivíduos livres de CaP (controles) e com nível de PSA menor que 2ng/mL, e 277 pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de próstata (CaP), confirmado por análise histopatológica. Os atributos de exclusão foram homens submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia. Os pacientes foram pareados com controles na proporção 1:1 quanto à idade ( $\pm 5$  anos), ancestralidade (euro-descendentes e afrodescendentes), hábitos (tabagista e etilista). Amostras de sangue periférico de pacientes e controles foram coletadas no CISMENPAR (Consórcio Intermunicipal de Saúde

do Médio Paranapanema-PR), Irmandade Santa Casa de Londrina e Universidade Estadual de Londrina (UEL), Hospital do Câncer de Londrina, Paraná, Brasil, no período de 2006 a 2015.

Os controles e pacientes voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam um questionário baseado em Carrano; Natarajam, (1988). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEPE/UEL 176/2013).

### **Extração de DNA genômico**

A partir dos sangues periféricos coletados em tubos de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foi extraído o DNA utilizando-se o kit comercial *High Pure PCR Template Preparation* (Cat. 11796828001; Roche®; IN, USA), seguindo as orientações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por meio de espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA*). A absorvância nos comprimentos de onda de 260/280 nm foi utilizada para determinar a pureza do ácido nucleico, sendo consideradas puras as amostras com razão entre 1,8 e 2,0.

### **Genotipagem dos genes *PTEN*, *AKT1*, *PI3K*, *AR* e *P504S* (*AMACR*)**

Para cada gene selecionado para o presente estudo foi definido um SNP escolhido nos bancos de dados públicos (Database of Single Nucleotide Polymorphisms/NCBI, 2016): *PTEN* (rs2735343), *AKT* (rs2494750), *PI3K* (rs2699887), *AR* (rs17302090) e *P504S* (*AMACR*) (rs3195676).

Os genótipos foram determinados por análise molecular por meio da técnica de PCR em tempo real utilizando sonda de hidrólise (sistema TaqMan® Applied Biosystemns®, Foster City, Califórnia, EUA). As reações continham Genotyping *Master mix* (*Applied Biosystems*), 5 ng/mL de DNA e a sonda específica para cada gene. As quantidades de reagentes e a ciclagem foram realizadas de acordo com recomendações do fabricante.

### **Análise Estatística**

O teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para determinar se as distribuições dos genótipos nos controles e pacientes estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As associações entre os genótipos estudados com os parâmetros sócio culturais obtidos, a partir dos questionários, foram realizadas por análise de regressão logística univariada.

A análise da associação dos polimorfismos estudados com suscetibilidade ao CaP foi dada pela relação dos genótipos prevalentes, heterozigotos e raros entre os indivíduos controles e pacientes. Para essa avaliação foi utilizado o cálculo de *Odds Ratio* – OR (razão de risco) e intervalo de confiança de 95% utilizando o *software* SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA). A partir das informações do questionário respondido pelos indivíduos do estudo, foi feita análise estatística univariada. Os parâmetros que apresentaram nesta análise valores de  $p < 0,05$  foram histórico familiar de câncer, histórico familiar de câncer de próstata e escolaridade. Estes parâmetros foram utilizados para ajustar o modelo multivariado, onde os genótipos foram avaliados quanto a possível associação com CaP.

Os diferentes genótipos dos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* e *AMACR* foram avaliados frente a parâmetros histopatológicos (escore de Gleason, bilateralidade, invasão de vesícula seminal, invasão perineural, invasão de linfonodos e extensão extracapsular) e parâmetro clínico (PSA), empregando o teste de OR (Tabela 4; Apêndice 2). As análises foram realizadas utilizando-se o *software* SPSS 20.0.

## Resultados

A amostra total foi composta de 554 homens, na qual 85,6% eram euro-descendentes e 14,4 afro-descendentes; A média de idade dos pacientes foi  $65,38 \pm 7,18$  anos e dos controles  $63,65 \pm 8,21$  anos. Nos dois grupos, 68 indivíduos (24,5%) e 209 (75,5%), respectivamente, tinham hábito tabagista e não tinham este hábito. Quanto ao hábito etilista, 141 (50,9%) consumiam bebida alcoólica e 136 (49,1%) não.

As frequências genotípicas estavam em equilíbrio de Hardy Weinberg, com nível de significância 5%. Na análise estatística univariada foram observadas diferenças significativas entre os grupos de pacientes e controles quanto à presença de histórico familiar de câncer (58,8% dos pacientes possuíam pelo menos um parente de primeiro grau afetado), para histórico de CaP na família (34,8% declararam histórico familiar para este tipo de tumor) e ao grau de escolaridade (entre os analfabetos, 22,0% tinham CaP e 9,7% não apresentavam a doença). Outros parâmetros analisados como vasectomia, exposição ocupacional a agroquímicos e consumo de carne vermelha não apresentaram resultado estatisticamente significativo entre os pacientes e controles (Tabela 1).

A estatística multivariada ajustada pelos fatores de risco histórico familiar de câncer, histórico familiar de câncer de próstata e escolaridade, indicou efeito protetor para CaP dos genótipos CG e CG+GG do gene *AKT1* rs2494750 (OR= 0,75; IC95%=0,57-0,99  $p=0,045$ ) e (OR= 0,76; IC95%= 0,58-0,99  $p=0,044$ ), respectivamente. Os genótipos estudados nos genes

*PTEN*, *PI3K*, *AR* e *AMACR* não apresentaram associação com o câncer de próstata (Tabela 2). Na análise multivariada dos genes em pares (Apêndice 1), apresentaram proteção para CaP os genótipos *AKT1* (CG) + *AR* (A) (OR= 0,50; IC95%=0,26 – 0,97 p=0,041) (Tabela 3).

**Tabela 1** - Análise univariada de características clínicas e sócio culturais de pacientes com câncer de próstata e indivíduos controles

Características		Pacientes		Controles		Valor p
		N	(%)	N	(%)	
Histórico familiar de câncer	Não	114	(41,2)	159	(57,4)	<b>0,000*</b>
	Sim	163	(58,8)	118	(42,6)	
	Total	277	(100,0)	277	(100,0)	
Histórico familiar de CaP	Não	101	(65,2)	86	(77,5)	<b>0,031*</b>
	Sim	54	(34,8)	25	(22,5)	
	Total <sup>a</sup>	155	(100,0)	111	(100,0)	
Vasectomia	Não	270	(98,5)	265	(97,4)	0,361
	Sim	4	(1,5)	7	(2,6)	
	Total <sup>a</sup>	274	(100,0)	272	(100,0)	
Exposição ocupacional a agroquímicos	Não	115	(41,5)	134	(48,4)	0,105
	Sim	162	(58,5)	143	(51,6)	
	Total <sup>a</sup>	277	(100,0)	277	(100,0)	
Escolaridade	S	47	(17,0)	45	(16,2)	0,327
	P	167	(60,3)	20	(7,2)	
	A	61	(22,0)	27	(9,7)	
	Total <sup>a</sup>	275	(100,0)	92	(100,0)	
Consumo de carne vermelha	Não	9	(3,2)	8	(2,9)	0,967
	Sim (1-4)	151	(54,5)	137	(49,5)	
	Sim (5-7)	117	(42,2)	132	(47,7)	
	Total	277	(100,0)	277	(100,0)	

\*Resultado estatisticamente significativo,  $p < 0,05$

<sup>a</sup> Não foi possível avaliar os 277 pacientes e controles.

Grau de escolaridade - S: ensino médio completo a superior; P: ensino fundamental incompleto a ensino médio incompleto; A: analfabetos.

Consumo de carne vermelha - 1-4: 1 a 4 vezes na semana; 5-7: 5 a 7 vezes na semana

**Tabela 2** - Frequências genóticas dos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* e *AMACR* e associação com câncer de próstata

Genes	SNP	Genótipos	Caso N (%)	Controle N (%)	Não ajustado		Ajustado	
					OR (IC95%)	Valor <i>p</i>	OR (IC95%)	Valor <i>p</i>
<i>PTEN</i>	rs2735343	CC	55 (19,9)	36 (13,0)	Referência		Referência	
		CG	115 (41,5)	143 (51,6)	<b>0,53 (0,32-0,86)</b>	<b>0,010*</b>	0,44 (0,17-1,15)	0,092
		GG	107 (38,6)	98 (35,4)	0,72 (0,43-1,18)	0,189	0,58 (0,22-1,54)	0,275
		Modelo dominante						
		CC	55 (19,9)	36 (13,0)	Referência		Referência	
		CG+GG	222 (80,1)	241 (87,0)	<b>0,60 (0,38-0,95)</b>	<b>0,030*</b>	0,50 (0,21-1,20)	0,121
		Modelo recessivo						
		CC+CG	170 (61,4)	179 (64,6)	Referência		Referência	
		GG	107 (38,6)	98 (35,4)	1,15 (0,81-1,62)	0,428	1,08 (0,59-1,98)	0,800
		Frequência alélica						
		C	225 (40,7)	215 (38,8)	Referência			
		G	329 (59,3)	339 (61,2)	0,93 (0,73-1,18)	0,581		
<i>PI3K</i>	rs2699887	GG	172 (62,1)	177 (63,9)	Referência		Referência	
		GA	90 (32,5)	87 (31,4)	1,07 (0,74-1,53)	0,735	0,95 (0,51-1,75)	0,859
		AA	15 (5,4)	13 (4,7)	1,18 (0,56-2,48)	0,663	1,50 (0,36-6,24)	0,579
		Modelo dominante						
		GG	172 (62,1)	177 (63,9)	Referência		Referência	
		GA+AA	105 (37,9)	100 (36,1)	1,08 (0,77-1,53)	0,660	1,00 (0,55-1,81)	0,999
		Modelo recessivo						
		GA+GG	262 (94,6)	264 (95,3)	Referência		Referência	
		AA	15 (5,4)	13 (4,7)	1,16 (0,54-2,49)	0,698	1,56 (0,81-3,02)	0,188
		Frequência alélica						
	G	434 (78,4)	441 (79,6)	Referência				
	A	120 (21,6)	113 (20,4)	1,08 (0,81-1,44)	0,658			
<i>AKT1</i>	rs2494750	CC	210 (75,8)	203 (73,2)	Referência		Referência	
		CG	66 (23,8)	73 (26,4)	0,87 (0,60-1,28)	0,493	<b>0,75 (0,57-0,99)</b>	<b>0,045*</b>
		GG	1 (0,4)	1 (0,4)	0,97 (0,06-15,56)	0,981	-	-
		Modelo dominante						
		GG	172 (62,1)	177 (63,9)	Referência		Referência	
		CG+GG	67 (24,2)	74 (26,7)	0,88 (0,60-1,28)	0,495	<b>0,76 (0,58-0,99)</b>	<b>0,044*</b>
		Modelo recessivo						
		CG+GG	276 (99,6)	276 (99,6)	Referência		Referência	
		GG	1 (0,4)	1 (0,4)	1,00 (0,06-16,07)	1,000	-	-
		Frequência alélica						
	C	486 (87,7)	479 (86,4)	Referência				
	G	68 (12,3)	75 (13,6)	0,89 (0,63-1,27)	0,591			
<i>AMACR</i>	rs3195676	GG	107 (38,7)	96 (34,7)	Referência		Referência	
		GA	125 (45,1)	118 (42,6)	0,95 (0,65-1,38)	0,789	1,02 (0,54-1,94)	0,948
		AA	45 (16,2)	63 (22,7)	0,64 (0,40-1,03)	0,064	0,53 (0,24-1,19)	0,124
		Modelo dominante						
		GG	107 (38,6)	96 (34,7)	Referência		Referência	
		GA+AA	170 (61,4)	181 (65,3)	0,84 (0,60-1,19)	0,332	0,84 (0,45-1,56)	0,575
		Modelo recessivo						
		GA+GG	232 (83,8)	214 (77,3)	Referência		Referência	
		AA	45 (16,2)	63 (22,7)	0,66 (0,43-1,01)	0,054	0,54 (0,27-1,04)	0,067
		Frequência alélica						
	G	339 (61,3)	310 (56,0)	Referência				
	A	215 (38,7)	244 (44,0)	0,81 (0,63-1,02)	0,088			
<i>AR</i>	rs17302090	G	99 (35,7)	88 (31,8)	Referência		Referência	
		A	178 (64,3)	189 (68,2)	0,84 (0,59-1,19)	0,323	0,81 (0,49-1,35)	0,422

OR (IC95%): Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%. Ajustado para histórico familiar de câncer, histórico familiar de câncer de próstata e escolaridade.

\*Valor estatisticamente significativo,  $p < 0,05$ .

**Tabela 3** - Associação entre os genótipos dos genes *AKT1*+*AR* com câncer de próstata

Genes	SNP	Genótipos	Pacientes com CaP N (%)	Indivíduos controle N (%)	Ajustado	
					OR (IC95%)	Valor <i>p</i>
<i>AKT1</i>	rs2494750	CC+G	71 (25,6)	66 (23,8)	Referência	
		CC+A	139 (50,2)	137 (49,5)	1,01 (0,62-1,64)	0,965
<i>AR</i>	rs1730209	CG+G	28 (10,1)	22 (7,9)	1,28 (0,62-2,66)	0,505
		CG+A	38 (13,7)	51 (18,4)	<b>0,50 (0,26-0,97)</b>	<b>0,041*</b>
		GG+G	0 (0,0)	0 (0,0)	-	-
		GG+A	1 (0,4)	1 (0,4)	-	-

OR (IC95%)= Valor de *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%. Ajustado para histórico familiar de câncer, histórico familiar de câncer de próstata e escolaridade.

\*Valor estatisticamente significativo  $p < 0,05$

Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros clínico (PSA) e histopatológicos dos tumores obtidos dos prontuários dos pacientes. A maioria dos pacientes 147 (54,0%), apresentou nível de PSA entre 4,1 - 10 ng/mL; 115 pacientes (42,3%) possuíam nível plasmático de PSA maior que 10 ng/mL e somente 10 (3,7%) apresentaram nível de PSA até 4ng/mL. Em relação ao escore de Gleason, 133 pacientes (48,4%) possuíam escore de 3 - 6; 117 (42,5%) escore 7 e somente 25 (9,1%) apresentaram escore de 8 - 10. A bilateralidade do tumor foi evidenciada em 137 indivíduos (53,1%). Em relação ao estadiamento, 154 tumores (60,4%) encontravam-se em estágio T2, contra 101 (39,6%) em estágio T3 e T4. Os parâmetros como extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, invasão perineural e invasão de linfonodos estavam ausentes na maioria dos pacientes.

Os genótipos dos cinco SNPs analisados no presente estudo foram avaliados quanto a associação com diferentes parâmetros histopatológicos (escore de Gleason, extensão extracapsular, comprometimento de vesícula seminal, invasão perineural, invasão de linfonodos, bilateralidade e estadiamento do tumor) e com o parâmetro clínico nível de PSA (Apêndice 2).

Ao comparar os genótipos heterozigotos e/ou polimórficos com os prevalentes, foi possível observar que isoladamente e apenas os genótipos GA e GA+AA do gene *AMACR* isolado promoveram efeito protetor para invasão de vesícula seminal (OR= 0,33; IC95%=0,14-0,80  $p=0,013$ ); (OR= 0,39; IC95%=0,18-0,84  $p=0,015$ ), respectivamente (Tabela 5).

Quando foram associados os genótipos de diferentes SNPs, foram obtidos alguns resultados estatisticamente significativos. As seguintes associações indicaram proteção para invasão de vesícula seminal: *AKT1* (CC) + *AR* (A) (OR= 0,43; IC95%= 0,19-0,97  $p=0,043$ ) e

*AKT1* (CC) + *AMACR* (GA) (OR= 0,31; IC95%= 0,12-0,78 p=0,015). As associações que indicaram proteção para bilateralidade do tumor foram: *AKT1* (CC) + *AR* (A) (OR= 0,53; IC95%= 0,29-0,98 p=0,042) e *PI3K* (GG) + *AR* (A) (OR= 0,50; IC95%= 0,26-0,97 p=0,040) (Tabela 5).

A combinação da associação dos genótipos *PTEN* (CG) + *AMACR* (GG) (OR= 3,09; IC95%= 1,01-9,48 p=0,049); *PTEN* (CG) + *AR* (G) (OR= 3,50; IC95%= 1,06-11,53 p=0,039) e *PTEN* (CG) + *AR* (A) (OR= 3,05; IC95%= 1,04-8,96 p=0,042) indicaram maior risco de ocorrência de extensão extracapsular (Tabela 5).

**Tabela 4** - Análise dos níveis de PSA e das características histopatológicas dos tumores de pacientes com câncer de próstata (n=277)

<b>Parâmetros*</b>	<b>Categorias</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Nível de PSA (ng/mL)	0,0 - 4,0	10	3,7
	4,1 - 10,0	147	54,0
	> 10,1	115	42,3
	Total	272	100,0
Escore de Gleason	3 – 6	133	48,4
	7	117	42,5
	8 – 10	25	9,1
	Total	275	100,0
Extensão extracapsular	Presença	97	37,7
	Ausência	160	62,3
	Total	257	100,0
Invasão de vesícula seminal	Presença	32	12,5
	Ausência	225	87,5
	Total	257	100,0
Invasão perineural	Presença	42	16,3
	Ausência	215	83,7
	Total	257	100,0
Bilateralidade	Presença	137	53,1
	Ausência	121	46,9
	Total	258	100,0
Invasão de linfonodos	Presença	6	2,5
	Ausência	232	97,5
	Total	238	100,0
Estadiamento	T2	154	60,4
	T3 e T4	101	39,6
	Total	255	100,0

\*Para todos os parâmetros pareados não foi possível avaliar os 277 pacientes.

**Tabela 5** – Associação de dados histopatológicos de tumores de pacientes com câncer de próstata com os genótipos dos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* e *AMACR*

Parâmetros histopatológicos	Genes	SNP	Genótipos	P N (%)	A N (%)	OR (IC95%)	Valor p	
Invasão vesícula Seminal (n = 257)	<i>AMACR</i>	rs3591676	GG	19 (59,4)	82 (36,4)	Referência		
			GA	8 (25,0)	105 (46,7)	<b>0,33 (0,14-0,80)</b>	<b>0,013*</b>	
			AA	5 (15,6)	38 (16,9)	0,57 (0,20-1,64)	0,294	
			GA+AA	13 (40,6)	143 (63,6)	<b>0,39 (0,18-0,84)*</b>	<b>0,015</b>	
	+	<i>AKT1</i>	rs2494750	CC+G	14 (43,8)	53 (23,6)	Referência	
				CC+A	13 (40,6)	115 (51,1)	<b>0,43 (0,19-0,97)</b>	<b>0,043*</b>
	<i>AR</i>	rs17302090	CG+G	2 (6,3)	25 (11,1)	0,30 (0,06-1,44)	0,132	
			CG+A	3 (9,4)	31 (13,8)	0,37 (0,10-1,38)	0,137	
			GG+A	0 (0,0)	1 (0,4)	-	-	
	+	<i>AKT1</i>	rs2494750	CC+GG	16 (50,0)	57 (25,3)	Referência	
				CC+GA	7 (21,9)	81 (36,0)	<b>0,31 (0,12-0,80)</b>	<b>0,015*</b>
		<i>AMACR</i>	rs3195676	CC+AA	4 (12,5)	30 (13,3)	0,48 (0,15-1,55)	0,217
				CG+GG	3 (9,4)	25 (11,1)	0,43 (0,11-1,60)	0,207
				CG+GA	1 (3,1)	23 (10,2)	0,16 (0,02-1,24)	0,078
CG+AA				1 (3,1)	8 (3,6)	0,45 (0,05-3,83)	0,461	
GG+AG	0 (0,0)	1 (0,4)	-	-				
Bilateralidade (n = 258)	<i>AKT1</i>	rs2494750	CC+G	43 (31,4)	24 (19,8)	Referência		
			CC+A	63 (46,0)	66 (54,5)	<b>0,53 (0,29-0,98)</b>	<b>0,042*</b>	
	<i>AR</i>	rs17302090	CG+G	13 (9,5)	14 (11,6)	0,52 (0,21-1,28)	0,155	
			CG+A	17 (12,4)	17 (14,0)	0,56 (0,24-1,29)	0,172	
			GG+A	1 (0,7)	0 (0,0)	-	-	
			GG+G	0 (0,0)	0 (0,0)	-	-	
	+	<i>PI3K</i>	rs2699887	GG+G	38 (27,7)	21 (17,4)	Referência	
				GG+A	47 (34,3)	52 (43,0)	<b>0,50 (0,26-0,97)*</b>	<b>0,040</b>
		<i>AR</i>	rs17302090	GA+G	18 (13,1)	16 (13,2)	0,62 (0,26-1,47)	0,278
				GA+A	26 (19,0)	25 (20,7)	0,58 (0,27-1,24)	0,156
				AA+G	0 (0,0)	1 (0,8)	-	-
				AA+A	8 (5,8)	6 (5,0)	0,74 (0,23-2,41)	0,614

<b>Extensão Extracapsular (n = 257)</b>	<b>PTEN</b> +	rs2735343	CC+GG	6 (6,2)	22 (13,8)	Referência	
			CC+GA	6 (6,2)	11 (6,9)	2,00 (0,52-7,66)	0,312
			CC+AA	3 (3,1)	3 (1,9)	3,67 (0,58-23,03)	0,166
			CG+GG	16 (16,5)	19 (11,9)	<b>3,09 (1,01-9,48)</b>	<b>0,049*</b>
			CG+GA	20 (20,6)	30 (18,8)	2,44 (0,84-7,09)	0,100
			CG+AA	11 (11,3)	13 (8,1)	3,10 (0,93-10,39)	0,066
			GG+GG	15 (15,5)	23 (14,4)	2,39 (0,79-7,28)	0,125
			GG+AG	17 (17,5)	29 (18,1)	2,15 (0,73-6,35)	0,166
			GG+AA	3 (3,1)	10 (6,3)	1,10 (0,23-5,31)	0,906
	<b>PTEN</b> +	rs2735343	CC+G	5 (5,2)	21 (13,1)	Referência	
			CC+A	10 (10,3)	15 (9,4)	2,80 (0,79-9,89)	0,110
			CG+G	15 (15,5)	18 (11,3)	<b>3,50 (1,06-11,53)</b>	<b>0,039*</b>
			CG+A	32 (33,0)	44 (27,5)	<b>3,06 (1,04-8,96)</b>	<b>0,042*</b>
			GG+G	14 (14,4)	21 (13,1)	2,80 (0,86-9,18)	0,089
			GG+A	21 (21,6)	41 (25,6)	2,15 (0,71-6,52)	0,175

OR (IC95%)=Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%. P: presente; A: ausente.

\*Valor estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ .

## Discussão

O CaP é uma patologia heterogênea que atualmente oferece uma possibilidade de detecção de 19% durante a vida, enquanto o risco de óbito pela doença é de apenas 8%. Essa discrepância entre a incidência e a mortalidade é atribuída não apenas ao tratamento empregado, mas em parte ao aumento da detecção de tumores iniciais e de crescimento lento (SIEGEL et al., 2017). Os pacientes portadores de tumores de crescimento lento estariam expostos a riscos desnecessários, como consequência da terapia. Portanto, atualmente o maior desafio no CaP é a identificação de marcadores capazes de classificar os tumores de acordo com seu potencial de agressividade e de reconhecer pacientes que necessitam de terapia específica (VANACORE et al., 2017).

A taxa de desenvolvimento do CaP varia substancialmente de acordo com a idade (REBBECK, 2017), ancestralidade (BELL et al., 2015) e histórico familiar (SIEGEL; NAISHADHAM, JEMAL, 2012). No presente estudo o histórico familiar de câncer foi um fator de risco ( $p=0,001$ ). Os pacientes que possuíam CaP na família também apresentaram maior suscetibilidade para desenvolverem a neoplasia prostática ( $p=0,031$ ). Estes achados comprovam a alta contribuição hereditária para o desenvolvimento deste carcinoma. Cremers et al. (2016) demonstraram que, embora o câncer de próstata possua sítios herdáveis que determinam a suscetibilidade à doença, não é apenas um gene que irá determiná-la, pois esta é uma patologia que possui um grande número de genes envolvidos, sendo considerada uma doença multifatorial.

A educação é um indicador de status socioeconômico, inversamente associada à incidência de câncer em vários órgãos; em geral, quanto maior o nível de escolaridade, menor o risco de cânceres agressivos (MOUW et al., 2008). Na amostra estudada os indivíduos analfabetos apresentaram duas vezes mais risco de CaP, quando comparados com seus respectivos controles. Esses dados confirmam a afirmação de Wolf et al. (2006), de que um nível mais alto de alfabetização proporciona ao homem maior compreensão da saúde da próstata e, conseqüentemente, a busca por acompanhamento médico. Neste caso, a baixa instrução dos pacientes pode levar ao diagnóstico do tumor em estágios mais avançados e ter como consequência um alto índice de mortalidade.

A idade média dos pacientes do presente estudo foi  $65,38 \pm 7,15$  anos o que corrobora os dados da literatura que mostram que o CaP é uma doença da terceira idade, pois a maioria dos casos de CaP esporádico acomete homens acima de 65 anos. Este fato foi relacionado com o acúmulo de danos no DNA (O'CONNOR, 2015).

O antígeno específico prostático (PSA) é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais prostáticas que não se constitui em marcador câncer específico, pois pode estar alterado em outras afecções prostáticas (HENDRIKS; VAN OORT, SCHALKEN, 2017; HAMDY et al., 2016) e não existe valor exato que determine a presença da doença maligna. Os valores do PSA ao diagnóstico no presente estudo, variaram de 1,5 a 933,9 ng/mL, confirmando a baixa especificidade deste marcador para CaP. Em consequência desta característica, a USPSTF (*The U.S. Preventive Services Task Force*), e vários outros órgãos de saúde do mundo, recomendaram não rastrear o CaP baseado no PSA, pois apesar de resultar na detecção de muitos casos de CaP, os efeitos sobre a mortalidade são mínimos (JEMAL et al., 2015).

Considerando o importante papel que os SNPs têm apresentado como biomarcadores em diversos tipos de doenças, foram escolhidos alguns genes e SNPs candidatos a biomarcadores de suscetibilidade e prognóstico ao CaP (WANG et al., 2016), entre eles, os componentes da via de sinalização PTEN/PI3K/AKT, importante reguladora do crescimento, metabolismo, ciclo celular, reparo do DNA e bloqueio da apoptose (ZHU et al., 2016).

O SNP do gene *PTEN*, rs2735343 estudado neste trabalho, está localizado numa região intrônica, ou seja, não codificante. Ele pode, de acordo com JANG et al. (2013), influenciar o *splicing*, a expressão da proteína, e conseqüentemente, a regulação do ciclo celular e o risco de câncer. Estes autores mostraram que pacientes com carcinoma de células escamosas de esôfago (ESCC), portadores do genótipo homocigoto GG do mesmo SNP avaliado no presente estudo, apresentaram maior risco para ESCC. Este SNP também foi considerado por Ma et al. (2012) como fator de suscetibilidade para ESCC em pacientes que apresentavam os genótipos CG e GG.

Song et al. (2017) realizaram um estudo de meta-análise com diferentes tipos de câncer, inclusive CaP, e associaram o risco para câncer com indivíduos portadores do alelo G na população asiática. No presente estudo não encontramos associação das variantes deste gene com a suscetibilidade a CaP na amostra estudada. No entanto, em todas as combinações genotípicas onde detectamos maior risco de ocorrência de extensão extracapsular, o alelo G do gene *PTEN* (rs2735343) estava presente (Tabela 4), o que parece confirmar as hipóteses acima citadas.

O genótipo heterocigoto nestes casos, pode ter originado uma proteína não funcional, pois de acordo com Jang et al. (2013), este supressor tumoral apresenta uma característica muito peculiar; ao contrário da maioria dos genes supressores tumorais, a perda de um único alelo já resulta em um fenótipo anormal, ou seja, é considerado um supressor haploinsuficiente e, portanto, não segue o modelo genético clássico de inativação bialélica. Realmente, a perda da

atividade desta proteína parece ser comum em diferentes tipos de câncer (INOUE; FRY, 2015) e explica nossos achados.

O gene *AKT1* pertence à família *AKT* e a proteína codificada por ele desempenha um importante papel na sobrevivência celular por meio do controle da apoptose, tendo sido relacionado com o desenvolvimento de várias doenças, incluindo o câncer (PAINTER et al., 2016). A relação entre o CaP e o SNP rs2494750 é controversa, Kariyadi et al. (2015) e Fitzgerald et al. (2018) associaram este SNP com morte específica por CaP em pacientes portadores do alelo G. No entanto, no presente estudo o mesmo SNP promoveu proteção para CaP aos portadores dos genótipos CG. O genótipo heterozigoto, quando combinado com o alelo A do gene *AR* (rs17302090), também conferiu proteção ao CaP. Outros trabalhos não detectaram associação do gene *AKT1* (rs2494750) com carcinoma de células escamosas de esôfago (ZHU et al., 2016) e com câncer de endométrio (FALLAH et al., 2015).

Dados os resultados conflitantes expostos acima, será interessante confirmar futuramente em amostras maiores de pacientes portadores de CaP de outras populações, a associação ou não do SNP rs2494750 com proteção ou risco à doença, avaliando a atividade funcional deste SNP frente ao desenvolvimento da doença.

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a sinalização da via PI3K/AKT/mTOR interage com o gene *AR*, com funções antagonistas; quando a via era inibida, provocava um aumento da expressão do *AR*, e esse mecanismo poderia ser um alvo terapêutico para pacientes com câncer de próstata andrógeno dependente (KAARBO et al., 2010). Segundo os autores, aparentemente a via de sinalização do gene *AR* com diferentes genes *downstream* pode estar envolvida com a transformação maligna do CaP.

Alguns SNPs estudados no gene *AR* já demonstraram que a proteína codificada apresenta alteração na ligação com cofatores, alteração esta, associada à síndrome da insensibilidade aos androgênios, que pode afetar a ação e os níveis de androgênios circulantes (NAEYER et al., 2014). Em nosso estudo o SNP rs17302090 estudado no gene *AR* não foi associado com o CaP. Sun et al. (2010) avaliaram o polimorfismo rs1204038 que tem um forte desequilíbrio de ligação com o rs17302090 avaliado neste estudo, e não encontraram associação para risco ao CaP agressivo e terapia de privação de andrógeno. No entanto, o alelo A, quando combinado com os genes *AKT1* (CC) e *PI3K* (GG) conferiu, respectivamente, proteção para invasão de vesícula seminal e bilateralidade do tumor.

Lindström et al. (2007) mostraram que portadores do alelo raro A (rs17302090) que receberam tratamento hormonal primário apresentaram duas vezes mais risco de morrer por CaP em relação aos indivíduos que possuíam o alelo prevalente, e sugeriram que este

polimorfismo atuaria como um modificador no tratamento hormonal da doença levando à morte por CaP.

O último gene avaliado no presente estudo codifica a enzima AMACR que encontra-se superexpressa nos tecidos tumorais da próstata. Essa superexpressão parece estar envolvida na iniciação do carcinoma, uma vez que já foi descrito este tipo de alteração em neoplasias intraepiteliais da próstata - PIN (JEMAL et al., 2008; JARVIS; CHUGHTAI, KAPLAN, 2015). A enzima AMACR participa no metabolismo de ácidos graxos. As principais fontes de ácido graxo de cadeia ramificada na dieta humana incluem, entre outros, carne vermelha, que é considerada um fator de risco para CaP. O consumo desses ácidos graxos, associado à superexpressão de *AMACR* nas células cancerosas da próstata, consistentemente aumenta a oxidação nessas células, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio, que podem danificar o DNA (WRIGHT et al., 2011).

No presente estudo não foi observada diferença das variantes genótípicas do gene *AMACR* (rs3195676) entre os pacientes com CaP e controles. Os dados encontrados aparentemente contrariam o risco ao CaP atribuído à superexpressão desta proteína. No entanto, devemos lembrar que o SNP rs3195676, localizado no éxon 1, região codificante, resulta na substituição de valina por metionina. O uso de ferramentas de bioinformática para prever a influência desta troca de aminoácidos na integridade da proteína mostrou que esta substituição é considerada “intolerante” em portadores de alelos recessivos deste SNP, sugerindo que este SNP pode danificar a proteína e, conseqüentemente, torná-la menos expressa (LEVIN et al., 2007).

Lee et al. (2013) estudaram o mesmo polimorfismo e mostraram que homens portadores do alelo G, com escore de Gleason  $\geq 7$  e  $\geq$  pT2c, apresentavam maior risco de desenvolver CaP. Um experimento *in vitro* também demonstrou que uma diminuição no nível da proteína AMACR resulta em uma diminuição da proliferação de células de adenocarcinoma da próstata (ZHA et al., 2003). Estes fatos explicam os resultados obtidos no presente estudo, pois sempre que o alelo A do SNP estava presente, foi observada proteção ao CaP, ou seja, a proteína AMACR estava danificada e provavelmente apresentou baixa expressão, levando a um melhor prognóstico para os pacientes portadores do alelo raro.

## **Conclusão**

Os resultados obtidos neste estudo indicaram alguns SNPs promissores para serem avaliados e confirmados em estudos posteriores em outras populações e que utilizem um maior número amostral do que o usado no presente estudo.

Os SNPs avaliados nos genes *AKT1* e *AR* foram associados com proteção ao desenvolvimento de CaP. A princípio, indivíduos portadores dos genótipos sugeridos, poderiam não ser submetidos a super-tratamentos e, conseqüentemente, serem poupados de efeitos colaterais, mas isto demanda estudos adicionais. Além disso, a associação dos polimorfismos presentes nos genes *AMACR*, *AKT1* e *AR* com dados histopatológicos como bilateralidade do tumor e comprometimento de vesícula seminal, indicou um melhor prognóstico aos pacientes, mostrando a importância dessas variantes polimórficas quanto à agressividade do tumor. Assim, os genes *AKT1* e *AR* são candidatas a marcadores preditivos em pacientes com esta doença.

Foram também obtidas associações dos genótipos dos genes *PTEN*, *AMACR* e *AR* com risco para extensão extracapsular, o que está associado a pior prognóstico aos pacientes portadores destes genótipos no pós-tratamento. Caso essas associações sejam confirmadas em estudos futuros, indivíduos portadores destes genótipos deveriam ser acompanhados com maior cautela. Portanto, as associações das variantes genotípicas desses genes poderão ser usadas como marcadores para agressividade para CaP.

## **Conflito de interesse**

Os autores declaram não existir conflito de interesse.

## **Financiamento**

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (Convênio 185/2014) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP e bolsa de estudo para Nóbrega, M.). I.M.S. Cólus recebeu bolsa de investigador do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Hospital do Câncer de Londrina, CISMENPAR - Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema e Santa Casa de Londrina, Paraná, Brasil, pelo suporte e parcerias e aos voluntários (pacientes e controles) que participaram deste estudo.

## Referências

- BELL, K. J. L.; DEL MAR, C.; WRIGHT, G.; DICKINSON, J.; GLASZIOU, P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 7, p. 1749–1757, 2015.
- CICCARESE, C.; SANTONI, M.; BRUNELLI, M.; et al. AR-V7 and prostate cancer: The watershed for treatment selection? **Cancer Treatment Reviews**, v. 43, p. 27–35, 2016.
- CREMERS, R. G.; ABEN, K. K.; VAN OORT, I. M.; et al. The clinical phenotype of hereditary versus sporadic prostate cancer: HPC definition revisited. **Prostate**, v. 76, n. 10, p. 897–904, 2016.
- DI CRISTOFANO, A.; PANDOLFI, P. P. The Multiple Roles of PTEN in Tumor Suppression. **Cell**, v. 100, n. 4, p. 387–390, 2000.
- FALLAH, S.; KORANI, M.; HAJIMIRZA, M.; SEIFI, M. Association Between Genetic Variants of Akt1 and Endometrial Cancer. **Biochemical Genetics**, v. 53, n. 11–12, p. 281–290, 2015.
- FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 1, n. 1, p. 34–45, 2001.
- GLOBOCAN. <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp> [acesso 17 agosto 2017].
- HAMDY, F. C.; DONOVAN, J. L.; LANE, J. A.; et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 15, p. 1415–1424, 2016.
- HEEMERS, H. V.; TINDALL, D. J. Androgen receptor (AR) coregulators: A diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 7, p. 778–808, 2007.
- HENDRIKS, R. J.; VAN OORT, I. M.; SCHALKEN, J. A. Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: a review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 20, n. 1, p. 12–19, 2017
- HESSENKEMPER, W.; ROEDIGER, J.; BARTSCH, S.; et al. A Natural Androgen Receptor Antagonist Induces Cellular Senescence in Prostate Cancer Cells. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 11, p. 1831–1840, 2014.
- INOUE, K.; FRY, E. A. Haploinsufficient tumor suppressor genes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.118 p.83-122. 2017.
- JANG, Y.; LU, S. A.; CHEN, Z. P.; et al. Genetic polymorphisms of CCND1 and PTEN in progression of esophageal squamous carcinoma. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6685–6691, 2013.

JARVIS, T. R.; CHUGHTAI, B.; KAPLAN, S. A. Testosterone and benign prostatic hyperplasia. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 2, p. 212–6, 2015.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; et al. Cancer Statistics, 2008. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 58, n. 2, p. 71–96, 2008.

JEMAL, A.; FEDEWA, S. A.; MA, J.; SIEGEL, R et al. Prostate Cancer Incidence and PSA Testing Patterns in Relation to USPSTF Screening Recommendations. **JAMA**, n. 314, v.19, p.2054-2061, 2015.

JIANG, N.; ZHU, S.; CHEN, J.; NIU, Y.; ZHOU, L. A-Methylacyl-CoA Racemase (AMACR) and Prostate-Cancer Risk: A Meta-Analysis of 4,385 Participants. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–6, 2013.

KAARBO, M.; MIKKELSEN, O. L.; MALEROD, L.; et al. PI3K-AKT-mTOR pathway is dominant over androgen receptor signaling in prostate cancer cells. **Cellular Oncology**, v. 32, n. 1–2, p. 11–27, 2010.

KARYADI, D. M.; ZHAO, S.; HE, Q.; MCINTOSH, L.; et al. Confirmation of genetic variants associated with lethal prostate cancer in a cohort of men from hereditary prostate cancer families. **International Journal of Cancer**, v.1; n. 136(9), p.2166-71, 2015.

LINDSTRÖM, S.; ADAMI, H. O.; B?LTER, K. A.; et al. Inherited variation in hormone-regulating genes and prostate cancer survival. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 17, p. 5156–5161, 2007.

LIU, Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 9, n. 3, p. 230–234, 2006.

LIU, Y.; HU, F.; LI, D.; et al. Does physical activity reduce the risk of prostate cancer? A systematic review and meta-analysis. **European Urology**, v. 60, n. 5, p. 1029–1044, 2011.

LIU, J. M.; CHENG, S. H.; XIA, C.; et al. Association between single nucleotide polymorphisms in AKT1 and the risk of prostate cancer in the Chinese Han population. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 16, n. 1, 2017.

LEVIN, A. M.; ZUHLKE, K. A.; RAY, A. M.; COONEY, K. A.; DOUGLAS, J. A. Sequence variation in  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase and risk of early-onset and familial prostate cancer. **Prostate**, v. 67, n. 14, p. 1507–1513, 2007.

MA, J.; ZHANG, J.; NING, T.; CHEN, Z.; XU, C. Association of genetic polymorphisms in MDM2, PTEN and P53 with risk of esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Human Genetics**, v. 57, n. 4, p. 261–264, 2012

MOUW, T.; KOSTER, A.; WRIGHT, M. E.; et al. Education and risk of cancer in a large cohort of men and women in the United States. **PLoS ONE**, v. 3, n. 11, 2008.

NAEYER, H.; BOGAERT, V.; DE SPAEY, A.; et al. Genetic variations in the androgen receptor are associated with steroid concentrations and anthropometrics but not with muscle mass in healthy young men. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

O'CONNOR, M. J. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. **Molecular Cell**, v. 60, n. 4, p. 547–560, 2015.

PAINTER, J. N.; KAUFMANN, S.; O'MARA, T. A.; et al. A Common Variant at the 14q32 Endometrial Cancer Risk Locus Activates AKT1 through YY1 Binding. **American Journal of Human Genetics**, v. 98, n. 6, p. 1159–1169, 2016.

PRENCIPE, M.; O'NEILL, A.; O'HURLEY, G.; et al. Relationship between serum response factor and androgen receptor in prostate cancer. **The Prostate**, v. 1717, 2015.

QI, X.; WANG, Y.; HOU, J.; HUANG, Y. A Single Nucleotide Polymorphism in HPGD Gene Is Associated with Prostate Cancer Risk. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 19, p. 4083–4086, 2017.

REBBECK, T. R. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 27, n. 1, p. 3–10, 2017. Elsevier.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, 2016.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 62, p. 10–29, 2012.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA Cancer Journal**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SONG, D.-D.; ZHANG, Q.; LI, J.-H.; et al. Single nucleotide polymorphisms rs701848 and rs2735343 in PTEN increases cancer risks in an Asian population. **Oncotarget**, v. 8, n. 56, p. 96290–96300, 2017.

SUN, T.; LEE, G. S. M.; WERNER, L.; et al. Inherited variations in AR, ESR1, and ESR2 genes are not associated with prostate cancer aggressiveness or with efficacy of androgen deprivation therapy. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 19, n. 7, p. 1871–1878, 2010.

TOREN, P.; ZOUBEIDI, A. Targeting the PI3K/Akt in prostate cancer: challenges and opportunities (Review). **International journal of urology**, v. 45, p. 1793-1801, 2014.

VAIDYANATHAN, V.; NAIDU, V.; KARUNASINGHE, N.; et al. SNP-SNP interactions as risk factors for aggressive prostate cancer. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 621, 2017.

VANACORE, D.; BOCCCELLINO, M.; ROSSETTI, S.; et al. Micromas in prostate cancer: an overview. **Oncotarget**, 2017.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489–501, 2002.

WANG, C.; NIE, H.; LI, Y.; et al. The study of the relation of DNA repair pathway genes SNPs and the sensitivity to radiotherapy and chemotherapy of NSCLC. **Scientific reports**, v. 6, n. June, p. 26526, 2016.

WISE, H. M.; HERMIDA, M. A.; LESLIE, N. R. Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. **Clinical Science**, v. 131, n. 3, p. 197–210, 2017.

WOLF, M. S., KNIGHT, S. J., LYONS, E. A., DURAZO-ARVIZU, R., PICKARD, S. A., ARSEVEN, A. BENNETT, C. L. Literacy, race, and PSA level among low-income men newly diagnosed with prostate cancer. **Urology**, v. 68, n. 1, p. 89–93, 2006.

WRIGHT, J. L.; NEUHOUSER, M. L.; LIN, D. W.; et al. AMACR polymorphisms, dietary intake of red meat and dairy and prostate cancer risk. **Prostate**, v. 71, n. 5, p. 498–506, 2011.

ZHA, S.; FERDINANDUSSE, S.; DENIS, S.; et al.  $\alpha$ -Methylacyl-CoA Racemase as an Androgen-Independent Growth Modifier in Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 63, n. 21, p. 7365–7376, 2003.

ZHU, J.; WANG, M.; HE, J.; et al. Polymorphisms in the AKT1 and AKT2 genes and oesophageal squamous cell carcinoma risk in an Eastern Chinese population. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, n. 4, p. 666–677, 2016.

**Apêndice 1 -** Frequências genóticas obtidas após associação entre os genótipos dos genes *PTEN*, *AKT*, *PI3K*, *AR* e *AMACR* em pacientes com câncer de próstata e seus controles

Genes	SNP	Genótipos	Pacientes com CaP N (%)	Indivíduos controle N (%)	Não ajustado		Ajustado	
					OR (IC95%)	Valor p	OR (IC95%)	Valor p
<i>PTEN</i>	rs2735343	CC+GG	35 (12,6)	23 (8,3)	Referência		Referência	
		+	CC+GA	16 (5,8)	10 (3,6)	1,05 (0,41-2,72)	0,918	1,20 (0,21-7,02)
<i>PI3K</i>	rs2699887	CC+AA	4 (1,4)	3 (1,1)	0,88 (0,18 - 4,28)	0,870	-	-
		GC+GG	72 (26)	96 (34,7)	0,49 (0,27 - 0,91)	<b>0,023*</b>	0,46 (0,16-1,31)	0,148
		GC+GA	35 (12,6)	39 (14,1)	0,59 (0,29 - 1,18)	0,137	0,46 (0,14-1,47)	0,189
		GC+AA	8 (2,9)	8 (2,9)	0,66 (0,22 - 2,00)	0,459	0,57 (0,10-3,33)	0,531
		GG+GG	65 (23,5)	58 (20,9)	0,74 (0,39 - 1,39)	0,344	0,63 (0,22-1,81)	0,389
		GG+GA	39 (14,1)	38 (13,7)	0,67 (0,34-1,34)	0,263	0,56 (0,18-1,77)	0,324
		GG+AA	3 (1,1)	2 (0,7)	0,99 (0,15 - 6,36)	0,988	-	-
<i>PTEN</i>	rs2735343	CC+CC	45 (16,2)	30 (10,8)	Referência		Referência	
		+	CC+CG	10 (3,6)	6 (2,2)	1,11 (0,36-3,38)	0,853	1,32 (0,24-7,35)
<i>AKTI</i>	rs2494750	CG+CC	82 (29,6)	99 (35,7)	0,55 (0,32-0,95)	<b>0,033*</b>	0,55 (0,20-1,49)	0,242
		CG+CG	32 (11,6)	44 (15,9)	0,48 (0,25-0,93)	<b>0,029*</b>	0,30 (0,09-0,98)	0,056
		CG+GG	1 (0,4)	0 (0,0)	-	-	-	-
		GG+CC	83 (30)	74 (26,7)	0,75 (0,43-1,31)	0,307	0,63 (0,24-1,72)	0,634
		GG+CG	24 (8,7)	23 (8,3)	0,70 (0,33-1,45)	0,333	0,59 (0,15-2,24)	0,585
		GG+GG	0 (0,0)	1 (0,4)	-	-	-	-
<i>PTEN</i>	rs2735343	CC+GG	19 (6,9)	11 (4,0)	Referência		Referência	
		+	CC+AG	30 (10,8)	16 (5,8)	0,92 (0,35-2,40)	0,867	1,56 (0,31-7,84)
<i>AMACR</i>	rs3195676	CC+AA	6 (2,2)	9 (3,2)	0,36 (0,11-1,18)	0,091	1,24 (0,07-21,81)	0,882
		CG+GG	55 (19,9)	70 (25,3)	0,46 (0,21-0,97)	<b>0,041*</b>	0,55 (0,16-1,89)	0,346
		CG+AG	36 (13)	42 (15,2)	0,42 (0,21-0,85)	<b>0,015*</b>	0,48 (0,15-1,50)	0,204
		CG+AA	24 (8,7)	31 (11,2)	0,41 (0,18-0,93)	<b>0,032*</b>	0,53 (0,14-1,99)	0,350
		GG+GG	51 (18,4)	37 (13,4)	0,57 (0,27-1,22)	0,149	0,78 (0,23-2,64)	0,692
		GG+AG	41 (14,8)	38 (13,7)	0,73 (0,35-1,54)	0,415	1,08 (0,32-3,59)	0,906
		GG+AA	15 (5,4)	23 (8,3)	0,35 (0,14-0,85)	<b>0,020*</b>	0,20 (0,05-0,87)	0,310
<i>PTEN</i>	rs2735343	CC+G	28 (10,1)	15 (5,4)	Referência		Referência	
		+	CC+A	27 (9,7)	21 (7,6)	0,69 (0,29-1,61)	0,389	1,65 (0,33-8,36)
<i>AR</i>	rs1730209	CG+G	34 (12,3)	39 (14,1)	0,47 (0,21-1,02)	0,055	0,55 (0,15-2,07)	0,378
		CG+A	81 (29,2)	104 (37,5)	0,42 (0,21 -0,83)	<b>0,013*</b>	0,54 (0,17-1,73)	0,298
		GG+G	37 (13,4)	34 (12,3)	0,58 (0,27-1,27)	0,176	0,98 (0,26-3,78)	0,977
		GG+A	70 (25,3)	64 (23,1)	0,57 (0,29-1,19)	0,142	(0,19-2,04)	0,433

<b>AKT</b>	rs2494750	CC+GG	129 (46,6)	135 (48,7)	Referência		Referência	
+		CC+GA	71 (25,6)	58 (20,9)	1,28 (0,84-1,95)	0,251	1,19 (0,60-2,35)	0,625
<b>PI3K</b>	rs2699887	CC+AA	10 (3,6)	10 (3,6)	1,05 (0,42-2,60)	0,922	1,28 (0,31-5,27)	0,729
		CG+GG	42 (15,2)	41 (14,8)	1,07 (0,65-1,76)	0,782	0,99 (0,45-2,75)	0,971
		CG+GA	19 (6,9)	29 (10,5)	0,69 (0,37-1,28)	0,238	0,47 (0,16-1,35)	0,158
		CG+AA	5 (1,8)	3 (1,1)	1,74 (0,41-7,45)	0,453	-	-
		GG+GG	1 (0,4)	1 (0,4)	1,05 (0,06-16,91)	0,974	-	-
<b>AKTI</b>	rs2494750	CC+GG	78 (28,2)	71 (25,6)	Referência		Referência	
+		CC+GA	96 (34,7)	79 (28,5)	1,11 (0,71-1,71)	0,652	1,14 (0,58-2,28)	0,699
<b>AMACR</b>	rs3195676	CC+AA	36 (13)	53 (19,1)	0,62 (0,36-1,05)	0,076	0,59 (0,25-1,38)	0,223
		CG+GG	29 (10,5)	25 (9)	1,06 (0,57-1,97)	0,864	0,99 (0,39-2,49)	0,975
		CG+CG	28 (10,1)	38 (13,7)	0,67 (0,37-1,20)	0,180	0,65 (0,24-1,77)	0,395
		CG+AA	9 (3,2)	10 (3,6)	0,82 (0,32 - 2,13)	0,683	0,32 (0,07-1,46)	0,142
		GG+GA	1 (0,4)	1 (0,4)	0,91 (0,06-14,83)	0,947	-	-
<b>AMACR</b>		GG+G	99 (35,7)	88 (31,8)	Referência		Referência	
+		GG+A	8 (2,9)	8 (2,9)	0,90 (0,32-2,47)	0,821	0,68 (0,09-5,00)	0,708
<b>AR</b>	rs1730209	GA+A	125 (45,1)	118 (42,6)	0,94 (0,64-1,38)	0,757	1,00 (0,49-2,01)	0,990
		AA+A	45 (16,2)	63 (22,7)	0,63 (0,39-1,02)	0,063	0,52 (0,21-1,25)	0,141
<b>PI3K</b>	rs2699887	GG+G	62 (22,4)	57 (20,6)	Referência		Referência	
+		GG+A	110 (39,7)	120 (43,3)	0,84 (0,54-1,31)	0,449	0,97 (0,44-2,18)	0,949
<b>AR</b>	rs1730209	GA+G	36 (13)	27 (9,7)	1,23 (0,66-2,27)	0,516	1,73 (0,53-5,67)	0,364
		GA+A	54 (19,5)	60 (21,7)	0,83 (0,49-1,38)	0,470	0,68 (0,27-1,71)	0,418
		AA+G	1 (0,4)	4 (1,4)	0,23 (0,02-2,12)	0,194	-	-
		AA+A	14 (5,1)	9 (3,2)	1,43 (0,57-3,56)	0,442	2,79 (0,37-21,08)	0,319
<b>PI3K</b>	rs2699887	GG+GG	66 (23,8)	59 (21,3)	Referência		Referência	
+		GG+GA	81 (29,2)	77 (27,8)	0,94 (0,59-1,50)	0,798	1,27 (0,55-2,91)	0,578
<b>AMACR</b>	rs3195676	GG+AA	25 (9,0)	41 (14,8)	0,55 (0,30-1,00)	0,051	0,54 (0,19-1,54)	0,246
		GA+GG	40 (14,4)	33 (11,9)	1,08 (0,61-1,93)	0,786	1,54 (0,53-4,44)	0,424
		GA+GA	33 (11,9)	39 (14,1)	0,76 (0,42-1,35)	0,347	0,52 (0,13-2,06)	0,597
		GA+AA	17 (6,1)	15 (5,4)	1,01 (0,47-2,21)	0,947	0,52 (0,13-2,06)	0,353
		AA+GG	1 (0,4)	4 (1,4)	0,22 (0,02-2,06)	0,186	-	-
		AA+AG	11 (4,0)	2 (0,7)	<b>4,92 (1,04-23,10)*</b>	<b>0,044</b>	3,58 (0,27-47,91)	0,335
		AA+AA	3 (1,1)	7 (2,5)	0,38 (0,10-1,55)	0,178	2,03 (0,13-32,91)	0,619

OR (IC95%): Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%. Ajustado para histórico familiar de câncer, histórico familiar de câncer de próstata e escolaridade. \*Valor estatisticamente significativo,  $p < 0.05$ .

**Apêndice 2 -** Frequências genótípicas dos genes *PTEN*, *AKT1*, *PI3K*, *AR* e *AMACR* associados com os parâmetros histopatológicos e clínico

Genes/rs	Genótipos	Bilateralidade (N=258)			Extensão extracapsular (N=257)			Invasão de vesícula seminal (N=257)			Invasão perineural (N=257)		
		P N (%)	A N (%)	OR (IC95%)	P N (%)	A N (%)	OR (IC95%)	P N (%)	A N (%)	OR (IC95%)	P N (%)	A N (%)	OR (IC95%)
<i>PTEN</i> Rs2735343	CC	27 (19,7)	24 (19,8)	Referência	15 (15,5)	36 (22,5)	Referência	8 (25,0)	43 (19,1)	Referência	7 (16,7)	44 (20,5)	Referência
	CG	57 (41,6)	53 (43,8)	0,96 (0,49-1,86)	47 (48,5)	62 (38,8)	1,82 (0,89-3,71)	12 (37,5)	97 (43,1)	0,67 (0,25-1,74)	21 (50,0)	88 (40,9)	1,50 (0,59-3,80)
	GG	53 (38,7)	44 (36,4)	1,07 (0,54-2,11)	35 (36,1)	62 (38,8)	1,36 (0,65-2,82)	12 (37,5)	85 (37,8)	0,76 (0,29-2,00)	14 (33,3)	83 (38,6)	1,06 (0,40-2,82)
	CG+GG	110 (80,3)	97 (80,2)	1,01 (0,55-1,86)	82 (84,5)	124 (77,5)	1,59 (0,82-3,08)	24 (75,0)	182 (80,9)	0,71 (0,30-1,69)	35 (83,3)	171 (79,5)	1,29 (0,54-3,09)
<i>AKT1</i> Rs2494750	CC	106 (77,4)	90 (74,4)	Referência	77 (79,4)	118 (73,8)	Referência	27 (84,4)	168 (74,7)	Referência	30 (71,4)	165 (76,7)	Referência
	CG	30 (21,9)	31 (25,6)	0,82 (0,46-1,46)	20 (20,6)	41 (25,6)	0,75 (0,41-1,37)	5 (15,6)	56 (24,9)	<b>0,56 (0,20-1,48)</b>	11 (26,2)	50 (23,3)	1,21 (0,57-2,59)
	GG	1 (0,7)	-	-	0 (0,0)	1 (0,6)	-	0 (0,0)	1 (0,4)	-	1 (2,4)	0 (0,0)	-
	CG+GG	31 (22,6)	31 (25,6)	<b>0,85 (0,48-1,50)</b>	20 (20,6)	42 (26,3)	0,73 (0,40-1,34)	5 (15,6)	57 (25,3)	<b>0,55 (0,20-1,51)</b>	12 (28,6)	50 (23,3)	1,32 (0,63-2,77)
<i>PI3K</i> Rs2699887	GG	85 (62,0)	73 (60,3)	Referência	61 (62,9)	96 (60,0)	Referência	19 (59,4)	138 (61,3)	Referência	30 (71,4)	127 (59,1)	Referência
	GA	44 (32,1)	41 (33,9)	0,92 (0,54-1,56)	31 (32,0)	54 (33,8)	0,90 (0,52-1,56)	12 (37,5)	73 (32,4)	1,19 (0,55-2,60)	11 (26,2)	74 (34,4)	0,63 (0,30-1,33)
	AA	8 (5,8)	7 (5,8)	0,98 (0,34-2,84)	5 (5,2)	10 (6,3)	0,79 (0,26-2,41)	1 (3,1)	14 (6,2)	0,52 (0,07-4,17)	1 (2,4)	14 (6,5)	0,30 (0,04-2,39)
	GA+AA	52 (38,0)	48 (39,7)	0,93 (0,56-1,54)	36 (37,1)	64 (40,0)	0,89 (0,53-1,49)	13 (40,6)	87 (38,7)	1,09 (0,51-2,31)	12 (28,6)	88 (40,9)	0,58 (0,28-1,20)
<i>AMACR</i> rs3591676	GG	60 (43,8)	41 (33,9)	Referência	37 (38,1)	64 (40,0)	Referência	19 (59,4)	82 (36,4)	Referência	20 (47,6)	81 (37,7)	Referência
	GA	58 (42,3)	56 (46,3)	0,71 (0,41-1,22)	43 (44,3)	70 (43,8)	1,06 (0,61-1,85)	8 (25,0)	105 (46,7)	<b>0,32 (0,13-0,78)*</b>	14 (33,3)	99 (46,0)	0,57 (0,27-1,21)
	AA	19 (13,9)	24 (19,8)	0,54 (0,26-1,11)	17 (17,5)	26 (16,3)	1,13 (0,54- 2,34)	5 (15,6)	38 (16,9)	0,56 (0,19-1,63)	8 (19,0)	35 (16,3)	0,93 (0,37-2,30)
	GA+AA	77 (56,2)	80 (66,1)	0,66 (0,40-1,09)	60 (61,9)	96 (60,0)	1,11 (0,65-1,88)	13 (40,6)	143 (63,6)	<b>0,39 (0,18-0,83)*</b>	22 (52,4)	134 (62,3)	0,67 (0,34-1,29)
<i>AR</i> rs17302090	G	56 (40,9)	38 (31,4)	Referência	34 (35,1)	60 (37,5)	Referência	16 (50,0)	68 (34,7)	Referência	18 (42,9)	76 (35,3)	Referência
	A	81 (59,1)	83 (68,6)	0,66 (0,40-1,11)	63 (64,9)	100 (62,5)	1,11 (0,66-1,88)	16 (50,0)	147 (65,3)	0,53 (0,25-1,12)	24 (57,1)	139 (64,7)	0,73 (0,37-1,43)

**Continuação Apêndice 2 -** Frequências genotípicas dos genes *PTEN*, *AKT1*, *PI3K*, *AR* e *AMACR* associados com os parâmetros histopatológicos e clínico

Genes/rs	Genótipos	Estadiamento (N=255)			Nível PSA (N=272)			Gleason (N=275)		
		T2 N (%)	T3-T4 N (%)	OR (IC95%)	0- 10,0 N (%)	>10,0 N (%)	OR (IC95%)	3 à 7 (3+4) N (%)	7 (4+3) à 10 N (%)	OR (IC95%)
<i>PTEN</i> Rs2735343	CC	35 (22,7)	16 (15,8)	Referência	31 (19,7)	24 (20,9)	Referência	47 (20,5)	8 (17,4)	Referência
	CG	58 (37,7)	50 (49,5)	1,89 (0,94-3,81)	63 (40,1)	50 (43,5)	1,03 (0,54-1,96)	95 (41,5)	19 (41,3)	1,18 (0,48-2,88)
	GG	61 (39,6)	35 (34,7)	1,26 (0,61-2,59)	63 (40,1)	41 (35,7)	0,84 (0,43-1,63)	87 (38,0)	19 (41,3)	1,28 (0,52-3,15)
	CG+GG	119 (77,3)	85 (84,2)	1,56 (0,81-3,00)	126 (80,3)	91 (79,1)	0,93 (0,51-1,70)	182 (79,5)	38 (82,6)	1,23 (0,54-2,81)
<i>AKT1</i> rs2494750	CC	114 (74,0)	80 (79,2)	Referência	122 (77,7)	85 (73,9)	Referência	171 (74,7)	37 (80,4)	Referência
	CG	40 (26,0)	21 (20,8)	0,75 (0,41-1,36)	34 (21,7)	30 (26,1)	1,27 (0,72-2,23)	57 (24,9)	9 (19,6)	0,73 (0,33-1,60)
	GG	0 (0,0)	0 (0,0)	-	1 (0,6)	0 (0,0)	0,99 (-)	1 (0,4)	0 (0,0)	-
	CG+GG	40 (26,0)	21 (20,8)	0,75 (0,41-1,36)	35 (22,3)	30 (26,1)	1,23 (0,70-2,16)	58 (25,3)	9 (19,6)	0,72 (0,33-1,58)
<i>PI3K</i> rs2699887	GG	94 (61,0)	62 (61,4)	Referência	101 (64,3)	68 (59,1)	Referência	143 (62,4)	28 (60,9)	Referência
	GA	51 (33,1)	34 (33,7)	1,01 (0,59-1,73)	51 (32,5)	37 (32,2)	1,08 (0,64-1,82)	74 (32,3)	15(32,6)	1,04 (0,52-2,06)
	AA	9 (5,8)	5 (5,0)	0,84 (0,27-2,63)	5 (3,2)	10 (8,7)	2,97 (0,97-9,07)	12 (5,2)	3 (6,5)	1,28 (0,34-4,82)
	GA+AA	60 (39,0)	39 (38,6)	0,96 (0,59-1,65)	56 (35,7)	47 (40,9)	1,25 (0,76-2,05)	86 (37,6)	18 (39,1)	1,07 (0,56-2,05)
<i>AMACR</i> rs3591676	GG	61 (39,6)	40 (39,6)	Referência	59 (37,6)	47 (40,9)	Referência	86 (37,6)	20 (43,5)	Referência
	GA	66 (42,9)	45 (44,6)	1,01 (0,59-1,65)	69 (43,9)	54 (47,0)	0,95 (0,58-1,66)	104 (45,4)	20 (43,5)	0,83 (0,42-1,64)
	AA	27 (17,5)	16 (15,8)	0,84 (0,27-2,63)	29 (18,5)	14 (12,2)	0,61 (0,29-1,28)	39 (17,0)	6 (13,0)	0,66 (0,25-1,78)
	GA+AA	93 (60,4)	61 (60,4)	0,99 (0,59-1,65)	98 (62,4)	68 (59,1)	0,87 (0,53-1,43)	143 (62,4)	26 (56,5)	0,78 (0,41-1,49)
<i>AR</i> rs17302090	G	58 (37,7)	36 (35,6)	Referência	54 (38,3)	44 (34,4)	Referência	79 (34,5)	19 (41,3)	Referência
	A	96 (62,3)	65 (64,4)	1,09 (0,65-1,84)	103 (65,6)	71 (61,7)	0,85 (0,51-1,40)	150 (65,5)	27 (58,7)	0,75 (0,39-1,43)

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que as variantes polimórficas dos genes *AKT1* e *AKT1+AR* foram associadas com proteção ao CaP.

As variantes dos genes *AMACR*, *AKT1+AR*, *AKT1+AMACR* promoveram proteção para invasão de vesícula seminal e as variantes genotípicas dos genes *AKT1+AR*, *AKT1+PI3K* proteção para bilateralidade do tumor. As variantes dos genes *PTEN+AMACR*, *PTEN+AR* apresentaram associação com risco para extensão extracapsular. Nenhuma associação genotípica foi observada em relação aos demais parâmetros analisados (PSA, escore de Gleason, invasão perineural e invasão de linfonodos).

Os resultados obtidos no presente estudo permitem indicar alguns SNPs como candidatos a marcadores de prognóstico e proteção ao câncer de próstata.

## 6. REFERÊNCIAS

- BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 10, p. 781–791, 2006.
- BELL, K. J. L.; DEL MAR, C.; WRIGHT, G.; DICKINSON, J.; GLASZIOU, P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 7, p. 1749–1757, 2015.
- BELTRAN, H.; RUBIN, M. A. New strategies in prostate cancer: Translating genomics into the clinic. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 3, p. 517–523, 2013.
- BERMAN, D. M.; EPSTEIN, J. I. When is prostate cancer really cancer? **Urologic Clinics of North America**, v. 41, n. 2, p. 339–346, 2014.
- BROECK, T. VAN DEN.; JONIAU, S.; CLINCKEMALIE, L.; et al. The role of single nucleotide polymorphisms in predicting prostate cancer risk and therapeutic decision making. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- CANCER RESEARCH UK – PROSTATE CANCER. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/prostate-cancer/stages/tnm-staging>. [Acesso em Jan. 2018].
- CHASMAN, D.; ADAMS, R. M. Predicting the functional consequences of non-synonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. **Journal of molecular biology**, v. 307, n. 2, p. 683–706, 2001.
- CICCARESE, C.; SANTONI, M.; BRUNELLI, M.; et al. AR-V7 and prostate cancer: The watershed for treatment selection? **Cancer Treatment Reviews**, v. 43, p. 27–35, 2016.
- COOK, L. S.; GOLDOFT, M.; SCHWARTZ, S. M.; WEISS, N. S. Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. **The Journal of Urology**, v. 161, n. 1, p. 152–155, 1999.
- CRAWFORD, E. D. Understanding the Epidemiology, Natural History, and Key Pathways Involved in Prostate Cancer. **Urology**, v. 73, n. 5 SUPPL., p. S4–S10, 2009.
- CREMERS, R. G.; ABEN, K. K.; VAN OORT, I. M.; et al. The clinical phenotype of hereditary versus sporadic prostate cancer: HPC definition revisited. **Prostate**, v. 76, n. 10, p. 897–904, 2016.
- DI CRISTOFANO, A.; PANDOLFI, P. P. The Multiple Roles of PTEN in Tumor Suppression. **Cell**, v. 100, n. 4, p. 387–390, 2000.
- CRONA, D. J.; MILOWSKY, M. I.; WHANG, Y. E. Androgen Receptor Targeting Drugs in Castration-Resistant Prostate Cancer and Mechanisms of Resistance. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 98, n. 6, p. 582–589, 2015.
- CRUMBAKER, M.; KHOJA, L.; JOSHUA, A. M. AR signaling and the PI3K pathway in prostate cancer. **Cancers**, 2017.

CULLEN, J.; ROSNER, I. L.; BRAND, T. C.; et al. A biopsy-based 17-gene genomic prostate score predicts recurrence after radical prostatectomy and adverse surgical pathology in a racially diverse population of men with clinically low- and intermediate-risk prostate cancer. **European Urology**, v. 68, n. 1, p. 123–131, 2015.

ESFAHANI, M.; ATAEI, N.; PANJEHPOUR, M. Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 7, p. 2601–2611, 2015.

EPSTEIN, J. I.; EGEVAD, L.; AMIN, M. B.; et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 244–252, 2016.

FALLAH, S.; KORANI, M.; HAJIMIRZA, M.; SEIFI, M. Association Between Genetic Variants of Akt1 and Endometrial Cancer. **Biochemical Genetics**, v. 53, n. 11–12, p. 281–290, 2015.

FELDMAN, B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 1, n. 1, p. 34–45, 2001.

FITZGERALD, L. M.; GEYBELS, S. Z. A. L. M. S.; LIN, S. K. D. W.; et al. Germline variants in IL4, MGMT and AKT1 are associated with prostate cancer-specific mortality: An analysis of 12,082 prostate cancer cases. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, p. 1–10, 2018.

FRANZ, M. C.; ANDERLE, P.; B??RZLE, M.; et al. Zinc transporters in prostate cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2–3, p. 735–741, 2013.

GEN-PROBE® (2010). "Ensaio PROGENSA® PCA3."

GIBSON, G. A Primer of Genome Science. 2009.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. *Introdução a Genética*. 2006.

HAAS, G. P.; DELONGCHAMPS, N.; BRAWLEY, O. W.; WANG, C. Y.; DE LA ROZA, G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. **The Canadian journal of urology**, v. 15, n. 1, p. 3866–3871, 2008.

HALPERN, J. A.; SHOAG, J. E.; MITTAL, S.; et al. Prognostic Significance of Digital Rectal Examination and Prostate Specific Antigen in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Arm. **Journal of Urology**, v. 197, n. 2, p. 363–368, 2017.

HAMDY, F. C.; DONOVAN, J. L.; LANE, J. A.; et al. 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 15, p. 1415–1424, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 2011.

HEEMERS, H. V.; TINDALL, D. J. Androgen receptor (AR) coregulators: A diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocrine Reviews*, v. 28, n. 7, p. 778–808, 2007.

HEIDENREICH, A.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *European Urology*, v. 59, n. 1, p. 61–71, 2011.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocrine Reviews*, 2004.

HENDRIKS, R. J.; VAN OORT, I. M.; SCHALKEN, J. A. Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: a review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, v. 20, n. 1, p. 12–19, 2017.

HENNESSY, B. T.; SMITH, D. L.; RAM, P. T.; LU, Y.; MILLS, G. B. Exploiting the PI3K/AKT Pathway for Cancer Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, n. 12, p. 988–1004, 2005.

HERS, I.; VINCENT, E. E.; TAVARÉ, J. M. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling*, v. 23, n. 10, p. 1515–1527, 2011.

HUMPHREY, P. A.; MOCH, H.; CUBILLA, A. L.; ULBRIGHT, T. M.; REUTER, V. E. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*, v. 70, n. 1, p. 106–119, 2016.

INCA. Instituto Nacional do Câncer  
(<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao++>)  
acesado 04/01/2018

INOUE, K.; FRY, E. A. Haploinsufficient tumor suppressor genes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.118 p.83-122. 2017.

JANG, Y.; LU, S. A.; CHEN, Z. P.; et al. Genetic polymorphisms of CCND1 and PTEN in progression of esophageal squamous carcinoma. *Genetics and Molecular Research*, v. 12, n. 4, p. 6685–6691, 2013.

JARVIS, T. R.; CHUGHTAI, B.; KAPLAN, S. A. Testosterone and benign prostatic hyperplasia. *Asian journal of andrology*, v. 17, n. 2, p. 212–6, 2015.

KARYADI, D. M.; ZHAO, S.; HE, Q.; MCINTOSH, L.; et al. Confirmation of genetic variants associated with lethal prostate cancer in a cohort of men from hereditary prostate cancer families. *International Journal of Cancer*, v.1; n. 136(9), p.2166-71, 2015.

KLOTZ, L.; VESPRINI, D.; SETHUKAVALAN, P.; et al. Long-term follow-up of a large active surveillance cohort of patients with prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 33, n. 3, p. 272–277, 2015.

KNUDSON, A. G. Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 68, n. 4, p. 820–823, 1971.

LEE, S. J.; JOUNG, J. Y.; YOON, H.; et al. Genetic variations of  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase are associated with sporadic prostate cancer risk in ethnically homogenous Koreans. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

LEHNINGER, N. D.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6. ed. Porto Alegre: ArtMed, Sarvier, p.1298, 2014.

LEVIN, A. M.; ZUHLKE, K. A.; RAY, A. M.; COONEY, K. A.; DOUGLAS, J. A. Sequence variation in  $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase and risk of early-onset and familial prostate cancer. **Prostate**, v. 67, n. 14, p. 1507–1513, 2007.

LI, C. F.; FANG, F. M.; LAN, J.; et al. AMACR amplification in myxofibrosarcomas: A mechanism of overexpression that promotes cell proliferation with therapeutic relevance. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 23, p. 6141–6152, 2014.

LI, Q.; YANG, J.; YU, Q.; et al. Associations between Single-Nucleotide Polymorphisms in the PI3K-PTEN-AKT-mTOR Pathway and Increased Risk of Brain Metastasis in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 22, p. 6252–6260, 2013.

LI, X.; ZHANG, R.; LIU, Z.; LI, S.; XU, H. The genetic variants in the PTEN / PI3K / AKT pathway predict susceptibility and CE ( A ) F chemotherapy response to breast cancer and clinical outcomes. , v. 8, n. 12, p. 20252–20265, 2017.

LIN, D. W. Beyond PSA: Utility of novel tumor markers in the setting of elevated PSA. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, 2009.

LIN, L.; ZHANG, Z.; ZHANG, W.; WANG, L.; WANG, J. Roles of genetic variants in the PI3K/PTEN pathways in susceptibility to colorectal carcinoma and clinical outcomes treated with FOLFOX regimen. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 10, p. 13314–13322, 2015.

LINDSTRÖM, S.; ADAMI, H. O.; B??LTER, K. A.; et al. Inherited variation in hormone-regulating genes and prostate cancer survival. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 17, p. 5156–5161, 2007.

LINDSTRÖM, S.; WIKLUND, F.; ADAMI, H. O.; et al. Germ-line genetic variation in the key androgen-regulating genes androgen receptor, cytochrome P450, and steroid-5-??-reductase type 2 is important for prostate cancer development. **Cancer Research**, v. 66, n. 22, p. 11077–11083, 2006.

LIU, Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 9, n. 3, p. 230–234, 2006.

LIU, Y.; HU, F.; LI, D.; et al. Does physical activity reduce the risk of prostate cancer? A systematic review and meta-analysis. **European Urology**, v. 60, n. 5, p. 1029–1044, 2011.

LOEB, S.; FOLKVALJON, Y.; ROBINSON, D.; et al. Evaluation of the 2015 Gleason Grade Groups in a Nationwide Population-based Cohort. **European Urology**, v. 69, n. 6, p. 1135–1141, 2016.

LONERGAN, P. E.; TINDALL, D. J. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. **Journal of carcinogenesis**, v. 10, n. 1, p. 20, 2011.

LÖVGREN, J.; VALTONEN-ANDRÉ, C.; MARSAL, K.; LIUA, H.; LUNDWALL, Å. Measurement of Prostate-Specific Antigen and Human Glandular Kallikrein 2 in Different Body Fluids. **Journal of Andrology**, v. 20, n. 3, p. 348–355, 1999.

LUO, H. R.; HATTORI, H.; HOSSAIN, M. A.; et al. Akt as a mediator of cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 20, p. 11712–7, 2003.

MADU, C. O.; LU, Y. Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. **Journal of Cancer**, v. 1, n. 1, p. 150–177, 2010.

MARTIN, S. K.; VAUGHAN, T. B.; ATKINSON, T.; ZHU, H.; KYPRIANOU, N. Emerging biomarkers of prostate cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 28, n. 2, p. 409–417, 2012.

MCNEAL, J. E. Normal histology of the prostate. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 12, n. 8, p. 619-633, 1988.

MOHLER, M. L.; COSS, C. C.; DUKE, C. B. 3RD; et al. Androgen receptor antagonists: a patent review (2008-2011). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 22, n. 5, p. 541–565, 2012.

MOLINARI, F.; FRATTINI, M. Functions and regulation of the *PTEN* gene in colorectal cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 3, n. January, p. 1–8, 2014.

O'CONNOR, M. J. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. **Molecular Cell**, v. 60, n. 4, p. 547–560, 2015.

PACKER, B. R.; YEAGER, M.; BURDETT, L.; WELCH, R.; BEERMAN, M. SNP 500 Cancer: a public resource for sequence validation and assay development for genetic variation in candidate genes. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 528, 2004.

PAINTER, J. N.; KAUFMANN, S.; O'MARA, T. A.; et al. A Common Variant at the 14q32 Endometrial Cancer Risk Locus Activates AKT1 through YY1 Binding. **American Journal of Human Genetics**, v. 98, n. 6, p. 1159–1169, 2016.

PONIAH, P.; MOHD ZAIN, S.; ABDUL RAZACK, A. H.; et al. Genome-wide copy number analysis reveals candidate gene loci that confer susceptibility to high-grade prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 35, n. 9, p. 545.e1-545.e11, 2017.

PU, X.; HILDEBRANDT, M. A. T.; LU, C.; et al. NIH Public Access. , v. 71, n. 1, p. 82–88, 2012.

REBBECK, T. R. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. **Seminars in Radiation Oncology**, v. 27, n. 1, p. 3–10, 2017.

RODDAM, A. W.; ALLEN, N. E.; APPLEBY, P.; KEY, T. J. Endogenous sex hormones and prostate cancer: A collaborative analysis of 18 prospective studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 3, p. 170–183, 2008.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, 2016.

SAWYERS, C. L. The cancer biomarker problem. *Nature*, v. 452, n. 7187, p. 548–552, 2008.

SCHROEDER, F. H. S30. **Review of best markers for prostate cancer**, v. 3, n. 3, p. 2008, 2008.

SFANOS, K. S.; ISAACS, W. B.; DE MARZO, A. M. Infections and inflammation in prostate cancer. **American journal of clinical and experimental urology**, v. 1, n. 1, p. 3–11, 2013.

SOMMARIVA, S.; TARRICONE, R.; LAZZERI, M.; RICCIARDI, W.; MONTORSI, F. Prognostic Value of the Cell Cycle Progression Score in Patients with Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **European Urology**, v. 69, n. 1, p. 107–115, 2016.

STAMEY, T. A.; YANG, N.; HAY, A. R.; et al. Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. **The Journal of Urology**, v. 139, n. 5, p. 1134, 1988.

SUN, T.; LEE, G. S. M.; WERNER, L.; et al. Inherited variations in AR, ESR1, and ESR2 genes are not associated with prostate cancer aggressiveness or with efficacy of androgen deprivation therapy. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 19, n. 7, p. 1871–1878, 2010.

GLEASON, D.F. The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. **In: Tannenbaum M (ed). Urologic Pathology: The Prostate. Lea & Febiger**, Philadelphia, chapter 9, p. 171–197, 1977.

THOMPSON, I. M.; GOODMAN, P.J.; TANGEN, C. M.; et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.349 n. 3, p. 215–224, 2003.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; et al. Global Cancer Statistics, 2012. **CA: a cancer journal of clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TOSOIAN, J. J.; CARTER, H. B.; LEPOR, A.; LOEB, S. Active surveillance for prostate cancer: Current evidence and contemporary state of practice. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 4, p. 205–215, 2016.

TOSS, A.; TOMASELLO, C.; RAZZABONI, E.; et al. Hereditary ovarian cancer: Not only BRCA 1 and 2 Genes. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, 2015.

VAIDYANATHAN, V.; NAIDU, V.; KARUNASINGHE, N.; et al. SNP-SNP interactions as risk factors for aggressive prostate cancer. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 621, 2017.

VANACORE, D.; BOCCELLINO, M.; ROSSETTI, S.; et al. Micrnas in prostate cancer: an overview. **Oncotarget**, 2017.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489–501, 2002.

WANG, C.; NIE, H.; LI, Y.; et al. The study of the relation of DNA repair pathway genes SNPs and the sensitivity to radiotherapy and chemotherapy of NSCLC. **Scientific reports**, v. 6, n. June, p. 26526, 2016.

WELTY, C. J.; COOPERBERG, M. R.; CARROLL, P. R. Meaningful end points and outcomes in men on active surveillance for early-stage prostate cancer. **Current Opinion in Urology**, v. 24, n. 3, p. 288–292, 2014.

WHO, 2017. About the cancer control programme. <<http://www.who.int/cancer/en/>> acessado 09/01/2018.

WISE, H. M.; HERMIDA, M. A.; LESLIE, N. R. Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. **Clinical Science**, v. 131, n. 3, p. 197–210, 2017.

WORBY, C. A.; DIXON, J. E. Pten. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 641–669, 2014.

WRIGHT, J. L.; NEUHOUSER, M. L.; LIN, D. W.; et al. AMACR polymorphisms, dietary intake of red meat and dairy and prostate cancer risk. **Prostate**, v. 71, n. 5, p. 498–506, 2011.

XU, J.; WANG, Z.; HU, L.; YIN, Z. Genetic variants in the PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway predict platinum-based chemotherapy response of advanced non-small cell lung cancers in a Chinese. **Asian Pacific Journal**, v. 13, n. 4, p. 2157–2162, 2012.

ZHANG, J.; YU, X. H.; YAN, Y. G.; WANG, C.; WANG, W. J. PI3K/Akt signaling in osteosarcoma. **Clinica Chimica Acta**, v. 444, p. 182–192, 2015.

ZHANG, Y.; KWOK-SHING NG, P.; KUCHERLAPATI, M.; et al. A Pan-Cancer Proteogenomic Atlas of PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations. **Cancer Cell**, v. 31, n. 6, p. 820–832.e3, 2017.

ZHU, J.; WANG, M.; HE, J.; et al. Polymorphisms in the AKT1 and AKT2 genes and oesophageal squamous cell carcinoma risk in an Eastern Chinese population. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 20, n. 4, p. 666–677, 2016.

## 6 APÊNDICES

### APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes

Nós, Ilce Mara de Syllos Cólus e Marilesia Ferreira de Souza da Universidade Estadual de Londrina o convidamos para nossa pesquisa e solicitamos sua colaboração e o seu consentimento para incluí-lo em nosso projeto de pesquisa “Estudo comparativo do perfil transcricional e genotípico de genes relacionados ao câncer de próstata entre indivíduos sadios e portadores desta neoplasia para o desenvolvimento de assinaturas gênicas com fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos”. O objetivo deste estudo é avaliar alguns fatores genéticos que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e na terapia de pacientes portadores de câncer de próstata. Assim, solicitamos a sua colaboração como voluntário neste projeto onde vamos avaliar e comparar as semelhanças e diferenças entre dois grupos de pessoas: sadias e com câncer. Portanto, solicitamos a sua autorização para que uma pequena quantidade de seu sangue (10 ml) seja coletada via punção venosa (picada na veia) com seringa e agulha descartáveis. Esclarecemos que não haverá desconforto físico adicional para a sua pessoa, além da picada da agulha.

Caso o senhor tenha que realizar prostatectomia (operação de retirada parcial ou total da próstata), solicitamos também sua permissão para que, depois de realizada a cirurgia e da amostra da sua próstata ter sido utilizada pelo laboratório do Hospital para diagnóstico, possamos coletar uma pequena amostra deste tecido que não foi utilizado pelo Hospital, mas que fica armazenado. Desta forma, a coleta do material para análise genética ocorrerá somente após a finalização do seu diagnóstico e não trará riscos adicionais ao seu tratamento. Pedimos sua autorização para que moléculas (DNA, RNA ou proteínas) obtidas a partir da amostra de sangue e/ou tecido possam ser armazenadas para estudos futuros no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, quando será solicitada nova autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEL para a realização das pesquisas posteriores. O material obtido ficará armazenado no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, sob responsabilidade dos pesquisadores responsáveis por esta pesquisa. Esclarecemos ainda que a autorização para manutenção destas amostras é por prazo indeterminado, podendo ser cancelada por aviso escrito à responsável pelo Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina.

Solicitamos também sua autorização para que possamos consultar seu prontuário médico (que fica no Hospital do Câncer de Londrina) e obter alguns dados clínicos. Solicitamos-lhe o preenchimento de um questionário sobre seu estilo de vida, histórico de

exposição ocupacional, onde o senhor será identificado apenas por um código, preservando sua identidade. Este questionário ficará armazenado no laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina e somente poderão ter acesso a ele os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa.

Sua identidade não será revelada e será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas. Esclarecemos que o senhor a qualquer momento tem a liberdade de se recusar a contribuir com o estudo, sem ser prejudicado no seu tratamento e acompanhamento médico. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, preservando sua identidade.

Esclarecemos que sua participação é voluntária, não lhe trará nenhum gasto e que o senhor não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados desta pesquisa. Provavelmente os resultados desta pesquisa não trarão benefícios para a sua pessoa, mas poderão contribuir, no futuro, para uma melhora nos testes diagnósticos e prognósticos, assim como na conduta terapêutica para pacientes com câncer de próstata, melhorando assim, a qualidade de vida destes pacientes.

No caso de autorizado, o senhor deverá assinar este Termo de Consentimento.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo Ilce Mara de Syllos Cólus e Marilesia Ferreira de Souza, poderão ser contatados pelos telefones 3371-4608, 3371-4191, 9648-1918 ou no endereço rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Campus Universitário, Centro de Ciências Biológicas, Bloco 11, Laboratório de Mutagenese e Oncogenética. Sempre que solicitados, estarão à sua disposição para esclarecimento de quaisquer questões relacionadas a esta pesquisa. O senhor também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone 3371-2490 ou pelo endereço Rua Robert Koch, 60 – Vila Operária ou pelo e-mail: cep268@uel.br.

Agradecemos-lhe a valiosa colaboração.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilce Mara de Syllos Cólus  
Assinatura do pesquisador responsável

---

Marilesia Ferreira de Souza  
Coletor / Entrevistador

## APÊNDICE B - Consentimento pós informado para pacientes

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios da pesquisa. Concordo, portanto, em participar na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade, autorizando a coleta e o armazenamento de amostras de moléculas obtidas a partir dos meus fluídos (sangue) e tecidos para pesquisas futuras bem como os dados do questionário que respondi. Por ser expressão de verdade firmo o presente termo.

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Telefone: (\_\_\_\_) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos controles

Nós, Ilce Mara de Syllos Cólus e Marilesia Ferreira de Souza da Universidade Estadual de Londrina o convidamos para nossa pesquisa e solicitamos sua colaboração e o seu consentimento para incluí-lo em nosso projeto de pesquisa “Estudo comparativo do perfil transcricional e genotípico de genes relacionados ao câncer de próstata entre indivíduos sadios e portadores desta neoplasia para o desenvolvimento de assinaturas gênicas com fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos”. O objetivo deste estudo é avaliar alguns fatores genéticos que possam auxiliar no diagnóstico, prognóstico e na terapia de pacientes portadores de câncer de próstata.

O presente estudo terá dois grupos de indivíduos, um composto por pacientes com câncer de próstata e outro composto por pessoas sem histórico de câncer, denominados controles. Solicitamos a sua colaboração como voluntário neste projeto, como um dos membros do grupo denominado controles, ou seja, no grupo de pessoas livres de câncer.

Sua participação neste projeto é muito importante para nós, uma vez que necessitamos avaliar e comparar as semelhanças e diferenças entre estes dois grupos (pessoas sadias e pessoas com câncer). A partir desta comparação esperamos determinar quais são as características genéticas que predominam no grupo dos pacientes e quais são as mais frequentes no grupo dos indivíduos livres de câncer. Com isto, pretende-se contribuir para a melhora no prognóstico, diagnóstico e na conduta terapêutica para os pacientes com câncer.

Assim, solicitamos a sua autorização para que uma pequena quantidade de seu sangue (10 ml) seja coletada via punção venosa (picada na veia) com seringa e agulha descartáveis. Esclarecemos que não haverá desconforto físico adicional para a sua pessoa, além da picada da agulha.

Pedimos sua autorização para que moléculas (DNA, RNA ou proteínas) obtidas a partir da amostra de seu sangue possam ser armazenadas para estudos futuros no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, quando será solicitada nova autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEL para a realização das pesquisas posteriores. O material obtido ficará armazenado no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, sob responsabilidade dos pesquisadores responsáveis por esta pesquisa. Esclarecemos ainda que a autorização para manutenção destas amostras é por prazo indeterminado, podendo ser cancelada por aviso escrito à responsável pelo Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina. Solicitamos-lhe o preenchimento de um questionário sobre seu estilo de vida, histórico de exposição ocupacional, onde o senhor será identificado apenas por um código, preservando sua identidade. Este questionário ficará armazenado no

laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina e somente poderão ter acesso a ele os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa.

Sua identidade não será revelada e será mantido o caráter confidencial de todas as informações obtidas. Esclarecemos que o senhor a qualquer momento tem a liberdade de se recusar a contribuir com o estudo. Os resultados do estudo serão divulgados em congressos científicos e publicados em revistas especializadas, preservando sua identidade.

Esclarecemos que sua participação é voluntária e não lhe trará nenhum gasto e que o senhor não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados desta pesquisa. Provavelmente os resultados desta pesquisa não trarão benefícios para a sua pessoa, mas poderão contribuir, no futuro, para uma melhora nos testes diagnósticos e prognósticos, assim como na conduta terapêutica para pacientes com câncer de próstata, melhorando assim, a qualidade de vida destes pacientes.

Os pesquisadores responsáveis por este estudo Ilce Mara de Syllos Cólus e Marilesia Ferreira de Souza, poderão ser contatados pelos telefones 3371-4608, 3371-4191, 9648-1918 ou no endereço rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Campus Universitário, Centro de Ciências Biológicas, Bloco 11, Laboratório de Mutagenese e Oncogenética. Sempre que solicitados, estarão à sua disposição para esclarecimento de quaisquer questões relacionadas a esta pesquisa. O senhor também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone 3371-2490 ou pelo endereço Rua Robert Koch, 60 – Vila Operária ou pelo e-mail: cep268@uel.br.

No caso de autorizado, o senhor deverá assinar este Termo de

Consentimento. Agradecemos-lhe a valiosa colaboração.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ilce Mara de Syllos Cólus

Assinatura do pesquisador responsável

---

Marilesia Ferreira de Souza

Coletor / Entrevistador

## APÊNDICE D - Consentimento pós-informado para indivíduos controles

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios da pesquisa. Concordo, portanto, em participar na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade, autorizando a coleta e o armazenamento de amostras de moléculas obtidas a partir dos meus fluídos (sangue) para pesquisas futuras bem como os dados do questionário que respondi. Por ser expressão de verdade firmo o presente termo.

Nome do Voluntário:

\_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_



Código n° \_\_\_\_\_

**HISTÓRICO PESSOAL**

- 1- Registro hospitalar: \_\_\_\_\_
- 2- Sexo: ( ) masculino ( ) feminino
- 3- Qual a cor da sua pele?  
 Negro ( ) Branco( ) Amarelo ( ) Outros ( )
- 4- Idade:\_\_\_\_\_ Data de Nascimento:\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_
- 5- Local de nascimento: Paraná ? ( ) SIM ( ) NÃO  
 Se NÃO: Que região brasileira ? Norte ( ) Sul ( ) Nordeste ( ) Centro-Oeste ( )  
 Sudeste ( )
- 6- Sua moradia é na zona rural ou urbana? ( ) Rural ( ) Urbana
- 7- Quanto tempo vive neste local? \_\_\_\_\_anos \_\_\_\_\_meses
- 8- Qual o seu grau de instrução?  
 ( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto ( ) 1º grau completo ( ) 2º grau incompleto  
 ( ) 2º grau completo ( ) técnico ( ) profissional ( ) superior

**Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho**

9- Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?

Se SIM, por quanto tempo e a quanto tempo foi isso:

- |                                      |         |         |
|--------------------------------------|---------|---------|
| Derivados de petróleo                | ( )sim  | ( )não  |
| (querosene, gasolina, solventes,...) |         |         |
| Tintas/ corantes                     | ( )sim  | ( )não  |
| Indústrias têxteis ou tecelagem      | ( ) sim | ( ) não |
| Praguicidas / Herbicidas             | ( )sim  | ( )não  |
| Radiação                             | ( )sim  | ( )não  |
| Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...)      | ( )sim  | ( )não  |
| Processamento de madeira             | ( )sim  | ( )não  |
| Papel ou celulose                    | ( )sim  | ( )não  |
| Mineração                            | ( )sim  | ( ) não |
| Fábrica de sapatos ou curtume        | ( )sim  | ( )não  |
| Metalúrgica                          | ( )sim  | ( )não  |
| Usina de açúcar ou álcool            | ( )sim  | ( )não  |

Plástico ou borracha  sim  não

Outras substâncias químicas  sim  não

10- Se SIM para a pergunta acima: Você utilizava equipamentos de proteção individual para trabalhar com essas substâncias químicas? (máscaras, luvas, óculos, etc.)

a)  sim b)  não

### **Histórico Tabagista**

11- Você fuma atualmente?  SIM  NÃO

12- Se SIM, quanto você fuma por dia?  menos de ½ maço

de meio a 1 maço

mais de um maço

13- Se SIM, há quanto tempo você fuma? \_\_\_\_\_

14- Se NÃO, mas já fumou algum dia: há quanto tempo parou de fumar?

a)  0-5 anos b)  5-10 anos c)  >10

15- Você convive/conviveu em seu trabalho ou em casa com pessoas que fumam?

a)  SIM b)  NÃO

### **Histórico de Etilismo**

16- Você consome bebidas alcoólicas?  SIM  NÃO

17- Se SIM, que tipo de bebida alcoólica você costuma consumir?

a)  Destiladas b)  Não-Destiladas c)  Outra d)  Ambas

18- Quanto você costuma beber por semana?

no máximo um copo  de 2 a 5 copos  de 6 a 10  mais de 10

19- Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?

a)  0-5 anos.    b)  5 –10 anos.    c)  mais 10 anos.

20- Quanto você costumava beber por semana?

no máximo um copo     de 2 a 5 copos     de 6 a 10     mais de 10

21- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?

SIM     NÃO

### Histórico de Saúde

22- Nos últimos 12 anos você automedicou-se ou recebeu medicamentos?

SIM     NÃO     não sabe

Se SIM

Hormônio

Antiinflamatório

Analgésicos

Antipertensivos

Anabolizantes

Outros

23- Você toma vitaminas ou tem tomado nos últimos seis meses?

SIM                       NÃO               não sabe

24 – Você já foi submetido a cirurgia nos testículos?

SIM     NÃO

Qual? \_\_\_\_\_

25- Você foi tratado anteriormente de algum tipo de câncer?  SIM     NÃO

Qual? \_\_\_\_\_

26- Você tem antecedentes de câncer na sua família?  SIM     NÃO

27- Em casos de câncer na família, qual era o vínculo de parentesco?  
 Pai  Mãe  Irmão  Filho  Tio  Primo  Outro

28- Qual foi a localização do tumor?  
 Próstata  Mama  Bexiga  Outro (qual?)

---

29 – Você já teve alguma doença sexualmente transmissível?  
 SIM  NÃO

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

### **Histórico alimentar: (refira-se somente a hábitos frequentes)**

30- Você segue uma dieta vegetariana?  SIM  NÃO

31- Você come carne?  SIM  NÃO

32- Se SIM, com que frequência você come estes alimentos:

Dias/Semana

---

	1-2	3-4	5-6	Diariamente
Carne de gado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Peixe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frango	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Porco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Outros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

### **Histórico genético**

33- Você possui algum irmão idêntico?  SIM  NÃO

## 6 ANEXO

## ANEXO A – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEL



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
 Universidade Estadual de Londrina  
 Registro CONEP 5231

<b>Parecer CEP/UEL:</b>	176/2013
<b>CAAE:</b>	19769913.0.0000.5231
<b>Data da Relatoria:</b>	19/09/2013
<b>Pesquisador(a):</b>	Ilce Mara de Syllos Cólus
<b>Unidade/Órgão:</b>	CCB - Departamento de Biologia Geral

Prezado(a) Senhor(a):

O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

**"Estudo comparativo do perfil transcricional e genotípico de genes relacionados ao câncer de próstata entre indivíduos sadios e portadores desta neoplasia para o desenvolvimento de assinaturas gênicas com fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos."**

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 27 de setembro de 2013. .

**Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos  
 Universidade Estadual de Londrina

