



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MILENE ROLDÃO DE SOUZA

**“ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO
NOS GENES *CASP3*, *CASP9*, *BCL-2* E *NKX3-1* EM UM
ESTUDO DO TIPO CASO-CONTROLE NA BUSCA POR
MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE E PROGNÓSTICO
PARA CÂNCER DE PRÓSTATA”**

Londrina
2017



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Embrapa Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Milene Roldão de Souza

**“Análise de polimorfismo de nucleotídeo único nos genes *CASP3*,
CASP9, *BCL-2* e *NKX3-1* em um estudo do tipo caso-controle na
busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico para
câncer de próstata”**

Londrina

2017

MILENE ROLDÃO DE SOUZA

**“ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO
NOS GENES *CASP3*, *CASP9*, *BCL-2* E *NKX3-1* EM UM
ESTUDO DO TIPO CASO-CONTROLE NA BUSCA POR
MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE E PROGNÓSTICO
PARA 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.

Orientador: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllós
Cólus

Londrina
2017

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

Souza, Milene.

Análise de polimorfismo de nucleotídeo único nos genes CASP3, CASP9, BCL-2 e NKX3-1 em um estudo do tipo caso-controle na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico para câncer de próstata / Milene Souza. - Londrina, 2017.
92 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Câncer de próstata - Tese. 2. Suscetibilidade - Tese. 3. SNP - Tese. 4. Prognóstico Tese. I. de Syllos Cólus, Ilce Mara. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

MILENE ROLDÃO DE SOUZA

“ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NOS GENES *CASP3*, *CASP9*, *BCL-2* E *NKX3-1* EM UM ESTUDO DO TIPO CASO-CONTROLE NA BUSCA POR MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE E PROGNÓSTICO PARA CÂNCER DE PRÓSTATA”

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Ilce Mara de Syllós
Cólus
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Lusânia Maria Greggí Antunes
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto – USP

Profa. Dra. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 17 de março de 2017

APOIO FINANCEIRO

- Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, convênio 185/2014, financiamento da pesquisa
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Bolsa de Mestrado Demanda Social/ PROAP.
- Universidade Estadual de Londrina (UEL).

AGRADECIMENTOS

A Deus e Maria, pois sem Eles eu nada teria conseguido!

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Às instituições Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema (CISMEPAR), clínica UROLIT, Irmandade da Santa Casa de Londrina e Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina por toda colaboração na aquisição das amostras.

À banca examinadora, carinhosamente escolhida, por dispor do seu tempo para contribuir com este trabalho, muito obrigada.

À minha querida orientadora Dra.Profa. Ilce Mara de Syllos Cólus, por me aceitar, me ensinar, acreditar em mim e me orientar cientificamente, profissionalmente e pessoalmente. Por todos os conselhos, todas as broncas, preocupações, horas de dedicação para com meu trabalho, amizade e cuidado de mãe ao longo desse tempo. Muitíssimo obrigada!

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani por disponibilizar seu laboratório para realização das genotipagens.

Ao Ms. Adivanio Baranoski pela ajuda e paciência na instalação do programa necessário para análise das genotipagens.

Às minhas queridíssimas amigas de laboratório e de vida Heloísa L. Cilião, Marilesia F. de Souzae, Monyse de Nóbrega, que me ajudaram em todas as etapas da pesquisa, desde a teoria até a prática, independentemente de hora ou dia. Por toda a ajuda pessoal que vocês me ofereceram, seja me hospedando ou cuidando de mim nas vezes que fiquei doente. Além disso, pelas experiências incríveis em congressos, viagem, barzinhos, almoços e bebedeiras. Foi inesquecível.

A todos meus queridos amigos de laboratório Maressa Malini, Katiuska Tuttis, Juliana Mara Serpeloni, Ana Flávia L. Specian, Beatriz B. Mattos, Roberta Losi-Guembarovski, Higor L. Nunes, Diego Luis Ribeiro, Diego Morandi, Matheus Scheffer e Rossana B. de Godoy-Camargo pelas festas maravilhosas, pelas horas de conversas e infinitas risadas que fizeram com que todas as dificuldades parecessem mais leves, diminuindo o fardo que é estar longe de casa. Vocês fizeram com que eu me sentisse em casa. Obrigada de coração.

Aos amigos que fiz dentro do Programa de Pós-Graduação, em especial Ana Camila M. Jardim e Gilberto P. de Aguiar, que estavam sempre comigo, me consolando, me

fazendo rir demais ou só passando o tempo com conversas ora intelectuais, ora banais.

Ao querido técnico de laboratório Dário Paschoal Tormena por toda ajuda e pelas conversas agradáveis.

Aos meu pais Eleni Cristina e Odair Roldão (*in Memoriam*) por exatamente tudo! Por toda educação, amor, carinho, dedicação e esforço para que eu chegasse até onde cheguei. Sei que tenho vocês do meu lado sempre, onde quer que estejam. Amo vocês mais que a mim mesma, vocês são minha vida!

Aos meus irmãos Michelle Cristina e Edison Rafael, por serem muito mais que irmãos. Por muitas vezes sacrificarem seus objetivos para que os meus fossem alcançados. Sei de toda luta que enfrentaram por mim e sou extremamente grata. Vocês são parte de mim e eu os amo demais. Muito obrigada.

Às minhas sobrinhas Lara Cristina Rafael, Maria Clara Rafael e Valentina Rafael, por me mostrarem um amor que não conhecia, e por me motivarem sempre a continuar. Por me mostrarem a força que o exemplo pode ter. Se eu continuo é por vocês também. Amo vocês, minhas princesas.

À minha tia Elzita Ferreira de Souza por tudo que sempre foi na minha vida e por tudo que é, tia, mãe e amiga. Obrigada por sempre me amar como filha e me proteger. Obrigada por ser parte tão presente da minha história e sempre me apoiar, amo você!

Meus padrinhos Ari Soster e Ivani Soster, por me amarem, me apoiarem e me ajudarem sempre. Vocês são incomparáveis e eu amo vocês!

Ao meu amado e minha eterna paixão, Felipe Viegas Rodrigues, por me dar forças e me incentivar em todos os momentos. Me acalmando quando o desespero tomava conta e sempre me fazendo crescer em todos os sentidos. Por toda paciência e carinho em todos esses anos. Você foi essencial, muito obrigada. Amo você!

Às minhas amigas de sempre Mônica Cardoso, Talita Cardoso e Mariana Bosso, por todo amor e carinho que sempre dedicaram a mim. Por horas de conversas que faziam com que a distância fosse um detalhe tão pequeno, que quase esquecíamos que ela existia. Vocês são muito mais do que amigas, muito obrigada.

À minha parceira de faculdade, de pós-graduação, de moradia e de vida Nayara Anitelli. Você é e sempre será a pessoa que eu vou correr para pedir ajuda, seja para me socorrer com referências, hospital ou tudo mesmo, pois sei que posso

contar com você em qualquer momento e circunstância. Minha amiga de alma, obrigada por ser tudo que você é em minha vida, te amo!

Às minhas amigas de infância Julia Maria, Dayara Moreira e Kelly Rodrigues por todas risadas, loucuras e companheirismo que me fazem ser quem sou. Minhas amigas/irmãs, obrigada por todo zelo e amizade!

Às minha queridas terapeutas e amigas Diane Zanqueta e Fabíola Miranda por toda ajuda, sem vocês eu não teria conseguido permanecer no eixo com tanta coisa acontecendo ao mesmo tempo. Vocês foram e são demais!

A todos familiares e amigos que ajudaram direta ou indiretamente nessa caminhada. Muito obrigada.

SOUZA, Milene Roldão de. “Análise de polimorfismo de nucleotídeo único nos genes *CASP3*, *CASP9*, *BCL-2* e *NKX3-1* em um estudo do tipo caso-controle na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico para câncer de próstata”. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Em decorrência da gravidade do câncer de próstata (CaP) e da falta de métodos diagnósticos precisos, a busca por novos marcadores moleculares que possam ser utilizados para suscetibilidade e prognóstico desta doença tem se intensificado, visando a implementação destes marcadores na prática clínica. Polimorfismos em genes envolvidos no processo de apoptose *BCL-2*, *CASP3* e *CASP9*, e o gene supressor tumoral *NKX3-1* têm sido associados com o risco ou com proteção ao CaP. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo caso-controle, avaliando a possível associação das variantes alélicas dos polimorfismos rs2279115 (*BCL-2*), rs4647603 (*CASP3*), rs1052571 (*CASP9*) e rs11781886 (*NKX3-1*) com a suscetibilidade, prognóstico e progressão do CaP. Amostras de sangue periférico foram obtidas de 283 pacientes que apresentaram confirmação histopatológica do CaP e seus controles pareados (PSA inferiores a 4 ng/mL). As genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real usando sonda TaqMan®. 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. Mostraram associação com a doença os genótipos *CASP3* (CT+TT), *CASP9* (GA+AA) e *NKX3-1* (CC), bem como os genótipos combinados em pares *BCL-2*+*NKX3-1* (CC+CC) e *CASP3*+*NKX3-1* (CT+CC). A análise univariada dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) com os dados histopatológicos do tumor, indicou associação das variantes alélicas de *BCL-2* (CA e/ou AA e/ou CA+AA) com extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, invasão perineural, bilateralidade e pior estadiamento do tumor, além de níveis elevados de PSA. As variantes alélicas de *NKX3-1* (CC e TC+CC) também apresentaram associação com bilateralidade, enquanto que genótipos de *CASP3* (TT+TC) demonstraram associação com estadiamento tumoral. Análise dos polimorfismos combinados em pares indicou associação entre os genótipos de *BCL-2*+*CASP3* com extensão extracapsular (CA+CC, CA+CT e AA+CT), bilateralidade (CA+CC), estadiamento T3 e T4 (CA+CC, CA+CT e AA+CT) e níveis elevados de PSA (CA+CT e AA+CC), enquanto que genótipos de *BCL-2*+*NKX3-1* mostraram associação com extensão extracapsular (CA+TC), bilateralidade (CA+TC e CC+CC) e estadiamento T3 e T4 (CA+CC). Os dados obtidos permitem inferir que o polimorfismo rs1052571 do gene *CASP9* parece conferir suscetibilidade ao CaP, enquanto que o rs2279115 do gene *BCL-2*, pior prognóstico aos pacientes. Os polimorfismos avaliados dos genes *CASP3* e *NKX3-1* parecem conferir tanto suscetibilidade, quanto pior prognóstico, não apenas de forma isolada, mas também quando combinados.

Palavras-chave: SNP. Suscetibilidade. Parâmetros histopatológicos. Prognóstico. PSA.

SOUZA, Milene Roldão de. “Análise de polimorfismo de nucleotídeo único nos genes *CASP3*, *CASP9*, *BCL-2* e *NKX3-1* em um estudo do tipo caso-controle na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico para câncer de próstata”. 2017. 92 p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

As a consequence of the severity of prostate cancer (PCa) and the lack of precise diagnostic methods, the search for new molecular markers that can be used for susceptibility and prognosis of this disease have been intensified, aiming at an implementation of these markers in clinical practice. Polymorphisms in genes involved in the process of apoptosis *BCL-2*, *CASP3* and *CASP9*, and the tumor suppressor gene *NKX3-1* have been associated with risk or with protection to PCa. The purpose of this study was to perform a case-control study, evaluating a possible association of allelic variants of polymorphisms rs2279115 (*BCL-2*), rs4647603 (*CASP3*), rs1052571 (*CASP9*) and rs11781886 (*NKX3-1*) with susceptibility, prognosis and progression of PCa. Peripheral blood samples were obtained from 283 patients who presented histopathological confirmation of PCa and their paired controls (PSA less than 4 ng/mL). Genotyping was performed by real-time PCR using TaqMan® probe. The association between an occurrence of PCa with polymorphic variants was calculated by Odds Ratio (OR) with 95% confidence interval, obtained by multivariate logistic regression of the data. The genotypes *CASP3* (CT+TT), *CASP9* (GA+AA) and *NKX3-1* (CC) exhibited association with PCa, as well as the combined genotypes in pairs *BCL-2+NKX3-1* (CC+CC) and *CASP3+NKX3-1* (CT+CC). Univariate analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) with histopathological tumor data indicated association of *BCL-2* allelic variants (CA and/or AA and/or CA+AA) with extracapsular extension, seminal vesicle invasion, perineural invasion, bilateral and worse staging of the tumor, besides high levels of PSA. Allelic variants of *NKX3-1* (CC and TC+CC) were also associated with bilaterality, whereas *CASP3* (TT+TC) genotypes showed association with tumor staging. (CA+CC), bilaterality (CA+CC), T3 and T4 staging Combined polymorphisms analysis in pairs indicate association between *BCL-2+CASP3* genotypes with extracapsular extension (CA + CC, CA + CT and AA + CT), bilaterality (CA+CC), T3 and T4 staging (CA+CC, CA+CT and AA+CT) and high levels of PSA, whereas *BCL-2+NKX3-1* genotypes show association with extracapsular extension (CA+TC), bilaterality (CA+TC and CC + CC) and T3 and T4 staging (CA+CC). The obtained data allow to infer that the polymorphism rs1052571 of the *CASP9* gene seems to confer susceptibility to PCa, whereas the rs2279115 of *BCL-2*, the worse prognosis for patients. The polymorphisms of *CASP3* and *NKX3-1* genes seem to confer both susceptibility and worse prognosis, not only in isolation, but also when combined.

Keywords: SNP. Susceptibility. Histopathological parameters. Prognosis. PSA.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Anatomia da próstata em diferentes ângulos (Modificado de Verze, Cai, Lorenzetti, 2016)..... 14
- Figura 2: Esquema das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. (Modificado de Czabotar et al., 2014 e Youle; Strasser, 2008) 14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Análise univariada de características clínicas, ocupacional e alimentar de pacientes com câncer de próstata e indivíduos controle	14
Tabela 2:	Características da amostra de acordo com nível de PSA dos pacientes com CaP e parâmetros histopatológicos do tumor	14
Tabela 3:	Frequências genótípicas e alélicas dos genes <i>BCL-2</i> , <i>CASP3</i> , <i>CASP9</i> e <i>NKX3-1</i> em pacientes e em seus respectivos controles.....	14
Tabela 4:	Associação de dados histopatológicos de pacientes com câncer de próstata e os genótipos dos genes <i>BCL-2</i> e <i>NKX3-1</i>	14
Tabela 5:	Associação de estadiamento do tumor e níveis de PSA com os genótipos dos genes <i>BCL-2</i> , <i>CASP3</i> e <i>NKX3-1</i> isolados e combinados em pacientes com câncer de próstata	14
Tabela 6:	Associação de extensão extracapsular e bilateralidade do tumor com combinações genótípicas dos genes <i>BCL-2</i> , <i>NKX3-1</i> e <i>CASP3</i> em pacientes com câncer de próstata	14

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	14
II.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
1.	Câncer de próstata: Epidemiologia e fatores de risco	14
2.	Diagnóstico e tratamento do câncer de próstata	14
3.	Marcadores moleculares	14
3.1.	Polimorfismo de nucleotídeo único	14
4.	Apoptose	14
4.1.	Genes <i>CASP3</i> e <i>CASP9</i>	14
4.2.	Gene <i>BCL-2</i>	14
5.	Supressores Tumorais	14
5.1.	Gene <i>NKX3-1</i>	14
III.	Justificativa	14
IV.	OBJETIVO	14
1.	Objetivo Geral	14
2.	Objetivos Específicos	14
V.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
VI.	MANUSCRITO	14
	Introdução	14
	Material e Métodos:	14
	Amostras 14	
	Extração de DNA genômico	14
	Genotipagem dos genes <i>BCL-2</i> , <i>CASP3</i> , <i>CASP9</i> e <i>NKX3-1</i>	14
	Análise estatística	14
	Resultados	14
	Discussão 14	

VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
VIII.	ANEXO 1	14
IX.	ANEXO 2	14
	Histórico de Saúde	14
X.	ANEXO 3	14
XI.	ANEXO 4	14
XII.	ANEXO 5	14
XIII.	ANEXO 6	14

I. INTRODUÇÃO

Devido à alta taxa de homens acometidos pelo câncer de próstata (CaP) e ao número elevado de mortes decorrentes desta doença, esta tem sido um grande desafio para a saúde pública no mundo todo (DALL'ERA et al., 2012). O CaP é o câncer mais frequente em homens americanos (BRAWLEY, 2012) e a segunda causa de morte por esta doença (American Cancer Society, Cancer Facts & Figures, 2016).

Dos cânceres que atingem homens em países em desenvolvimento, apenas 4% são CaP, enquanto que em países desenvolvidos o CaP corresponde a, aproximadamente, 15% dos casos (HEIDENREICH et al., 2014). No Brasil o CaP permanece como o segundo tipo de câncer mais frequente entre os homens, atrás somente do câncer de pele não melanoma, tendo sido previsto 61.200 novos casos da doença para o ano de 2016 (INCA, 2016).

Atualmente dois exames são usados, de maneira complementar, para detecção da doença: o toque digital retal (DRE) e o antígeno prostático específico (PSA) (SAINI, 2016). O exame DRE detecta o aumento da glândula, já que o câncer se desenvolve preferencialmente na zona periférica do órgão. Entretanto, os cânceres palpáveis estão muitas vezes em estágios avançados (STROPE; ANDRIOLE, 2010).

O teste do PSA detecta esta glicoproteína produzida pelas células epiteliais da próstata. O PSA está presente em níveis reduzidos nas secreções prostáticas normais, porém, apresenta-se em níveis elevados na presença de anormalidades prostáticas, incluindo CaP, hiperplasia prostática benigna e prostatite (SAINI, 2016).

Apesar da importante contribuição do teste de PSA na detecção do CaP, aumentando em 81% a identificação da doença quando comparado ao uso isolado do DRE, seu uso é bastante questionável devido à falta de especificidade para identificar a presença da doença (BAADE et al., 2009). Atualmente há uma grande preocupação com o excesso de diagnósticos falso-positivos dos carcinomas de próstata, estimado em 23 a 42%, causados por esta baixa especificidade do teste (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

Recentemente a força-tarefa de serviços preventivos dos EUA (USPSTF, sigla para *US Preventive Services Task Force*) recomendou que o teste do PSA fosse evitado em resposta à deficiência do mesmo (CONSEDINI et al., 2015). Sendo assim, é de suma importância que novos marcadores mais específicos sejam desenvolvidos

para detecção do CaP e que consigam diferenciar o tipo agressivo (metastático) do não agressivo da doença.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*) têm sido bastante utilizados em estudos que visam o desenvolvimento de novos marcadores moleculares para diagnóstico, para resposta terapêutica e para prognóstico do câncer (KULASINGAM; DIAMANDIS, 2008). Assim, grandes estudos populacionais que buscam associação entre SNPs e doenças comuns, do tipo GWAS (do inglês, *genome-wide association study*), têm sido empregados em pesquisas de CaP, buscando novos marcadores para esta neoplasia (CHOUDHURY et al., 2012).

Genes da via apoptótica e genes supressores tumorais têm se tornado alvos nestes estudos devido às suas funções de controle da homeostase celular (GALLUZZI; KEPP; KROEMERK, 2012; TAN et al., 2012). Genes de via apoptótica são responsáveis por codificarem proteínas que podem ser tanto anti-apoptóticas como pró-apoptóticas (OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011), bem como proteínas iniciadoras e executoras de apoptose (LI; SHENG, 2012), enquanto que os genes supressores tumorais codificam proteínas que controlam negativamente o ciclo celular (HINDS; WEINGBERG, 1994).

Estudos têm demonstrado que SNPs em genes da via apoptótica *BCL-2* (antiapoptótico), *CASP3* (pró-apoptótico executor) e *CASP9* (pró-apoptótico iniciador) e no gene supressor tumoral (expresso predominantemente na próstata) *NKX3-1* estão associados com o carcinoma de próstata (LAVENDER et al., 2012; MITTAL et al., 2012; BACHMANN et al., 2011; AKAMATSU et al., 2010).

O SNP rs2279115, presente no gene *BCL-2*, foi estudado por Bachamann et al. (2011) que revelaram associação entre o alelo raro (A), expressão aumentada da proteína anti-apoptótica BCL-2 e aumento no risco de desenvolvimento da doença. Do mesmo modo, o SNP rs4647603, presente no gene *CASP3*, parece contribuir para o risco de desenvolver CaP, uma vez que altera a expressão proteica, desregulando o processo de apoptose e favorecendo a sobrevivência celular (MITTAL et al., 2012; ELMORE, 2007).

Assim como os polimorfismos presentes nos genes de via apoptótica, o rs11781886, presente no gene supressor tumoral *NKX3-1* (regulador do

desenvolvimento normal da próstata), também tem demonstrado associação com o risco aumentado de desenvolver o carcinoma de próstata, pois este SNP resulta na diminuição da expressão da proteína, reduzindo sua capacidade de supressor tumoral (NAKAWAGA et al., 2012). Diferentemente, o SNP rs1052571, mapeado no gene *CASP9*, demonstrou proteção moderada ao CaP em análise univariada (LAVENDER et al., 2012).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo investigar a associação destes polimorfismos com CaP, a fim de avaliá-los como possíveis candidatos marcadores para suscetibilidade, progressão e prognóstico da doença.

II. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Câncer de próstata: Epidemiologia e fatores de risco

Atualmente entre as doenças mais preocupantes para a saúde pública, o câncer ainda é uma das mais alarmantes. De acordo com o levantamento estatístico global para câncer em 2012, os cânceres que apresentaram maior incidência depois do câncer de pele não melanoma em países desenvolvidos foram os de mama, colon/reto, pulmão e de próstata, enquanto que câncer de fígado, estômago e cervical são mais comuns em países menos desenvolvidos. Essa diferença ocorre em resposta ao estilo de vida de cada região, ao uso de triagens para diagnosticar a doença e disponibilidade de tratamento (TORRE et al., 2015).

O câncer de próstata (CaP) é considerado o segundo tipo de câncer mais frequente e a sexta causa de morte em homens em todo o mundo (JEMAL et al., 2011). No Brasil o CaP foi classificado como o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens, ficando atrás somente do câncer de pele não melanoma. Esperava-se para o ano de 2016, 61.200 novos casos no Brasil (INCA, 2016).

As taxas de detecção de novos casos variam bastante no mundo todo, apresentando valores mais altos principalmente em países desenvolvidos da Oceania, Europa e América do Norte, resultado da intensa utilização do teste antígeno prostático específico (PSA). Em alguns países desenvolvidos como Austrália, Canadá, Reino Unido, Estados Unidos, Itália e Noruega, as taxas de mortalidade estão diminuindo em consequência de melhoria nos tratamentos (CENTER et al., 2012; JEMAL et al., 2011).

Existe uma diferença marcante entre a incidência histológica, latente do CaP, que parece ser muito semelhante em todo o mundo e que pode atingir 30% a partir dos 50 anos e 60 a 70% depois dos 80 anos, e a verdadeira incidência clínica. Esta última, muito variável de população para população, é a responsável pela potencial mortalidade da patologia. Atualmente há grande interesse na investigação epidemiológica e etiológica sobre os fatores que desencadeiam a passagem do estado latente para o estado clínico da doença (DOS REIS, 2014).

Sabe-se que o CaP pode ser influenciado por vários fatores, sejam eles intrínsecos, como por exemplo os fatores de crescimento, ou extrínsecos, como os hormônios esteroides, ao tecido prostático (SCIRRA et al., 2008), tornando difícil a compreensão exata de sua causa e desenvolvimento. Esses fatores também são conhecidos por exercerem funções na regulação do crescimento e diferenciação do tecido, tanto de maneira direta, como indireta. Além disso, o microambiente em torno de células da próstata também influencia significativamente este processo (SCIRRA et al., 2008; NELSON et al., 2003).

Apesar da dificuldade em compreender a causa e desenvolvimento dessa doença, três fatores de risco para o CaP estão bem estabelecidos: idade avançada, hereditariedade e ancestralidade (American Cancer Society, Cancer Facts & Figures, 2016). Adicionalmente, a alta ingestão de gordura tem sido apresentada como um fator de risco importante, pois a incidência da doença se mostra menor em populações com baixo consumo quando comparadas com populações com alto consumo de gordura (MANDAIR et al., 2014; SFANOS; MARZO, 2012; PENTYALA et al., 2000). Esses achados têm incentivado pesquisas com o objetivo de avaliar a importância do estilo de vida dos indivíduos afetados.

Devido ao CaP necessitar de um longo período para o seu desenvolvimento, o aumento no risco de desenvolver a doença é proporcional ao avanço da idade (SCIRRA et al., 2008). Estudos de necropsias revelaram pequenos carcinomas em até 29% dos homens com idade entre 30 a 40 anos e 64% em homens com 60 a 70 anos (NELSON et al., 2003). Grande parte dos casos de CaP (81%) ocorre em homens acima de 65 anos, sendo raro acometer indivíduos mais jovens, com menos de 50 anos. Por este motivo é considerada uma doença da terceira idade (BAADE et al., 2009). De acordo com Bracarda et al. (2005) a proporção é de 0,4 por 100.000 homens/ano em homens com menos de 45 anos; de 6:100.000 em homens com 45 a 54 anos; 60:100.000 em homens com mais de 55 anos e 270:100.000 em homens com mais de 65 anos.

A hereditariedade no CaP aparece como um importante fator de risco em virtude da relação de histórico familiar com probabilidade aumentada do indivíduo desenvolver a doença (HEMMINKI, 2012). Os pacientes com CaP em idade jovem

apresentam uma probabilidade significativa de transmitir este traço aos seus descendentes. Estes, por sua vez, fazem parte de um grupo de risco de vir a ter um carcinoma de próstata agressivo e potencialmente letal (DOS REIS, 2014).

Os cânceres podem ser subdivididos em três grupos: hereditários, esporádicos e familiar (MOREIRA; MELO, 2012). Os cânceres hereditários, são aqueles em que a mutação ocorre em linhagem germinativa, transmitindo o traço aos descendentes, além de apresentar alta penetrância (DANTAS et al., 2009; JORDE; CAREY; BAMSHAD, 2010). Em contrapartida, os cânceres esporádicos, os quais compreendem a maioria dos casos de cânceres, são resultado de mutações em células somáticas, não transmitidas às gerações futuras, que são moduladas pela exposição a carcinógenos (JORDE; CAREY; BAMSHAD, 2010).

As alterações genômicas no câncer de próstata esporádico são do tipo somáticas e o papel de vários genes já foi identificado neste tipo de câncer. Assim como ocorre em outros tipos de cânceres, uma pequena parcela de cânceres de próstata (5 a 10%) tem um fator hereditário óbvio e alguns genes com mutações na linhagem germinativa no câncer de próstata hereditário também já foram identificados (DONG, 2006). No câncer colo retal do tipo familiar (ou agregação familiar), foi descrito que, diferentemente do hereditário, os indivíduos apresentam uma predisposição aumentada em desenvolver a doença, porém, não apresentam uma alteração hereditária determinada a partir da descoberta de uma mutação pré-existente na linhagem germinativa (RUSTIG, 2007). Isto parece ocorrer também no CaP. Neste caso, homens que têm ou tiveram pai ou irmão com CaP, possuem duas vezes mais chances de serem acometidos por este tipo de câncer. No entanto, o risco é menor quando o pai é afetado quando comparado com irmãos afetados. Esta probabilidade aumenta se o indivíduo tiver vários familiares afetados, principalmente se estes desenvolveram a doença quando jovens, confirmando a influência familiar nesta neoplasia (BRAWLEY, 2012).

Assim como idade e hereditariedade, a ancestralidade também é considerada um fator de risco para o CaP. No geral, as taxas de incidência de câncer e mortalidade variam notavelmente de acordo com grupos raciais e étnicos (SIEGEL et al., 2014), apresentando maior ocorrência em caucasianos da América do Norte e do noroeste

da Europa e sendo menos comum em homens asiáticos e da América do Sul (BRAWLEY, 2012). No entanto, negros afro-americanos apresentam maior incidência de CaP, estágios mais avançados no momento do diagnóstico (CaP metastático), tumores mais agressivos em cada estágio e 2,3 vezes mais chances de morte decorrente da doença. Esses dados são frequentemente atribuídos à detecção tardia do câncer (CONSEDINI et al., 2015; CENTER et al., 2012). Pesquisadores têm investigado se estas diferenças entre as populações caucasiana e negra estão relacionadas com a dieta, obesidade, diferenças genéticas, como polimorfismos (repetições CAG, que consiste no número excessivo de repetições anormais deste trinucleotídeo) e bioquímicas (deficiência de vitamina D) (BAADE et al., 2013).

Alguns autores sugerem que fatores ambientais associados com pré-disposição genética desses indivíduos, podem influenciar o alto risco para desenvolver CaP na população africana (HSING; CHOKKALINGAM, 2006; WYNDER; MABUCHI; WHITMORE, 1971). Na população asiática, apesar da incidência para este tipo de câncer ser baixa, varia bastante entre diferentes regiões, chegando a 32% no Japão contra 14% na região do oceano pacífico da Ásia, confirmando a possível interação entre fatores genéticos e ambientais (ITO, 2014; BAADE et al., 2013).

2. Diagnóstico e tratamento do câncer de próstata

A próstata é dividida em três zonas: periférica, central e de transição, sendo a última separada dos compartimentos glandulares por uma banda fibromuscular do tecido (VERZE, CAI, LORENZETTI, 2016) (Figura 1). O CaP pode acometer qualquer parte da glândula. No entanto, em torno de 70 a 75% dos cânceres de próstata surgem na zona periférica do órgão, principalmente na zona superior; 15% na zona central e de 10 a 15% derivam a partir da zona de transição (BRACARDA et al., 2005).

É normal que existam lesões multifocais no CaP, e que a agressividade do tumor varie entre os diferentes focos tumorais, tornando-se uma doença heterogênea (SAINI, 2016).

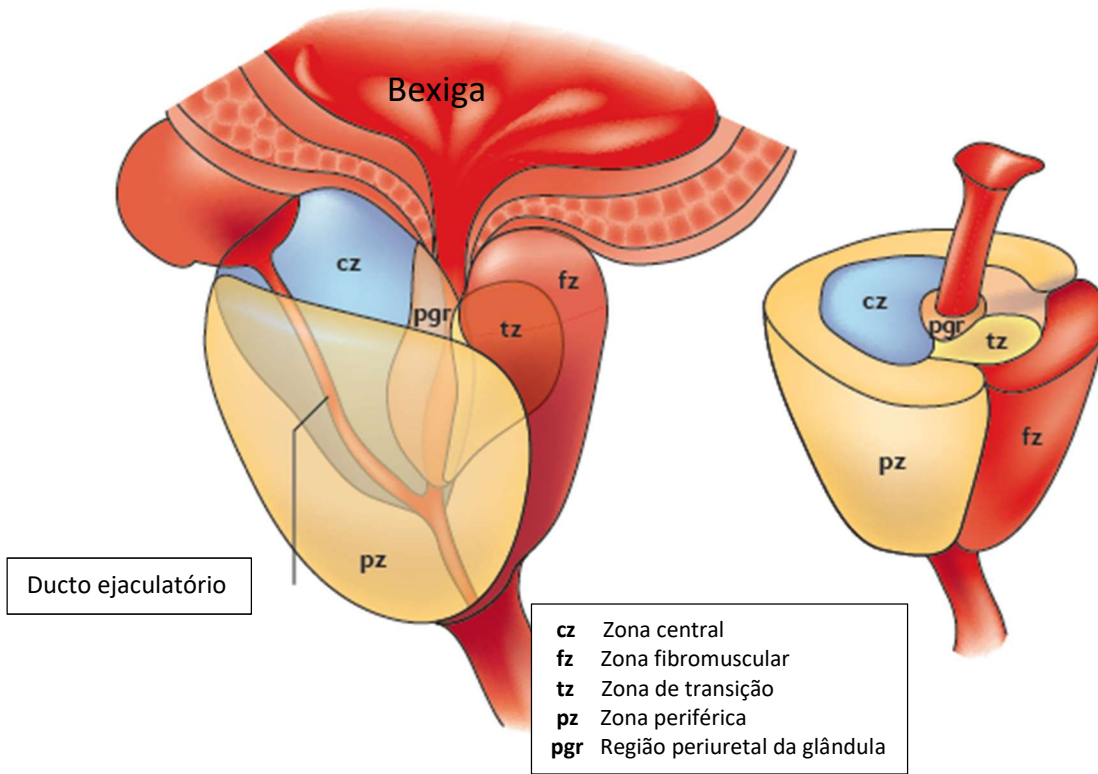
Em sua grande maioria o CaP é assintomático, visto que sintomas frequentemente relatados por pacientes que possuem a doença, como desaceleração

do fluxo e aumento da frequência urinária, sejam comumente associados ao envelhecimento, sem necessariamente estarem relacionados com a presença do câncer. Em virtude desta problemática, testes de detecção precoce são cada vez mais requeridos para identificação desta neoplasia (THOMPSON et al., 2007).

Atualmente dois exames são usados de maneira complementar para detecção da doença: o toque digital retal (DRE, do inglês *digital rectal examination*) e o antígeno prostático específico (PSA, do inglês *prostate specific antigen*) (SAINI, 2016), detectado em testes sanguíneos. O exame DRE, realizado em consultório médico, é capaz de detectar o aumento da glândula, já que o câncer se desenvolve, em sua grande maioria, na zona periférica. Entretanto, o exame é incapaz de detectar o CaP nas zonas central e de transição; além disso, os cânceres palpáveis estão muitas vezes em estágios avançados (STROPE; ANDRIOLE, 2010; BRACARDA et al., 2005).

As células epiteliais da glândula da próstata são responsáveis pela produção de PSA, uma serina protease, cuja função normal é a liquefação do sêmem (VERZE, CAI, LORENZETTI, 2016). Níveis elevados de PSA indicam anormalidades prostáticas, incluindo CaP, hiperplasia benigna da próstata (HBP) e prostatites (inflamações da próstata) (SAINI, 2016).

O teste do PSA é complementar ao exame DRE, e auxilia a detecção precoce do CaP. A introdução do teste de PSA na prática clínica ocorreu nos Estados Unidos no final dos anos 1980, no Canadá em 1989 e no Reino Unido, Austrália e Brasil por volta de 1990, e seu uso aumentou em 81% a detecção de CaP em relação ao exame DRE sozinho. Entretanto, seu uso isolado é bastante questionável devido à baixa especificidade para identificar a presença ou não de CaP (BAADE et al., 2009; GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005). Além disso, o uso isolado do exame de PSA não é recomendado, pois estudos mostraram que, aproximadamente 20% dos homens com CaP apresentam níveis normais desta glicoproteína, enquanto que uma grande porcentagem de homens com níveis elevados de PSA (75,9%) apresentam resultados negativos na biopsia, revelando PSA falso-positivo (SAINI, 2016; SCHRÖDER et al., 2009).

FIGURA 1 - Anatomia da próstata em diferentes ângulos

Fonte: Modificada de VERZE; CAI; LORENZETTI (2016)

Ainda que a proteína PSA seja tecido-específica, ela não é câncer-específica, gerando resultados falso-positivos, um dos maiores problemas relatados na detecção de CaP. Inflamações prostáticas são, muitas vezes, a causa desses resultados falso positivos, pois podem levar ao rompimento das células epiteliais da membrana basal prostática, liberando níveis elevados de PSA na corrente sanguínea (SAINI, 2016). Além disso, células inflamatórias parecem ter relação com o desenvolvimento de HBP, bem como hormônios, que são capazes de promover o crescimento da próstata, favorecendo o surgimento de HBP (AARON, FRANCO, HAYWARD, 2016).

O teste do PSA tem apresentado forte influência sobre as taxas de mortalidade e de metástase, diminuindo-as em, respectivamente, 53% e 37% em países que utilizam este teste como triagem para a detecção do CaP (JALLOH et al., 2014; LEEUWEN et al., 2010). Porém, ainda que o teste de PSA tenha contribuído para o diagnóstico de CaP em fase inicial, é ainda insuficiente para diferenciar a doença menos agressiva da doença letal, ocasionando excesso de tratamento em indivíduos portadores da forma menos agressiva desta doença.

Em virtude desta baixa especificidade, em 2011 a *U.S. Preventive Services Task Force* recomendou que o teste de PSA deixasse de ser usado como método de triagem para a detecção do CaP. Porém, há sérios riscos nesta abordagem, visto que não existe ainda um teste com uma especificidade maior (KLOTZ, 2013; SCHRÖDER, 2011). Uma alternativa é o uso moderado e consciente do teste e tratamento mais seletivo, de modo que pacientes com suspeita de CaP agressivo sejam submetidos aos tratamentos radicais enquanto que indivíduos que apresentam a forma menos agressiva da doença recebam tratamento menos invasivo e tenham acompanhamento a fim de observar a evolução da doença (CONSEDINI et al., 2015). Com isso, o grande desafio é a distinção das duas formas do CaP.

Dado o exposto, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias para melhorar o desempenho do exame de PSA e suprir a carência de exame sensível e específico para a detecção do CaP. Entre as estratégias destaca-se a investigação de marcadores genéticos e moleculares que distingam os tipos latente e agressivo da doença (SAINI, 2016).

3. Marcadores moleculares

O CaP, assim como outras doenças prostáticas, necessita de um longo período para seu desenvolvimento. Sua evolução acontece decorrente de modificações que afetam o equilíbrio entre o crescimento e morte de células da próstata (SCIARRA et al., 2008). Diversos estudos genéticos têm sido realizados no intuito de entender e desvendar o crescimento e evolução. O desenvolvimento de pesquisas que ajudem a compreensão do processo de carcinogênese são de extrema importância devido à capacidade de desvendar as causas do CaP, proporcionando recursos para redução do impacto desta doença (JOSHUA et al., 2008). Marcadores moleculares recém descobertos, associados ao início e progressão do CaP, podem contribuir para uma tomada de decisão clínica mais adequada (CHOUDHURY et al., 2012).

O Instituto Nacional do Câncer americano (NCI) definiu biomarcador como uma molécula biológica encontrada em sangue ou em outros fluidos ou tecidos do corpo, que pode ser objetivamente medida e avaliada, por algum tipo de ensaio, como um sinal de um processo biológico normal ou anormal e uma condição ou doença

patológica (ILYIN; BELKOWSKI; PLATA-SALAMÁN, 2004; HAYES et al., 1996). Biomarcadores moleculares são definidos como uma molécula ou um painel de moléculas (classificados em biomarcadores de DNA, RNA, proteína e metabolitos) que podem ser medidos e usados como biomarcadores em várias aplicações, tais como avaliação de resposta clínica, identificação de risco, entre outras (HONG et al., 2010). Desta forma, um marcador molecular pode ser usado para triagem, monitoramento de respostas terapêuticas e para diagnóstico e prognóstico de doenças (SAINI, 2016).

Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares encontram-se os marcadores genéticos, mudanças capazes de detectar variações em nível de DNA (HIRSCHHORN et al, 2002; SNUCKS, 2000). Marcadores genéticos compreendem alterações como ampliações ou translocações (KULASINGAM, 2008), inserções e deleções (*indels*, do inglês *insertion/deletion*) e os polimorfismos de nucleotídeo únicos (SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphisms*) (LUI, MUSE, 2005; HIRSCHHORN et al, 2002).

Os marcadores moleculares, devido à sua eficiência, têm sido bastante usados na detecção precoce de câncer, ajudando no prognóstico e/ou prevendo respostas terapêuticas. A procura por marcadores genéticos que estejam associados à suscetibilidade de doenças, muitas vezes aposta em genes candidatos, onde um gene é alvo com base nas propriedades e vias metabólicas do seu produto proteico (COUGHLIN; HALL, 2002).

Biomarcadores do câncer são produzidos pelo próprio tecido tumoral ou por outros tecidos, como resposta à presença de câncer ou de outras condições associadas, tais como inflamação, ajudando na detecção ou monitoramento da doença. Esses marcadores tumorais podem ser uma molécula (proteína, DNA, mRNA), substância (metabólito) ou processos (apoptose, angiogênese, proliferação celular), empregados como indicadores prognósticos da progressão da doença, para diagnóstico diferencial em pacientes sintomáticos e para estadiamento clínico do câncer. Além disso, tais marcadores podem ser utilizados para estimar o volume do tumor, avaliar resposta ao tratamento e analisar recorrência da doença por meio de monitoramento (KULASINGAM; DIAMANDIS, 2008).

Três biomarcadores para CaP foram aprovados pelo órgão regulamentador de medicamentos, produtos biológicos, dispositivos médicos, alimentos, cosméticos e produtos de tabaco dos Estados Unidos, o FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*). São eles: PSA, PHI (do inglês *prostate health index*) e PCA3 (*prostate cancer antigen 3*).

O PHI é um teste sorológico que tem como objetivo distinguir a HBP do CaP em homens com idade superior a 50 anos e com DRE normal, por meio de uma equação que envolve três biomarcadores:

$$\text{PHI} = ([-2] \text{ proPSA/fPSA}) \times \text{PSA}^{1/2}$$

onde:

proPSA = isoforma do PSA livre (pg/mL),

fPSA = PSA livre (do inglês, *free PSA*) (ng/mL), e

PSA = PSA total (ng/mL).

O PCA3 é um antígeno específico da próstata. É um RNA longo não codificante, altamente expresso em CaP; exibe níveis baixos em HBP e está ausente no tecido prostático normal. É utilizado para casos de biópsia e/ou PSA e/ou DRE negativos. Apesar destes novos testes terem sido aprovados, demonstrando boa sensibilidade e especificidade, o teste de PSA continua sendo o mais usado e considerado uma ferramenta indispensável no diagnóstico da doença (SAINI, 2016).

Os marcadores moleculares para o CaP possuem um campo vasto devido à heterogeneidade da doença. Isso indica que a solução menos complexa para obter o diagnóstico do CaP ainda não foi encontrada (SCHRÖEDER, 2008), fazendo com que pesquisadores realizem novos estudos sobre marcadores moleculares e avaliem diferentes abordagens (MARTIN et al., 2012).

A progressão do tumor no CaP é caracterizada por alterações na atividade de várias vias de regulação, bem como em células tumorais ou tecidos adjacentes ao tumor. As vias podem ser de sinalização do receptor de andrógeno, apoptose, regulação do ciclo celular, transdução de sinal, angiogênese, adesão e coesão celular. Assim, as variações no mRNA, DNA e/ou alterações no nível de proteínas dessas vias podem ser candidatas a marcadores moleculares para esta neoplasia (QUINN; HENSHALL; SUTHERLAND, 2005).

3.1. Polimorfismo de nucleotídeo único

Polimorfismos genéticos são variações genéticas que ocorrem na população com uma frequência igual ou superior a 1% e são resultado das variações genéticas em nível cromossômico (estrutura cromossômica), alélico (sequência alélica) ou nucleotídico (sequência de bases nucleotídicas), que podem gerar mudanças no código genético, causando alterações genotípicas transmitidas por meio da linhagem germinativa, que afetarão ou não o fenótipo. O tipo mais estudado é o SNP (HOÇOYA; JARDINI, 2010).

Os polimorfismos genéticos do tipo SNPs são alterações de base única na sequência de DNA (VIGNAL et al., 2002) e têm como característica serem mais estáveis do que outros tipos de polimorfismos. Milhões de SNPs já foram identificados no genoma humano devido à rapidez com que isso pode ser feito por diferentes tipos de técnicas, o que proporciona um melhor custo-benefício, fazendo deles excelentes marcadores genéticos (GANAL, ALTMANN, RÖDER, 2009; JEHAN, LAKHANPAU, 2006). Além disso, nos últimos anos houve um aumento considerável no número de estudos que relatam associação entre SNPs e risco de CaP em razão do avanço nas tecnologias de sequenciamento e genotipagem (SFANOS; MARZO, 2012).

Em 2007 foi publicado um estudo denominado GWAS, que visava estudar a associação de variantes genéticas de todo o genoma com diversas doenças. O objetivo deste estudo era identificar possíveis associações de variantes genômicas com características complexas da população, bem como detectar associações entre SNPs e doenças comuns, tais como doenças cardíacas, diabetes, doenças autoimunes e distúrbios psiquiátricos (VISSCHER et al., 2012). Desde então, este tipo de desenho experimental tem sido bastante utilizado também para comparar variantes herdadas associadas com risco de CaP (CHOUDHURY et al., 2012).

Populações europeias aparecem como as mais estudadas nos trabalhos tipo GWAS. Entretanto, recentes GWAS têm sido realizados com homens descendentes de afro-americanos (HAIMAN et al., 2011) e de japoneses (TAKATA et al., 2010), indicando possíveis SNPs marcadores para CaP nestas populações. A associação de polimorfismos com o CaP é mais comum em populações em que os genes de suscetibilidade ao câncer têm maior penetrância (COUGHLIN; HALL, 2002).

Segundo Gonzalgo e Isaacs (2003), estima-se que 40% dos CaPs têm um componente genético raro e de alta penetrância. No entanto, os polimorfismos genéticos podem contribuir para o desenvolvimento do CaP, devido à ocorrência de alterações na expressão e funcionalidade das proteínas responsáveis por funções necessárias para homeostase da glândula. A procura por novos marcadores genéticos de suscetibilidade ao CaP mostrou aumento no número de polimorfismos genéticos relativamente comuns que podem ter função no metabolismo de testosterona e outros andrógenos que influenciam no crescimento e diferenciação do tecido (COUGHLIN; HALL, 2002).

Apesar da intensa procura e esforços da comunidade científica em encontrar um SNP que seja eficiente para a suscetibilidade e prognóstico do CaP, os resultados têm sido insatisfatórios, levando à necessidade de novos estudos. O presente estudo propõe avaliar polimorfismos moleculares em genes envolvidos nos processos de apoptose (*BCL2*, *CASP9*, *CASP3*) e no gene supressor tumoral (*NKX3-1*), visando encontrar marcadores de suscetibilidade, prognóstico e progressão para o CaP, além de dar subsídios para o desenvolvimento de novas pesquisas no âmbito científico.

4. Apoptose

O evento de apoptose, também conhecido como morte celular programada, desenvolve um papel crucial em câncer, nas doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes, entre outras. A apoptose pode ocorrer em consequência de uma variedade de estímulos fisiológicos e patofisiológicos, como por exemplo, exposição à luz ultravioleta, irradiação, drogas citotóxicas, fator de necrose tumoral e estresse oxidativo (OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011).

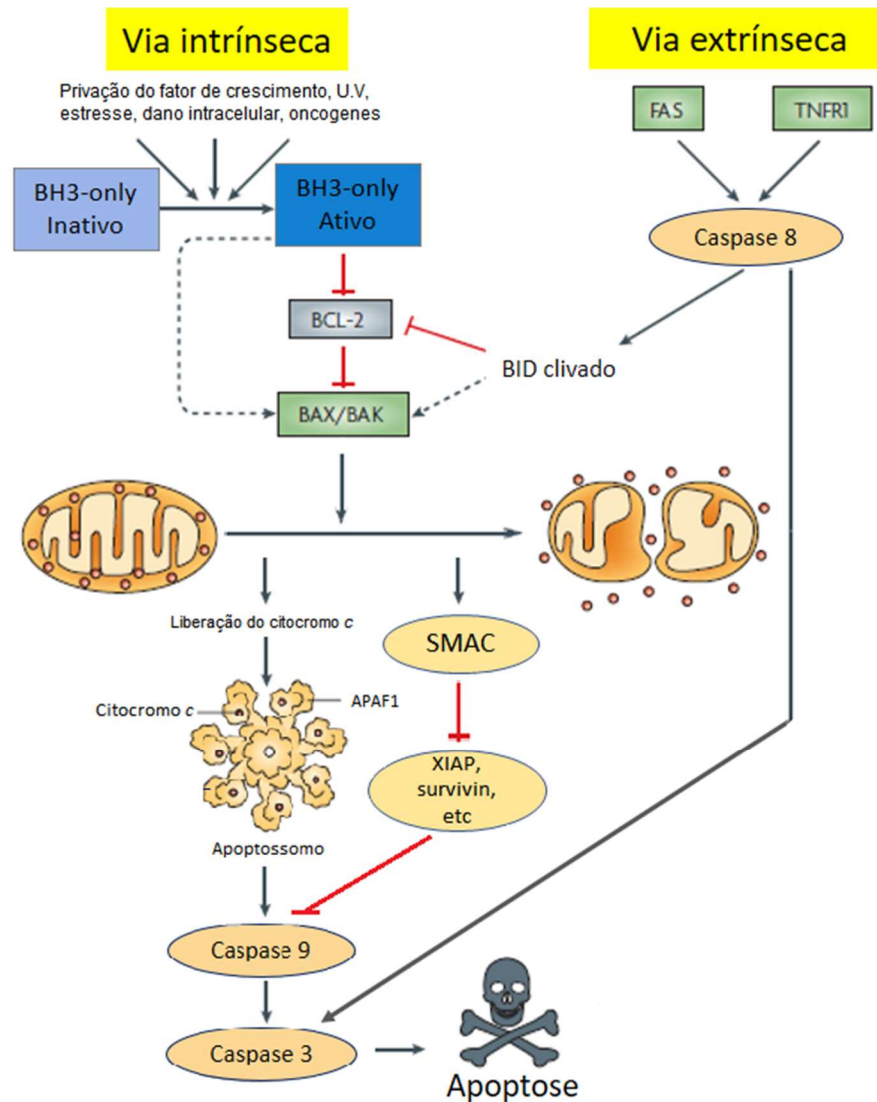
A apoptose acontece por duas vias distintas: intrínseca ou extrínseca (Figura 2). A via de sinalização extrínseca, também conhecida como via extracelular induzida ou via do receptor de morte, envolve processos externos, como por exemplo uma infecção, que ativa receptores de morte localizados na superfície celular, como o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR, do inglês *tumor necrosis factor receptor*) e o antígeno associado a fibroblasto (FAS, do inglês *fibroblast associated antigen*), dando início ao processo de morte celular por apoptose (AKL et al., 2014). Uma vez

ativado, o receptor de morte causa mudanças conformacionais em proteínas iniciadoras (pró-caspase 8 ou pró-caspase 10), que clivam diretamente a pró-caspase 3 (executora), finalizando este processo. Além disso, a enzima caspase 8 também é responsável por clivar a proteína pró-apoptótica *BH3-only*, resultando na forma truncada da proteína, que desempenha papel fundamental na cascata de reação na via intrínseca (GHAVAMI et al., 2009).

De maneira mais complexa, a via intrínseca envolve alterações na mitocôndria causadas por proteínas como as da família BCL-2 (AKL et al., 2014). Pode ser induzida em resposta a estímulos extra ou intracelulares, como hipóxia, danos no DNA, ausência de fatores de crescimento e estresse oxidativo. Após ativação da via, proteínas anti-apoptóticas (BCL-2) são bloqueadas, permitindo que proteínas pró-apoptóticas desempenhem suas funções, causando alterações na membrana mitocondrial que leva à liberação de citocromo c para o citosol, necessário à formação do apoptossomo, que juntamente com a caspase 9 (iniciadora), ativa a enzima caspase 3 para que a apoptose seja então concluída (JAYAKIRAN, 2015).

Sabe-se que a apoptose é um evento de extrema importância para a homeostase celular, e que uma vez desregulada pode conferir risco ao tecido, ocasionando proliferação e podendo levar à formação de tumores (OLA; NAWAZ; AHSAN, 2011). Diferentes mecanismos são capazes de inibir a apoptose: i) superexpressão de moléculas inibidoras de apoptose, responsáveis tanto por inibir a formação do apoptossomo quanto por inativar caspases executoras, ligando-se diretamente às enzimas; ii) superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, como as proteínas BCL-2 e BCL-X_L; iii) perda da expressão de moléculas pró-apoptóticas, como as enzimas caspases e iv) diminuição da expressão de supressores tumorais, como *NKX3-1* (FIANDALO; KYPRIANOU, 2012; GHAVAMI et al., 2009).

FIGURA 2 – Esquema das vias intrínseca e extrínseca da apoptose



Fonte: Modificado de CZABOTAR et al. (2014) e YOULE; STRASSER (2008)

4.1. Genes *CASP3* e *CASP9*

A família das caspases, proteases baseadas em cisteína, é fundamental para a tradução de sinais intracelulares e apoptose. As caspases são ativadas de várias formas, respondendo a diferentes estímulos através da formação de complexos de ativação na presença de proteínas adaptadoras, para causar morte celular durante o processo de apoptose (HYMAN; YUAN, 2012).

As caspases são sintetizadas como zimogênios (pró-enzimas), que possuem um pró-domínio, uma subunidade grande e outra pequena. Para que as caspases

sejam ativadas é necessária a mudança do estado zimogênio para o estado de enzima propriamente dita. Para isso, é fundamental que ocorram alterações conformacionais alostéricas e/ou clivagem de um resíduo de aspartato (DEGTEREV; BOYCE; YUAN, 2003). Primeiramente são separadas as subunidades grandes e pequenas e removido o pró-domínio N-terminal; uma vez removido o pró-domínio N-terminal as caspases tornam-se ativas (HYMAN; YUAN, 2012).

O genoma humano codifica 12 caspases diferentes, que são divididas em dois grupos, iniciadoras e executoras, de acordo com suas sequências de ativação, seus papéis na apoptose e o comprimento de seus pró-domínios. As caspases iniciadoras (incluindo as caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 e 12), são responsáveis por responder aos estímulos pró-apoptóticos e ativar as caspases executoras (caspases 3, 6 e 7) (LI; SHENG, 2012; LI, YUAN, 2008).

As caspases iniciadoras têm como característica molecular um longo pró-domínio N-terminal, o qual medeia a formação de outros complexos proteicos para ativação e inibição das caspases executoras (DE LA CADENA, MASSIEU, 2016; CAROLINE, YUAN, 2009). Diferentemente, as caspases executoras possuem pró-domínios menores, e quando ativadas pelas caspases iniciadoras, são capazes de clivar proteínas citoplasmáticas solúveis e do citoesqueleto, através de uma sequência coordenada de proteólise (JAYAKIRAN, 2015).

As caspases, tanto as de iniciação quanto as executoras, principalmente quando induzidas por sinais extracelulares, fazem parte dos marcadores moleculares de apoptose mais usados (GALLUZZI; KEPP; KROEMERK, 2012). Contudo, nem todas as caspases estão envolvidas única e exclusivamente com o processo de apoptose; algumas atuam em diversos processos biológicos, incluindo regulação imune e espermatogênese (LI; SHENG, 2012; CAROLINE; YUAN, 2009).

O gene *CASP3*, mapeado no cromossomo 4q34, é responsável por codificar a enzima caspase 3, que participa desempenhando papel crucial no processo de apoptose celular. É ativada diretamente pelas caspases 8, 9 e 10, tanto na via intrínseca, como na via extrínseca em células apoptóticas. Entretanto, além de sua função bem estabelecida no processo de apoptose celular, a caspase 3 também contribui para a diferenciação de vários tipos celulares, como granulócitos,

osteoblastos, plaquetas, eritroblastos, bem como trofoblastos (GALLUZZI; KEPP; KROEMERK, 2012).

Rodríguez-Barriguete et al. (2015) avaliaram a associação entre a expressão tumoral de caspases e características clinicopatológicas de câncer de próstata, além de sua capacidade de prever progressão bioquímica após prostatectomia radical. A progressão ou recorrência bioquímica refere-se ao aumento no nível de PSA mesmo após tratamento (cirúrgico ou radioterápico), podendo ser usado como indicativo de metástase a distância (SADI et al., 2006). A partir dos resultados obtidos por método de imunohistoquímica, Rodríguez-Barriguete et al. (2015) demonstraram que alterações na expressão de caspases contribuem para comportamento maligno do tumor de próstata, sugerindo que as duas formas da caspase 3 (pró-caspase 3 e caspase 3 ativa) podem ajudar a identificar pacientes com CaP mais agressivo.

O SNP rs4647603, presente na região 5'UTR do gene *CASP3*, resulta na troca de base de G>A, alterando a transcrição do gene e afetando a expressão gênica (CHEN et al., 2008). Mittal et al. (2012) observaram a associação deste SNP com risco aumentado de CaP, concluindo que este contribui para o desenvolvimento da doença. Entretanto, quando avaliada a associação deste polimorfismo com metástase óssea, nenhuma associação foi encontrada.

Diferentemente da caspase 3, que atua tanto na via intrínseca quanto na extrínseca, a caspase 9, codificada pelo gene *CASP9*, presente no cromossomo 1, atua unicamente na via intrínseca, que envolve a mitocôndria. Caspase 9 é ativada pelo apoptossomo (citocromo c ligado à Apaf-1), que, em seguida, ativa as caspases executoras (WÜRSTLE; LAUSSMANN; REHM, 2012). Segundo os mesmos autores, problemas na ativação ou na expressão desta enzima estão relacionados com graves problemas no câncer, tais como desenvolvimento da doença, progressão do tumor, além de contribuir para a resistência a tratamentos para certos tipos de cânceres, como ovário e leucemia.

Kuida et al. (1998) demonstraram que ratos com deficiência de caspase 9 morriam no período perinatal em decorrência de deformações morfológicas graves no cérebro surgidas a partir do excesso de células acumuladas durante o desenvolvimento embrionário. Esta deficiência também é prejudicial no tratamento

contra o câncer, pois aumentou a resistência a estímulos pró-apoptóticos, incluindo radiação gama e drogas anticâncer indutoras de estresse genotóxico. Polimorfismos no promotor ou em regiões codificadoras do gene *CASP-9* podem afetar os níveis de expressão ou atividade da proteína, indicando uma pré-disposição para vários cânceres, como de bexiga, colon/reto e de pulmão (WÜRSTLE; LAUSSMANN; REHM, 2012).

O SNP rs1052571, presente no gene *CASP9*, que resulta em apoptossomo defeituoso, foi estudado por Marques et al. (2013) a fim de investigar sua associação com o desenvolvimento de carcinoma de células renais. Eles observaram associação com aumento no risco de desenvolver a doença em mulheres que apresentavam o alelo raro. Lavender et al., (2012) avaliaram polimorfismos presentes em via apoptótica de diferentes genes em relação ao risco de CaP do tipo agressivo em homens americanos de ancestralidade europeia, em um estudo caso-controle. Dentre os polimorfismos estudados, o rs1052571 apresentou, em análise univariada, associação moderada (18-50%) com redução da suscetibilidade à doença; porém, quando os dados foram corrigidos em análise estatística multivariada, os resultados não se mantiveram e nenhuma associação foi encontrada. Nenhum resultado significativo foi encontrado também por Zhang et al. (2013) quando investigada a associação deste SNP com a suscetibilidade em desenvolver câncer de pulmão.

Diante do exposto, o presente estudo propõe avaliar a associação dos SNPs rs4647603 (*CASP3*) e rs1052571 (*CASP9*) com a suscetibilidade, prognóstico e progressão do CaP, uma vez que estes parecem ter relação com esta neoplasia.

4.2. Gene BCL-2

A família das proteínas BCL-2 é dividida em 3 subfamílias funcionalmente e estruturalmente distintas: (*BH3-only*, proteínas pró-apoptóticas executoras e proteínas anti-apoptóticas) (CHAO; KORMEYER, 1998; CZABOTAR et al, 2014).

As subfamílias pró-apoptóticas (executoras e BH3-somente) juntas são responsáveis pelo processo de apoptose. O grupo das proteínas BH3-somente (BID, BIM, BAD, PUMA e NOXA), classificado de acordo com o número de domínios que elas possuem, transmite sinais para o início da apoptose. A subfamília pró-apoptótica compreende as proteínas executoras BAX, BAK, BOK, importantes no processo de

permeabilização da membrana externa da mitocôndria (MOMP, do inglês *mitochondrial outer membrane permeabilization*) requerido na apoptose (HARAZONO, NAKJIMA, RAZ, 2014).

As proteínas pró-apoptóticas executoras possuem características estruturais em seus domínios, que quando ativados mudam sua conformação de monômero para oligômero, interrompendo a integridade da membrana externa da mitocôndria (CZABOTAR et al, 2014).

A subfamília anti-apoptótica inclui as proteínas BCL-2, BCL-xL, BCL-W, MCL-1 e A1, responsáveis por promover a sobrevivência celular por meio da inativação das proteínas pró-apoptóticas, resultando na preservação da integridade da membrana externa mitocondrial (UM, 2016; HARAZONO, NAKJIMA, RAZ, 2014).

O gene *BCL-2* (linfoma de células B 2), localizado no segmento cromossômico 18q21.3, é um proto-oncogene que codifica a proteína presente na membrana externa das mitocôndrias responsável por regular dois processos que sofrem alterações durante a transformação oncogênica: proliferação e apoptose (AKL et al., 2014; BURLACU, 2003).

O gene *BCL-2* é composto por 3 éxons e dois promotores, P1 e P2, responsáveis por sua transcrição. O primeiro promotor (P1) desempenha papel significativo na expressão do gene, enquanto que o segundo (P2) diminui sua expressão, atuando de forma negativa sobre P1 (NÜCKEL et al., 2007). Tem como função principal a inibição da apoptose, prolongando a sobrevivência celular, de modo que as células permaneçam nas fases G0/G1 (MARTIN et al., 2003), devido à capacidade de controlar o padrão de expressão de reguladores do ciclo, tais como p130, p27 e pRB (AKL et al., 2014).

A inibição de apoptose pela proteína BCL-2 acontece mediante a inativação de proteínas pró-apoptóticas. Esta inativação se dá através da ligação das proteínas anti e pró-apoptóticas da família BCL-2. Contudo, a apoptose pode ser ativada por meio da ativação dos membros *BH3-only*, que interrompe a interação inibitória dessas proteínas (UM, 2016). Uma vez interrompida essa interação, proteínas pró-apoptóticas causam MOMP (do inglês, *mitochondrial outer membrane permeabilization*), liberando no citoplasma citocromo c (molécula pró-apoptótica) que

se liga à Apaf-1 e à pró-caspase 9 (alterando sua conformação e transformando-a em caspase 9) para formação do apoptossomo, responsável por ativar caspase 3 (executora) pela via intrínseca e levar à apoptose (WÜRSTLE; LAUSSMANN; REHM, 2012).

Uma superexpressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2, contribui para formação e progressão de tumores, além de resistência à quimioterapia. Isso acontece devido à célula adquirir maior sobrevivência, sofrendo inibição da apoptose. Dada esta relação do gene *BCL-2* com câncer, em resposta à alteração na via apoptótica, este gene tem se tornado alvo de pesquisas de marcadores moleculares para o tratamento de cânceres (HARAZONO; NAKAJIMA; RAZ, 2014).

Normalmente *BCL-2* é expresso em células do epitélio glandular prostático (HOCKENBERY et al., 1991) e está associado com o desenvolvimento de CaP (McDONNELL et al., 1992). Moul et al. (1996) investigaram o uso clínico de *BCL-2* como marcador molecular em tumor primário de CaP e recorrência do câncer após prostatectomia total, e concluíram que a superexpressão desta proteína está associada negativamente com a sobrevida livre da doença em pacientes que foram submetidos a este procedimento para tumor clinicamente localizado, tornando-se indicador de prognóstico ruim.

O polimorfismo rs2279115 tem sido um dos SNPs mais estudados no gene *BCL-2*, mostrando associação com diferentes tipos de cânceres como de mama (SEARLE et al., 2012), de células escamosas da orofaringe (LEHNERDT et al., 2009) e CaP (BACHMANN et al., 2011). Neste SNP uma troca de base única de C>A, localizada no promotor inibitório P2, altera a expressão da proteína, de modo que o sítio de ligação de P2 para P1 seja ausente, impedindo P2 de exercer função sobre P1, aumentando a expressão de *BCL-2* (NÜCKEL et al., 2007). Em CaP, rs2279115 apresentou associação tanto com risco aumentado da doença (BACHMANN et al., 2011), quanto com proteção (KIDD et al., 2006). Ainda que os resultados sejam contraditórios, estudos já realizados demonstram que o gene *BCL-2* continua sendo um forte alvo de estudo na busca de um marcador molecular efetivo para detecção e prognóstico do CaP (HIRATA et al., 2009).

5. Supressores Tumorais

Os genes supressores tumorais codificam proteínas responsáveis pelo controle do crescimento celular. Tais proteínas são capazes de inibir o crescimento, impedindo a progressão do ciclo e também de induzir apoptose (HINDS; WEINGBERG, 1994; ABELEV; ERAISER, 2008). Portanto, a perda da função dos supressores tumorais resulta na proliferação celular desregulada (HINDS; WEINGBERG, 1994). Mutações nestes genes são mais frequentes do que em proto-oncogenes durante o processo de carcinogênese (ABELEV; ERAISER, 2008).

Em 1971, Alfred Knudson apresentou o primeiro modelo genético descrevendo o papel de um supressor tumoral em doença humana. Seu trabalho envolvendo retinoblastoma, um raro câncer infantil, culminou na teoria de dois “*hits*”, a qual diz que duas alterações genéticas distintas ou mutações são necessárias para o favorecimento da doença, sugerindo que a característica maligna ocorre devido à perda ou inativação dos dois alelos no locus do gene supressor tumoral responsável por regular o crescimento celular normal (ABEL et al., 1998). A teoria de Knudson explicou também a hereditariedade no câncer, ao observar que crianças com retinoblastoma hereditário desenvolviam a doença precocemente quando comparadas com crianças portadores da forma esporádica (KNUDSON, 1971). Tempos após a descoberta de Knudson, os supressores tumorais foram divididos em três grupos conforme suas funções: os *gatekeepers*, *caretakers* e *landscapers*.

Os supressores considerados *gatekeepers* são os genes cuja função é inibição do crescimento celular, seja suprimindo a proliferação ou induzindo a apoptose, enquanto que os *caretakers* são responsáveis pela manutenção da integridade do DNA, garantindo sua fidelidade por meio do reparo efetivo em caso de danos no material genético ou prevenção da instabilidade genômica. Os genes *landscapers* controlam o microambiente celular, visto que lesões iniciadoras parecem não ocorrer nas células tumorais, mas em células do estroma que rodeiam o tumor. Este controle do meio é capaz de modular o crescimento celular direta ou indiretamente por meio da regulação de proteínas da matriz extracelular, marcadores de superfície celular, proteínas de adesão ou secreção de fatores de crescimento (MACLEOD, 2000; ASHWORTH; LORD; REIS-FILHO, 2011).

A perda de função dos genes *caretakers* leva ao aumento da taxa de mutações, e a dos *landscapers* torna o microambiente anormal, favorecendo a transformação das células epiteliais normais. Ambos processos podem causar pré-disposição e favorecer a formação tumoral (MACLEOD, 2000). Desta forma, os supressores tumorais aparecem como peça chave na carcinogênese, uma vez que sua inativação causa o descontrole da proliferação celular e inibição de apoptose, promovendo o acúmulo de mutações, favorecendo a heterogeneidade genética do tumor, característica necessária para a progressão da doença (ABELEV; ERAISER, 2008).

5.1. Gene *NKX3-1*

O gene supressor tumoral regulador de andrógeno *NKX3-1*, localizado no cromossomo 8p21.2, é expresso predominantemente na próstata. Pertence à classe dos genes *homebox*, ou seja, reguladores do desenvolvimento embrionário que atuam por interação com outros genes num efeito cascata para a formação do tecido (KRISTIANSEN, 2012).

O gene *NKX3-1* é conhecido como marcador de formação da próstata, pois é expresso desde seu desenvolvimento até a vida adulta, em todas as fases de diferenciação, desempenhando papel essencial no desenvolvimento normal da glândula (ABAT-SHEN; SHEN; GELMANN, 2008). A perda de função deste gene causa defeitos na secreção de proteínas prostáticas e na morfogênese do ducto, bem como contribui para formação de carcinogênese de próstata (ABAT-SHEN; SHEN; GELMANN, 2008), além de apresentar associação com tumores de próstata de alto grau (neoplasia intraepitelial prostática considerada lesão precursora de CaP), sugerindo que este possa ser um excelente marcador para a detecção deste câncer (KRISTIANSEN, 2012). Devido à sua relação com CaP, *NKX3-1* se tornou alvo de estudo de pesquisadores que buscam marcadores biológicos funcionais para detecção do CaP.

Em estudo realizado por Gurel et al. (2010), utilizando a técnica de imunohistoquímica, o gene *NKX3-1* demonstrou ser altamente sensível (98,6%) e específico (99,7%) como marcador para a detecção de adenocarcinoma prostático metastático. Além disso apresentou maior especificidade quando associado com anticorpos para outros marcadores, como PSA e PSAP (do inglês *fosfatase prostatic-*

specific acid phosphatase). Esta análise combinada dos três genes apresentou sensibilidade de 100%, auxiliando na identificação da origem prostática nos carcinomas metastáticos pouco diferenciados.

Alguns autores têm relacionado a atividade de *NKX3-1* com os genes *PTEN* e *AR* em processos de CaP (ANDERSON et al., 2012; TAN et al., 2012; SONG et al., 2009; KIM et al., 2002). *NKX3-1* regulou a atividade transcricional de *AR* na linhagem de célula tumoral prostática humana LNCaP, favorecendo a sobrevivência destas células. *NKX3-1*, na presença de dihidrotestosterona (DHT), ativa diretamente a expressão de *AR*. O grupo também demonstrou que genes dependentes de *AR*, os quais são superexpressos em CaP, CaP avançado e em CaP recorrente, também são regulados diretamente por *NKX3-1*, indicando seu papel crucial na tumorigenicidade desta doença. Além disso, resultados apontaram para uma provável participação de *NKX3-1* na regulação de genes que atuam na sobrevivência celular ou prevenção de apoptose (TAN et al., 2012.).

O polimorfismo rs11781886 apresenta alteração de base C>T na região 5'UTR, levando à baixa expressão de *NKX3-1*. Akamatsu et al. (2010) demonstraram que este SNP altera a afinidade de ligação do fator de transcrição Sp1, reprimindo a atividade de transcrição do promotor e diminuindo a expressão do mRNA deste gene, o que pode contribuir para o aumento no risco de CaP.

O fato da literatura já ter indicado a associação deste gene com o CaP (KRISTIANSEN, 2012; GUREL et al., 2010) incentivou-nos a investigar a relação do SNP rs11781886 com a doença.

Justificativa

Em virtude das elevadas taxas de incidência de CaP no mundo (CENTER et al., 2012; JEMAL et al., 2011), da baixa eficácia dos atuais testes de triagem atualmente utilizados para o diagnóstico desta neoplasia, PSA e DRE, (SAINI, 2016; BAADE et al., 2009), torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos exames baseados em marcadores que sejam sensíveis, mais específicos e minimamente invasivos para que os problemas causados pelos atuais métodos de triagem sejam solucionados. Neste contexto, o presente estudo visa auxiliar nesta problemática, buscando potenciais marcadores moleculares de suscetibilidade, prognóstico e progressão para o CaP em um estudo do tipo caso-controle e transversal. P

Para atingir este objetivo será estudada a associação de SNPs em três genes envolvidos no processo de apoptose (*CASP3*, *CASP-9* e *BCL-2*) e um gene supressor tumoral (*NKX3-1*) com a suscetibilidade ao CaP, correlacionando-os também com parâmetros clínicos dos pacientes e histopatológicos do tumor.

A partir dos dados obtidos com os marcadores moleculares avaliados, pretende-se contribuir para a compreensão do processo de carcinogênese prostática, auxiliando futuramente na tomada de decisão clínica mais adequada e contribuindo para a redução dos impactos desta doença.

III. OBJETIVO

1. Objetivo Geral

Avaliar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) de suscetibilidade, progressão e prognóstico para câncer de próstata em estudo de associação do tipo caso-controle.

2. Objetivos Específicos

Avaliar a possível associação de polimorfismos nos genes *CASP3* (rs4647603), *CASP9* (rs1052571), *BCL-2* (rs2279115) e *NKX3-1* (rs11781886) isolados ou combinados, com a suscetibilidade ao câncer de próstata.

Correlacionar os dados genéticos do estudo com os parâmetros clínicos dos pacientes e histopatológicos do tumor para avaliar o potencial dessas variantes como marcadores moleculares de prognóstico e progressão do tumor.

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARON, LaTayia; FRANCO, O. E.; HAYWARD, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics of North America**, Maryland Heights, v. 43, n. 3, p. 279-288, ago. 2016.

ABATE-SHEN, C.; SHEN, M. M.; GELMANN, E. Integrating differentiation and cancer: the Nkx3. 1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. **Differentiation**, St Paul, v. 76, n. 6, p. 717-727, jul. 2008.

ABEL, Ted et al. Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. **Science**, Washington, v. 279, n. 5349, p. 338-341, jan. 1998.

ABELEV, G. I.; ERAISER, T. L. On the path to understanding the nature of cancer. **Biochemistry (Moscow)**, Moscow, v. 73, n. 5, p. 605-618, mai. 2008.

AKAMATSU, S. et al. A functional variant in Nkx3. 1 associated with prostate cancer susceptibility down-regulates NKX3. 1 expression. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 19, n. 21, p. 4265-4272, ago. 2010.

AKL, H.; et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 10, p. 2240–2252, out, 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2016**, Atlanta, p. 1–9, 2016.

ANDERSON, P. D. et al. Nkx3. 1 and Myc crossregulate shared target genes in mouse and human prostate tumorigenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, Carolina do Norte, v. 122, n. 5, p. 1907-1919, abr; 2012.

ASHWORTH, A.; LORD, C. J.; REIS-FILHO, J. S. Genetic interactions in cancer progression and treatment. **Cell**, Cambridge, v. 145, n. 1, p. 30-38, abr. 2011.

BAADE, P. D.; YODEN, D. R.; KRNJACKI, L. J. International epidemiology of prostate cancer: Geographical distribution and secular trends. **Molecular Nutrition Food Research**, Weinheim, Queensland, v.53, n. 2, p.171-184, fev. 2009.

BAADE, P. D. et. al. Epidemiology of prostate cancer in the Asia-Pacific region. **Prostate International**, v. 1, n. 2, p. 47-58, jun. 2013.

BACHMANN, H. S. et al. Regulatory BCL2 promoter polymorphism (– 938C> A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma. **International Journal of Cancer**, Malden, v. 129, n. 10, p. 2390-2399, nov. 2011.

BRACARDA, S. et al. Cancer of the prostate. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 56, n. 3, p. 379–396, dez. 2005.

BRAWLEY, O. W. Prostate cancer epidemiology in the United States. **World Journal Urology**, v. 30, n.2, p.195-200, abr.2012.

BURLACU, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Malden, v. 7, n. 3, p 249-257, jul. 2003.

CAROLINE, H. Y.; YUAN, J. The Jekyll and Hyde functions of caspases. **Developmental Cell**, v. 16, n. 1, p. 21-34, jan. 2009.

CENTER, M. M. et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **European Urology**, Sheffield, v. 61, p. 1079-1092, jun. 2012.

CHAO, Debra T.; KORSMEYER, Stanley J. BCL-2 family: regulators of cell death. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 16, n. 1, p. 395-419, abr. 1998.

CHEN, K. et al., CASP3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 14, n. 19, p. 6343-6349, out. 2008.

CHOUDHURY, A. C. et al. The role of genetic markers in the management of prostate cancer. **European Urology**, Sheffield, v. 62, n. 4, p. 577-587, out. 2012.

CONSEDINE, N. S. et al. Beyond the Black Box: A Systematic Review of Breast, Prostate, Colorectal, and Cervical Screening Among Native and Immigrant African-Descent Caribbean Populations. **Journal of Immigrant and Minority Health**, v. 17, n. 3, p. 905–924, jun. 2015.

COUGHLIN, S. S.; HALL, I. J. A Review of Genetic Polymorphisms and Prostate Cancer Risk. **Annals Epidemiology**, Philadelphia, v. 12, n. 3, p. 182–196, abr. 2002.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 15, n. 1, p. 49-63, 2014.

DALL'ERA, M. A. et al. Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of the literature. **European urology**, Sheffield, v. 62, n. 6, p. 976-983, dez. 2012.

DANTAS, E. L. R. et al. Genética do câncer hereditário. **Revista Brasileira Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 3, p. 263-269, mai. 2009.

DEGTEREV, A. I.; BOYCE, M.; YUAN, J. A decade of caspases. **Oncogene**, Nova Iorque, v. 22, n. 53, p. 8543-8567, 2003.

DE LA CADENA, S. G.; MASSIEU, L. Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12. **Apoptosis**, v. 21, n. 7 p. 1-15, mai. 2016.

DOS REIS, J. P. Carcinoma da Próstata: Conseguimos Diagnosticar e Tratar os Doentes que o Necessitam? E Será que o Necessitam os Doentes que Diagnosticamos e Tratamos?. **Acta Medica Portuguesa**, Portugal, v. 27, n. 1, p. 12-14, jan-fev. 2014.

DONG, Jin-Tang. Prevalent mutations in prostate cancer. **Journal of cellular biochemistry**, Malden, v. 97, n. 3, p. 433-447, fev. 2006.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007.

FIANDALO, M. V.; KYPRIANOU, N. Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. **Experimental Oncology**, Kyiv, v. 34, n. 3, p. 165-175, out. 2012.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy. **Oncogene**, Nova Iorque, v. 31, n. 23, p. 2805-2808, 2012.

GANAL, M. W.; ALTMANN, T.; RÖDER, Marion S. SNP identification in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 2, p. 211-217, abr. 2009.

GHAVAMI, S. et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. **Journal of Medical Genetics**, Londres, v. 46, n. 8, p. 497-510, ago. 2009.

GONZALGO, M. L.; ISAACS, W. B. Molecular pathways to prostate cancer. **The Journal of Urology**, Linthicum, v. 170, n. 6, p. 2444–2452, dez. 2003.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. DE; MENDONÇA, G. A. E. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p. 227–234, mai. 2005.

GUREL, B. et al. NKX3. 1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors. **The American Journal of Surgical Pathology**, Londres, v. 34, n. 8, p. 1097-1105, ago. 2010.

HAIMAN, C. A. et al. Genome-wide association study of prostate cancer in men of African ancestry identifies a susceptibility locus at 17q21. **Nature Genetics**, Nova Iorque, v. 43, n. 6, p. 570-573, mai. 2011.

HARAZONO, Y.; NAKAJIMA, K.; RAZ, A. Why anti-Bcl-2 clinical trials fail: a solution. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 33, n. 1, p. 285-294, mar. 2014.

HAYES, D. F. et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 88, n. 20, p. 1456 – 1466, out. 1996.

HEIDENREICH, A. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and local treatment with curative intent - Update 2013. **European Urology**, Sheffield, v. 65, n. 1, p. 124–137, jan. 2014.

HEMMINKI, K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. **World Journal of Urology**, v. 30, n. 2, p. 143-148, 2012.

HIRATA, H. et al. Bcl2- 938C/A polymorphism carries increased risk of biochemical recurrence after radical prostatectomy. **The Journal of Urology**, Linthicum, v. 181, n. 4, p. 1907-1912, 2009.

HIRSCHHORN, Joel N. et al. A comprehensive review of genetic association studies. **Genetics in Medicine**, v. 4, n. 2, p. 45-61, 2002.

HOCKENBERY, D. M.; ZUTTER, M.; HICKEY, W.; NAHM, M.; KORSMEYER, S. J. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 88, n. 16, p. 6961-6965, 1991.

HOÇOYA, L. S.; JARDINI, M. A. N. Polimorfismo genético associado à doença periodontal na população brasileira: revisão de literatura. **Revista Odontologia UNESP**, v. 39, n. 5, p. 305-310, 2010.

HONG, H. et al. Molecular biomarkers: a US FDA effort. **Biomarkers**, v. 4, n. 2, p. 215-225, 2010.

HINDS, P. W.; WEINBERG, R. A. Tumor suppressor genes. **Current opinion in genetics & development**, v. 4, n. 1, p. 135-141, 1994.

HIRSCHHORN, Joel N. et al. A comprehensive review of genetic association studies. **Genetics in Medicine**, v. 4, n. 2, p. 45-61, 2002.

HSING A. W.; CHOKKALINGAM A. P. Prostate cancer epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. 5, p. 1388-1413, 2006.

HYMAN, B. T.; YUAN, J. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 395-406, 2012.

ILYIN, S. E.; BELKOWSKI, S. M.; PLATA-SALAMÁN, C. R. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 8, p. 411-416, 2004.

ITO, K. Prostate cancer in Asian men. **Nature Reviews**, Gunma, v. 11, p. 197–212. 2014.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.** Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>. Acesso em: 17 out. 2016.

JALLOH, M. et al. R. Racial Variation in Prostate Cancer Upgrading and Upstaging Among Men with Low-risk Clinical Characteristics. **European Urology**, Sheffield, v. 67, p. 451-457, mar. 2014.

JAYAKIRAN, M. Apoptosis-biochemistry: a mini review. **Journal of Clinical & Experimental Pathology**, Westlake, v. 5, n. 1. Jan. 2015.

JEHAN, T.; LAKHANPAUL, S. Single nucleotide polymorphism (SNP)–methods and applications in plant genetics: a review. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 435-459, out. 2006.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Maple Shade, v. 61, n. 2, p. 69-90, fev. 2011.

JOSHUA, A. M. et al. Prostatic preneoplasia and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1785, n. 2, p. 156–181, abr. 2008.

PAIVA, I, S. Genética do Câncer. In: JORDE, L. B.; CAREY, J. C.; BAMSHAD, M. J. **Genética Médica**. 4. ed. São Paulo: ELSEVIER, 2010. 212-230.

KIDD, L. R. et al. Germline BCL-2 sequence variants and inherited predisposition to prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, Hampshire, v. 9, n. 3, p. 284-292, mai. 2006.

KIM, M. J. et al. Cooperativity of Nkx3. 1 and Pten loss of function in a mouse model of prostate carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 5, p. 2884-2889, mar. 2002.

KLOTZ, L. Active surveillance for prostate cancer: Overview and update. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 14, n. 1, p. 97–108, mar. 2013.

KNUDSON, Alfred G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 68, n. 4, p. 820-823, abr. 1971.

KRISTIANSEN, G. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. **Histopathology**, Malden, v. 60, n. 1, p. 125-141, jan. 2012.

KUIDA, K. et al. Reduced apoptosis and cytochrome c–mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. **Cell**, Philadelphia, v. 94, n. 3, p. 325-337, ago. 1998.

KULASINGAM, V.; DIAMANDIS, E. P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. **Nature Clinical Practice Oncology**, Londres, v. 5, n. 10, p. 588-599, ago. 2008.

LAVENDER, N. A. et al. Interaction among apoptosis-associated sequence variants and joint effects on aggressive prostate cancer. **BMC Medical Genomics**, Londres, v. 5, n. 1, p. 5-11, abr. 2012.

LEEUWEN, P. J. et al. Prostate cancer mortality in screen and clinically detected prostate cancer: Estimating the screening benefit. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 2, p. 377-383, jan. 2010.

LEHNERDT, G. F. et al. The regulatory BCL2 promoter polymorphism (- 938C> A) is associated with relapse and survival of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Annals of Oncology**, Cary, v. 20, n. 6, p. 1094-1099, fev. 2009.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, Nova Iorque, v. 27, n. 48, p. 6194-6206, 2008.

LI, Z.; SHENG, M. Caspases in synaptic plasticity. **Molecular Brain**, Londres, v. 5, n. 1, p. 5-15, mai. 2012.

LIU, K.; MUSE, S. V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. **Bioinformatics**, Cary, v. 21, n. 9, p. 2128-2129, fev. 2005.

SADI et al. Câncer de Próstata Localizado: Progressão Bioquímica (PSA) após Tratamento, **Projeto Diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina** p. 1-12, jun. 2006.

MACLEOD, K. Tumor suppressor genes. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 10, n. 1, p. 81-93, fev. 2000.

MANDAIR, D. et al. Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review. **Nutrition and Metabolism**, Londres, v. 11, n. 1, p. 11-30, mar. 2014.

MARQUES, I. et al. Influence of survivin (BIRC5) and caspase-9 (CASP9) functional polymorphisms in renal cell carcinoma development: a study in a southern European population. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 8, p. 4819-4826, ago. 2013.

MARTIN, B. et al., Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. **British Journal of Cancer**, Londres, v. 89, n. 1, p. 55-64, jul. 2003.

MARTIN, S. K. et al. Emerging biomarkers of prostate cancer (Review). **Oncology Reports**, Londres, v. 28, n. 2, p. 409-417, ago. 2012.

MCDONNELL, T. J. et al. CAMPBELL, M. L. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 52, n. 24, p. 6940-6944, dez. 1992.

MITTAL, R. D.; MITTAL, T.; SINGH, A. K.; MANDAL, R. K. Association of caspases with an increased prostate cancer risk in north Indian population. **DNA and Cell Biology**, New Rochelle, v. 31, n. 1, p. 67-73, jan. 2012.

MOREIRA, R. M. M.; MELO, D. G. Percepções dos médicos a respeito do aconselhamento genético do câncer: o exemplo do câncer colorretal. **Revista Ciência em Extensão**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 46-65, 2012.

MOUL, J. W. et al. Protein expression of p53, bcl-2, and KI-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. **Surgery**, Los Angeles, v. 120, n. 2, p. 159-167, ago. 1996.

NAKAGAWA, H. et al. Prostate cancer genomics, biology, and risk assessment through genome-wide association studies. **Cancer Science**, Malden, v. 103, n. 4, p. 607-613, abr. 2012.

NELSON, W. G.; DE MARZO, A.M.; ISAACS, W.B.; Prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 81, p. 349-366, jul. 2003.

NÜCKEL, H. et al. Association of a novel regulatory polymorphism (- 938C> A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, Washington, v. 109, n. 1, p. ago. 290-297, 2007.

OLA, M. S.; NAWAZ, M.; AHSAN, H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 351, n. 1-2, p. 41-58, mai. 2011.

PENTYALA S. N. et al. KHAN S. A. Prostate cancer: a comprehensive review. **Medical Oncology**, v. 17, n. 2, p. 85-105, mai. 2000.

QUINN, D.I.; HENSHALL, S. M.; SUTHERLAND, R. L. Molecular markers of prostate cancer outcome. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 6, p. 858-887, abr. 2005.

RODRÍGUEZ-BERRIGUETE, G. et al. Prognostic value of inhibitors of apoptosis proteins (IAPs) and caspases in prostate cancer: caspase-3 forms and XIAP predict biochemical progression after radical prostatectomy. **BMC Cancer**, Londres, v. 15, n. 1, p. 15-809, out. 2015.

RUSTGI, Anil K. The genetics of hereditary colon cancer. **Genes & Development**, v. 21, n. 20, p. 2525-2538, 2007.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 2, p. 97-106, abr. 2016.

SCIARRA, A. et al. Prostate growth and inflammation. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 108, n. 3, p. 254-260, fev. 2008.

SCHRÖDER, F. H. Stratifying risk—the US Preventive Services Task Force and prostate-cancer screening. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 365, n. 21, p. 1953-1955, nov. 2011.

SCHRÖDER, F. H. Review of best markers for prostate cancer. **Cancer Prevention**, Philadelphia, v. 6, n. 2, p. 1-40, 2008.

SCHRÖDER, F. H. et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 2009, n. 360, p. 1320-1328, mar. 2009.

SEARLE, C. J. et al. A BCL2 promoter polymorphism rs2279115 is not associated with BCL2 protein expression or patient survival in breast cancer patients. **Springer Plus**, v. 1, n. 1, p. 1-38, dez. 2012.

SFANOS, K. S.; DE MARZO, A. M. Prostate cancer and inflammation: the evidence. **Histopathology**, Malden, v. 60, n. 1, p. 199-215, jan. 2012.

SIEGEL, R.; MILLER, K.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: a Cancer Journal Clinicians**, Maple Shade, v. 65, n. 1, p. 5-29, jan. 2015.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Maple Shade, v. 64, n. 1, p. 9-29, jan/fev. 2014.

SUNNUCKS, Paul. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199-203, mai. 2000.

SONG, H. et al. Loss of Nkx3. 1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. **Oncogene**, Nova lorque, v. 28, n. 37, p. 3307-3319, jul. 2009.

STROPE, S. A.; ANDRIOLE, G. L. Prostate cancer screening: current status and future perspectives. **Nature Reviews Urology**, Londres, v. 7, n. 9, p. 487-493, set. 2010.

TAN, P. Y.; CHANG, C. W.; CHNG, K. R.; WANSA, S. A.; SUNG, W.; CHEUNG, E. Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 32, n. 2, p. 399-414, jan. 2012.

TAKATA, R. et al. Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. **Nature Genetics**, Nova lorque, v. 42, n. 9, p. 751-754, ago. 2010.

THOMPSON, I. et al. Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. **The Journal of Urology**, Linthicum, v. 177, n. 6, p. 2106-2131, jun. 2007.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, Maple Shade, v. 65, n. 2, p. 87-108, mar/abr. 2015.

UM, H-D. Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. **Oncotarget**, Orchard Park, v. 7, n. 5, p. 5193-5203, nov. 2016.

VERZE, P.; CAI, T.; LORENZETTI, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Reviews Urology**, Londres, v. 13, n. 7, p. 379-386, jun. 2016.

VIGNAL, Alain et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, Londres, v. 34, n. 3, p. 275-306, 2002.

VISSCHER, P. M. et al. Five years of GWAS discovery. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, n. 1, p. 7-24, jan. 2012.

WYNDER, E.t L.; MABUCHI, K.; WHITMORE, W. F. Epidemiology of cancer of the prostate. **Cancer**, Malden, v. 28, n. 2, p. 344-360, ago. 1971.

WÜRSTLE, M. L.; LAUSSMANN, M. A.; REHM, M. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 11, p. 1213-1220, jul. 2012.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 9, n. 1, p. 47-59, jan. 2008.

ZHANG, Z. Y. et al. A literature-based systematic HuGE review and meta-analysis show that CASP gene family polymorphisms are associated with risk of lung cancer. **Genetics and Molecular Research**, São Francisco. v. 12, n. 3, p. 3057-3069, jan, 2013.

V. MANUSCRITO

Variantes polimórficas nos genes *CASP3*, *CASP9*, *BCL-2* e *NKX3-1* como marcadores candidatos de suscetibilidade e pior prognóstico para câncer de próstata

SOUZA, M.R.¹; SOUZA, M.F.¹; NÓBREGA, M.; CILIÃO H.L.¹; FUGANTI, P.E.²; CÓLUS, I.M.S.¹

¹Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil;

² Hospital do Câncer de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Correspondência para:

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

Laboratório de Mutagênese e Oncogenética – Departamento de Biologia Geral,
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, Paraná – Brasil

CEP: 86.057-970

Telefone: 55.43.3371-4417

e-mail: ilcecolus@gmail.com

RESUMO

Em virtude das elevadas incidência e mortalidade devido ao câncer de próstata (CaP), e da necessidade de métodos de triagem mais específicos para a doença, o presente estudo teve como objetivo avaliar variantes polimórficas nos genes de apoptose *BCL-2* (rs2279115), *CASP3* (4647603) e *CASP9* (rs1052571), e no gene supressor tumoral *NKX3-1* (rs11781886) como possíveis marcadores moleculares de suscetibilidade, prognóstico e progressão do CaP em um estudo do tipo caso-controle e transversal. Amostras de sangue periférico foram obtidas de 283 pacientes que apresentaram confirmação histopatológica do CaP e seus controles pareados (PSA inferiores a 4 ng/mL). As genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real usando sonda TaqMan®. 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 a doença os genótipos dos genes *CASP3*, *CASP9* e *NKX3-1*, bem como os genótipos combinados em pares *BCL-2+NKX3-1* e *CASP3+NKX3-1*. A análise univariada dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) com os dados histopatológicos do tumor indicou associação das variantes alélicas de *BCL-2* com extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, invasão perineural, bilateralidade e pior estadiamento do tumor, além de níveis elevados de PSA. As variantes alélicas de *NKX3-1* também apresentaram associação com bilateralidade, enquanto que genótipos de *CASP3* demonstraram associação com estadiamento tumoral. Análise dos polimorfismos combinados em pares indicou associação dos genótipos combinados de *BCL-2+CASP3* com extensão extracapsular, bilateralidade, estadiamento T3 e T4 e níveis elevados de PSA, enquanto que genótipos de *BCL-2+NKX3-1* mostraram associação com extensão extracapsular, bilateralidade e estadiamento T3 e T4. Os dados obtidos permitem inferir que o polimorfismo do gene *CASP9* parece conferir suscetibilidade ao CaP, enquanto que o SNP do gene *BCL-2*, pior prognóstico aos pacientes. Os polimorfismos avaliados dos genes *CASP3* e *NKX3-1* parecem conferir tanto suscetibilidade, quanto pior prognóstico, não apenas de forma isolada, mas também quando combinados.

Palavras-chave: SNP, suscetibilidade, parâmetros histopatológicos, prognóstico, PSA.

ABSTRACT

Due to the high incidence and mortality due to prostate cancer (PCa), and the need for more specific screening methods for the disease, the present study aimed to evaluate polymorphic variants in the apoptosis genes *BCL-2* (rs2279115), *CASP3* (rs4647603) and *CASP9* (rs1052571), and in the tumor suppressor gene *NKX3-1* (rs11781886) as potential molecular markers of susceptibility, prognosis and progression of CaP in a case-control and cross-sectional study. Peripheral blood samples were obtained from 283 patients who presented histopathological confirmation of PCa and their paired controls (PSA less than 4 ng / mL). Genotyping was performed by real-time PCR using TaqMan® probe. The association between the occurrence of CaP and the polymorphic variants was calculated by Odds Ratio (OR) with 95% confidence interval, obtained by multivariate logistic regression of the data. The genotypes of the *CASP3*, *CASP9* and *NKX3-1* genes, as well as the combined genotypes in *BCL-2+NKX3-1* and *CASP3+NKX3-1* pairs were shown to be associated with the disease. Univariate analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) with histopathological data on tumor indicated association of *BCL-2* allelic variants with extracapsular extension, seminal vesicle invasion, perineural invasion, bilaterality and worse tumor staging, as well as elevated levels of PSA. Allelic variants of *NKX3-1* were also associated with bilaterality, whereas *CASP3* genotypes showed association with tumor staging. Analysis of the combined polymorphisms in pairs indicated the association of *BCL-2+CASP3* genotypes with extracapsular extension, bilaterality, T3 and T4 staging and elevated PSA levels, whereas *BCL-2+NKX3-1* genotypes showed association with extracapsular extension, bilateral and staging T3 and T4. The data obtained allow us to infer that the polymorphism of the *CASP9* gene seems to confer susceptibility to CaP, whereas the SNP of the *BCL-2* gene, a worse prognosis for patients. The polymorphisms evaluated from the *CASP3* and *NKX3-1* genes seem to confer both susceptibility and poor prognosis, not only in isolation, but also when combined.

Keywords: SNP, susceptibility, histopathological parameters, prognosis, PSA.

Introdução

O câncer de próstata (CaP) é um dos grandes desafios de saúde em todo o mundo, em virtude da alta frequência de homens acometidos e do elevado número de óbitos resultantes desta doença (DALL'ERA et al., 2012). No Brasil o CaP é o segundo tipo de câncer mais comum entre os homens, ficando atrás somente do câncer de pele não melanoma (INCA, 2016).

Alguns fatores ambientais apresentam associação com CaP, como exposição ocupacional a agroquímicos (BASSIL et al., 2007), consumo de carne vermelha (EKMAN, 1999) e vasectomia (NUTT, REED, KÖHLER, 2016). Outro importante fator que demonstra relação com a neoplasia é o histórico familiar de CaP do indivíduo, visto que o risco é proporcional ao número de parentes de primeiro grau acometidos (LYNCH et al, 2016).

Algumas características histopatológicas de tumores de próstata são de extrema importância para predizer a agressividade do tumor, como por exemplo, o escore de Gleason, cuja mensuração se dá pelo padrão de diferenciação histológica da amostra, indicando a progressão e recorrência bioquímica da doença. A invasão de vesícula seminal está associada com pior prognóstico e recorrência tumoral após cirurgia e a extensão extracapsular revela se a neoplasia se estende além da próstata (ADAMIS, VARKARAKIS, 2014).

A invasão perineural indica a capacidade da célula cancerosa invadir os nervos, e está associada com elevadas taxas de recorrência, bem como com diminuição de sobrevivência (BAKST, WONG, 2016). Apesar de não predizer recorrência bioquímica (KARAVITAKIS al., 2011), a lateralidade do tumor pode auxiliar na tomada de decisão quanto ao tratamento da doença (MOURAVIEV et al., 2007). A invasão de linfonodos também é um importante fator histopatológico, pois confere pior prognóstico ao paciente, uma vez que as células cancerosas adquirem capacidade de invadir o sistema linfático, resultando em metástase linfática (BENSALAH, 2013).

Na avaliação histológica os tumores de próstata são divididos em classes quanto aos seus estadiamentos: TNM (*Tumour Node Metastasis*), que revela a agressividade da doença (MOTTET et al., 2014).

O uso do teste de PSA na prática clínica tem auxiliado na identificação dos casos de CaP. No entanto, aproximadamente 20% dos homens com CaP apresentam

níveis normais desta glicoproteína, e homens com altos níveis de PSA nem sempre são portadores desta neoplasia (SAINI, 2016; CARY, COOPERBERG, 2013). Desta forma, faz-se necessário a identificação de novos marcadores de suscetibilidade e prognóstico, a fim de suprir esta carência na detecção do câncer de próstata.

Genes da via apoptótica e genes supressores de tumor têm sido alvos neste tipo de busca, pois são responsáveis pela homeostase celular. Quando alterados, favorecem a sobrevivência celular, facilitando o surgimento de tumores, além de conferirem pior prognóstico ao paciente (GALLUZZI; KEPP; KROEMERK, 2012; TAN et al., 2012). Polimorfismos nos genes da via apoptótica *BCL-2*, *CASP3*, *CASP9* e no gene supressor tumoral *NKX3-1* parecem estar associados com a doença (LAVENDER et al., 2012; MITTAL et al., 2012; BACHMANN et al., 2011; AKAMATSU et al., 2010).

Dado o exposto, este estudo teve como objetivo avaliar SNPs em genes de apoptose (*CASP3*, *CASP9* e *BCL-2*) e supressor tumoral (*NKX3-1*) a fim de identificar marcadores moleculares para suscetibilidade e prognóstico para CaP. Os dados de genotipagem também foram associados com parâmetros clínicos dos pacientes e de seus controles e com dados histopatológicos do tumor, com o objetivo de encontrar possíveis marcadores para progressão da doença.

Material e Métodos:

Amostras

Amostras de DNA provenientes de 283 indivíduos portadores de câncer de próstata (pacientes) foram obtidas a partir de amostras de sangue periférico coletadas no Hospital do Câncer de Londrina no período de 2006 a 2015. Amostras de DNA provenientes de 283 indivíduos livres desta neoplasia (controles), foram obtidas a partir de amostras de sangue periférico coletadas no CISMENPAR (Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema-PR), Santa Casa de Londrina e Universidade Estadual de Londrina (UEL), no período de 2006 a 2015. Os sangues periféricos foram coletados por meio de punção intravenosa com agulhas e tubos descartáveis *vacutainer*, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Após este procedimento as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm e a fase intermediária (*buffy coat*), composta por leucócitos, foi transferida para tubos de 1,5

mL, extraído o DNA que foi armazenado a -20°C no biorepositório do Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina.

O uso de amostras já coletadas para execução de projetos anteriores foi aprovado pelos voluntários que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e responderam um questionário, modificado de Carrano e Natarajan (1988), sobre estilo de vida e exposição ocupacional (ANEXOS 1 e 2). Ambos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE: 19769913.0.0000.5231) (ANEXO 3).

O critério para seleção de pacientes para o presente estudo foi de indivíduos livres de tratamentos quimioterápico e/ou radioterápico. Todos os indivíduos responderam a um questionário contendo perguntas sobre idade, ancestralidade, exposição ocupacional a agroquímicos, estilo de vida (hábitos tabagista e etilista; consumo de carne vermelha), procedimento de vasectomia e histórico familiar de câncer. Foram considerados não tabagistas aqueles que nunca fumaram ou pararam de fumar a 10 anos ou mais. Foram considerados não etilistas aqueles que não consomem bebida alcoólica ou que pararam de beber a 10 anos ou mais. Os níveis de PSA dos indivíduos foram obtidos a partir de exames realizados anteriormente à entrevista, tendo sido considerado o nível inferior a 4 ng/mL como critério para seleção dos indivíduos controles.

Cada paciente foi pareado com seu respectivo controle por idade (\pm 5 anos), hábito tabagista, hábito etilista e ancestralidade, obtidos a partir dos questionários aplicados para cada indivíduo do estudo. Dados de escore de Gleason, extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, invasão de linfonodo, invasão perineural, bilateralidade do tumor e estadiamento da doença foram obtidos dos prontuários dos pacientes.

Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir das amostras de sangue congeladas utilizando-se o kit High Pure PCR Template Preparation (catálogo 11796828001; Roche®; Indianapolis, IN, USA), seguindo as orientações do fornecedor. A quantificação do DNA foi realizada por meio do equipamento Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (*Thermo Scientific*) e as amostras que apresentaram

razão 260/280nm de aproximadamente 1,8 foram consideradas adequadas para uso nos experimentos subsequentes.

Genotipagem dos genes *BCL-2*, *CASP3*, *CASP9* e *NKX3-1*

Foram escolhidos para serem avaliados polimorfismos (SNPs) validados nos bancos de dados públicos (Database of Single Nucleotide Polymorphisms/NCBI, 2015), dos genes *BCL-2* (rs2279115), *CASP3* (rs4647603), *CASP9* (rs1052571), e *NKX3-1* (rs11781886). As genotipagens foram realizadas para cada SNP utilizando-se a técnica de RT-PCR e sondas TaqMan® (*Applied Biosystems*), Genotyping Master mix (*Applied Biosystems*; Foster city, CA, USA) e 5ng de DNA genômico, seguindo as recomendações do fabricante.

Análise estatística

A análise da associação dos polimorfismos estudados com suscetibilidade em relação ao câncer de próstata 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 chance) e intervalo de confiança de 95%. Para verificar se os genótipos estudados estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, foi utilizado o teste do qui-quadrado.

A associação entre os genótipos e os parâmetros obtidos a partir dos prontuários (dados histopatológicos) e questionários foi realizada por análise de regressão logística univariada. O histórico familiar de câncer e histórico familiar de câncer de próstata ($p \leq 0,05$) foram incluídos para ajustar o modelo multivariado. Todas as análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software SPSS 22.0 (IBM, Armonk, NY, EUA).

Resultados

Os indivíduos eram predominantemente de ancestralidade caucasiana (85,5%). A idade média dos pacientes foi $65,47 \pm 7,15$ e a dos controles $63,74 \pm 8,21$ anos. A porcentagem de indivíduos tabagistas foi de 25,1% contra 74,9% que não faziam uso do tabaco e de etilistas foi 50,5% contra 49,5% não-etilistas. A média de PSA dos pacientes foi $15,78 \pm 41,40$ ng/mL e a dos controles $1,05 \pm 0,68$ ng/mL. O

histórico familiar de câncer e histórico familiar de câncer de próstata mostraram, na análise estatística univariada, diferenças significativas entre pacientes com CaP e controles (Tabela 1). Outros parâmetros como ancestralidade, exposição ocupacional a agroquímicos, procedimento de vasectomia e consumo de carne vermelha não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos. As principais características histopatológicas do tumor dos pacientes com CaP e nível de PSA estão detalhadas na Tabela 2. O teste do qui-quadrado foi realizado para todos os genes das duas populações separadamente, demonstrando que os mesmos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As frequências alélicas e genóticas dos genes *BCL-2*, *CASP3*, *CASP9* e *NKX3-1* não apresentaram associação estatisticamente significativa com CaP quando avaliadas individualmente (Anexo 4). Os fatores de risco que foram associados com CaP (histórico familiar de câncer e histórico familiar de CaP) foram ajustados no modelo de análise multivariada, onde foi observada significância estatística para os genótipos GA+AA do polimorfismo no gene *CASP9* (OR=1,16; IC95%=1,14-1,18; $p=0,000$), CT+TT do polimorfismo no gene *CASP3* (OR=1,22; IC95%=1,03-1,43; $p=0,021$) e do genótipo CC do polimorfismo no gene *NKX3-1* (OR=1,73; IC95%=1,05-2,84; $p=0,031$) (Tabela 3).

A análise univariada da associação dos diferentes genes em pares indicou que a combinação de genótipos dos genes *CASP3* e *NKX3-1* (CT+CC) aumentou a chance de CaP em 3,5 vezes (OR=3,5; IC95%=1,11-11,11; $p=0,033$). O mesmo ocorreu quando foram combinados os genótipos de *CASP9* e *NKX3-1* (GA+CC) (OR=3,5; IC95%=1,12-10,90; $p=0,031$) (Anexo 5).

A análise de genes combinados em pares, levando em consideração os fatores ajustados (histórico familiar de câncer e histórico familiar de câncer de próstata) por modelo multivariado, confirmou o resultado obtido na análise univariada somente para a combinação de genótipos dos genes *CASP3* e *NKX3-1* (CT+CC) (OR=3,79; IC95%=1,49-9,62; $p=0,005$) (Anexo 6).

TABELA 1 - Análise univariada de características clínicas, ocupacional e alimentar de pacientes com câncer de próstata e indivíduos controles

Características		Pacientes N (%)	Controles N (%)	Valor de <i>p</i>
Histórico familiar de câncer	Sim	163 (57,6)	121 (42,8)	0,000*
	Não	120 (42,4)	162 (57,2)	
Histórico familiar de câncer de próstata	Sim	55 (33,7)	25 (20,7)	0,016*
	Não	108 (66,3)	96 (79,3)	
Vasectomia	Sim	5 (1,8)	7 (2,5)	0,550
	Não	275 (98,2)	271 (97,5)	
Exposição ocupacional a agroquímicos	Sim	165 (58,3)	148 (52,3)	0,304
	Não	118 (41,7)	135 (47,7)	
Consumo de carne vermelha	Sim (1-4)	154 (54,4)	140 (49,5)	0,990
	Sim (5-7)	119 (42,0)	134 (47,3)	0,799
	Não	10 (3,5)	9 (3,2)	

*Resultado estatisticamente significativo, $p \leq 0.05$

1-4=consumo de carne de 1 a 4 vezes na semana; 5-7=consumo de carne de 5 a 7 vezes na semana

TABELA 2 – Características da amostra de acordo com nível de PSA dos pacientes e parâmetros histopatológicos do tumor

Parâmetros	Categorias	N	%
Nível de PSA* (ng/mL)	0 - 4,0	10	3,6
	4,1 - 10,0	147	53,3
	> 10,1	119	43,1
Escore de Gleason	3 – 6	127	48,1
	7	113	42,8
	8 – 10	24	9,1
Extensão extracapsular	Presença	98	38
	Ausência	160	62
Invasão de vesícula seminal	Presença	32	12,4
	Ausência	226	87,6
Invasão perineural	Presença	42	16,3
	Ausência	216	83,7
Bilateralidade	Presença	138	53,3
	Ausência	121	46,7
Invasão de linfonodo	Presença	6	2,5
	Ausência	232	97,5
Estadiamento	T2	154	60,2
	T3 e T4	102	39,8

*Dos 283 pacientes, 7 não possuíam informação sobre o nível de PSA

TABELA 3 – Frequências genótípicas e alélicas dos genes *BCL-2*, *CASP3*, *CASP9* e *NKX3-1* em paciente e em seus respectivos controles

Genes (SNP)	Genótipos	Pacientes com CaP N (%)	Indivíduos controle N (%)	OR (IC95%)	Valor de p
<i>BCL-2</i> (rs2279115)	CC	79 (27,9)	75 (26,5)	Ref.	
	CA	138 (48,8)	130 (45,9)	1,50 (0,66-3,43)	0,331
	AA	66 (23,3)	78 (27,6)	1,06 (0,42-2,66)	0,905
	CA + AA	204 (72,1)	208 (73,5)	1,32 (0,48-3,60)	0,589
<i>CASP3</i> (rs4647603)	CC	206 (72,8)	205 (72,4)	Ref.	
	CT	73 (25,8)	67 (23,7)	1,29 (0,75-2,21)	0,354
	TT	4 (1,4)	11 (3,9)	0,54 (0,09-3,17)	0,498
	CT + TT	77 (27,2)	78 (27,6)	1,22 (1,03-1,43)	0,021*
<i>CASP9</i> (rs1052571)	GG	61 (21,6)	68 (24,0)	Ref.	
	GA	151 (53,4)	132 (46,6)	1,32 (0,89-1,96)	0,171
	AA	71 (25,1)	83 (29,3)	0,95 (0,60-1,51)	0,838
	GA + AA	221 (78,1)	214 (76,0)	1,16 (1,14-1,18)	0,000*
<i>NKX3-1</i> (rs11781886)	TT	135 (47,7)	153 (54,1)	Ref.	
	TC	117 (41,3)	104 (36,7)	1,01 (0,74-1,39)	0,942
	CC	31 (11)	26 (9,2)	1,73 (1,05-2,84)	0,031*
	TC + CC	148 (52,3)	130 (45,9)	1,14 (0,85-1,55)	0,381

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

Os resultados obtidos a partir da análise dos dados histopatológicos demonstraram que o polimorfismo rs2279115 presente no gene *BCL-2* influencia fortemente a chance de CaP mais agressivo. O genótipo CA foi associado com vários fatores, como bilateralidade do tumor, tumor com extensão extracapsular (não confinado), bem como com invasão de vesícula seminal e invasão perineural. O genótipo raro (AA) mostrou associação com extensão extracapsular e nível elevado de PSA. Quando ambos genótipos dos pacientes foram combinados, houve associação significativa para bilateralidade do tumor, tumor com extensão extracapsular e invasão perineural. Do mesmo modo, o genótipo CC e a combinação TC+CC do rs11781886 (gene *NKX3-1*) indicaram associação com bilateralidade do tumor (Tabela 4 e 5).

Os genótipos CA e CA+AA (rs2279115, gene *BCL-2*); a combinação genotípica TT+TC (rs4647603, gene *CASP3*) e a combinação dos genes *BCL-2* + *NKX-3* (CA+CC) e *BCL-2* + *CASP3* (CA+CC; CA+CT e AA+CT), mostraram associação com progressão do tumor para estadiamento T3 e T4 (Tabela 5). Os genótipos CA, AA e CA+AA de *BCL-2*, assim como a combinação genotípica entre *BCL-2* e *CASP3* (CA+CT e AA+CC) também foram associados com níveis elevados de PSA (Tabela 5). Nenhum resultado significativo foi obtido entre associação dos dados histopatológicos e o SNP rs4647603 do gene *CASP9*.

A análise dos dados obtidos para extensão extracapsular e bilateralidade do tumor associados com os genes combinados em pares demonstrou que as combinações dos genes *BCL-2* + *NKX3-1* (CA+TC) e *BCL-2* + *CASP3* (CA+CC; CA+CT; AA+CT) aumentaram a chance de desenvolver tumor extracapsular (Tabela 6). Também foi encontrada chance maior de 4 vezes para bilateralidade do tumor quando as seguintes combinações foram realizadas: *BCL-2* + *NKX3-1* (CA+CT; CC+CC). Do mesmo modo, a combinação entre genótipos dos genes *BCL-2* e *CASP3* (CA+CC) demonstrou aumento de 2,56 vezes na chance de bilateralidade do tumor (Tabela 6).

TABELA 4 – Associação de dados histopatológicos de pacientes com câncer de próstata e os genótipos dos genes *BCL-2* e *NKX3-1*

Genes/rs	Genótipos	Bilateralidade (N=259)			Extensão extracapsular (N=258)			Invasão de vesícula seminal (N=258)			Invasão perineural (N=258)		
		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>BCL-2</i> rs2279115	CC	28 (20,3)	41 (33,9)	Ref.	16 (16,3)	52 (32,5)	Ref.	4 (12,5)	64 (28,3)	Ref.	4 (9,5)	64 (29,6)	Ref.
	CA	79 (57,2)	51 (42,1)	2,27 (1,25-4,12)*	56 (57,1)	74 (46,3)	2,46 (1,27-4,75)*	21 (65,6)	109 (48,2)	3,08 (1,01-9,38)*	28 (66,7)	102 (47,2)	4,39 (1,47-13,11)*
	AA	31 (22,5)	29 (24,0)	1,57 (0,78-3,15)	26 (26,5)	34 (21,3)	2,49 (1,17-5,30)*	7 (21,9)	53 (23,5)	2,1 (0,59-7,61)	10 (23,8)	50 (23,1)	3,2 (0,95-10,81)
	CA+AA	110 (79,7)	80 (66,1)	2,01 (1,15-3,53)*	82 (83,7)	108 (67,5)	2,47 (1,32-4,63)*	28 (87,5)	162 (71,7)	2,77 (0,93-8,20)	38 (90,5)	152 (70,4)	4 (1,37-11,67)*
<i>NKX3-1</i> rs11781886	TT	57 (41,3)	66 (54,5)	Ref.	42 (42,9)	81 (50,6)	Ref.	11 (34,4)	112 (49,6)	Ref.	22 (52,4)	101 (46,8)	Ref.
	TC	60 (43,5)	48 (39,7)	1,45 (0,86-2,43)	45 (45,9)	63 (39,4)	1,38 (0,81-2,35)	18 (56,3)	90 (39,8)	2,04 (0,92-4,53)	18 (42,9)	90 (41,7)	0,92 (0,46-1,82)
	CC	21 (15,2)	7 (5,8)	3,47 (1,38-8,77)*	11 (11,2)	16 (10,0)	1,33 (0,56-3,11)	3 (9,4)	24 (10,6)	1,27 (0,33-4,91)	2 (4,8)	25 (11,6)	0,37 (0,81-1,67)
	TC+CC	81 (58,7)	55 (45,5)	1,71 (1,42-2,79)*	56 (57,1)	79 (49,4)	1,37 (0,82-2,27)	21 (65,6)	114 (50,4)	1,88 (0,88-4,07)	20 (47,6)	115 (53,2)	0,80 (0,41-1,55)

OR (IC95%)=Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%.

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

P=presente; A= ausente.

TABELA 5 – Associação de estadiamento do tumor e níveis de PSA com os genótipos dos genes *BCL-2*, *CASP3* e *NKX3-1*

Genes/rs	Genótipos	Estadiamento			Nível de PSA		
		T2 N (%)	T3, T4 N (%)	OR (IC95%)	0-10,0 N (%)	> 10,01	OR (IC95%)
BCL-2 rs2279115	CC	50 (32,5)	18 (17,6)	Ref.	129 (29,4)	22 (18,5)	Ref.
	CA	70 (45,5)	59 (57,8)	2,34 (1,23-4,44)*	201 (45,8)	63 (52,9)	2,15 (1,18-3,91)*
	AA	34 (22,1)	25 (24,5)	2,04 (0,97-4,31)	109 (24,8)	34 (28,6)	2,69 (1,34-5,39)*
	CA+AA	104 (67,5)	84 (82,4)	2,24 (1,22-4,13)*	310 (70,6)	97 (81,5)	2,31 (1,31-4,08)*
CASP3 rs4647603	CC	120 (77,9)	68 (66,7)	Ref.	302 (72,9)	88 (73,9)	Ref.
	CT	32 (20,8)	32 (31,4)	1,7 (0,10-3,13)	106 (24,1)	30 (25,2)	1,01 (0,58-1,74)
	TT	2 (1,3)	2 (2,0)	1,77 (0,24-12,812)	13 (3,0)	1 (0,8)	0,44 (0,05-4,26)
	TT + TC	34 (22,1)	34 (33,3)	1,77 (1,07-3,09)*	119 (27,1)	31 (26,1)	0,97 (0,56-1,66)
BCL2 + NKX3-1 rs2279115 + rs11781886	CC+TT	23 (14,9)	8 (7,8)	Ref.	57 (13,0)	13 (10,9)	Ref.
	CC+TC	19 (12,3)	7 (6,9)	1,06 (0,33-3,46)	55 (12,5)	5 (4,2)	0,37 (0,11-1,20)
	CC+CC	8 (5,2)	3 (2,9)	1,08 (0,23-5,08)	17 (3,9)	4 (3,4)	0,75 (0,19-2,94)
	CA+TT	39 (25,3)	28 (27,5)	2,06 (0,81-5,28)	107 (24,4)	36 (30,3)	1,740,76-3,99)
	CA+TC	28 (18,2)	25 (24,5)	2,57 (0,98-6,76)	75 (17,1)	24 (20,2)	1,35 (0,57-3,23)
	CA+CC	3 (1,9)	6 (5,9)	5,75 (1,16-28,55)*	19 (4,3)	3 (2,5)	0,73 (0,16-3,30)
	AA+TT	17 (11,0)	8 (7,8)	1,35 (0,42-4,33)	63 (14,4)	10 (8,4)	0,94 (0,34-2,64)
	AA+TC	14 (9,1)	13 (12,7)	2,67 (0,89-8,05)	39 (8,9)	17 (14,3)	2,40 (0,88-6,57)
AA+CC	3 (1,9)	4 (3,9)	3,83 (0,70-20,971)	7 (1,6)	7 (5,9)	11, 85 (1,31-107,41)	

TABELA 6 – Associação de estadiamento do tumor e níveis de PSA com os genótipos dos genes *BCL-2*, *CASP3* e *NKX3-1*

<i>BCL-2 + CASP3</i>	CC+CC	37 (24,0)	11 (10,8)	Ref.	93 (21,2)	16 (13,4)	Ref.
rs2279115+	CC+CT	12 (7,8)	7 (6,9)	1,96 (0,62-6,20)	32 (7,3)	6 (5,0)	0,95 (0,31-2,89)
rs4647603	CC+TT	1 (0,6)	.	.	4 (0,9)	.	.
	CA+CC	56 (36,4)	42 (41,2)	2,52 (1,15-5,52)*	150 (34,2)	47 (39,5)	1,99 (0,99-4,02)
	CA+CT	13 (8,4)	17 (16,7)	4,40 (1,64-11,80)*	48 (10,9)	16 (13,4)	2,53 (1,02-6,33)*
	CA+TT	1 (0,6)	.	.	3 (0,7)	.	.
	AA+CC	27 (17,5)	15 (14,7)	1,87 (0,74-4,70)	77 (17,5)	25 (21,0)	2,83 (1,24-6,44)*
	AA+CT	7 (4,5)	8 (7,8)	3,84 (1,14-12,99)*	26 (5,9)	8 (6,7)	2,11 (0,69-6,45)
	AA+TT	.	2 (2)	.	6 (1,4)	1 (0,8)	2,38 (0,14-40,35)

T3 e T4 = Tumor estende-se através da cápsula prostática; T2= categoria referência; 0-10= categoria de referência para PSA.

OR (IC95%)=Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%.

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

TABELA 7 – Associação de extensão extracapsular e bilateralidade do tumor com combinações genóticas dos genes *BCL-2*, *NKX3-1* e *CASP3* em pacientes com câncer de próstata

Genes	Genótipos	Extensão extracapsular			Bilateralidade		
		P N (%)	A N (%)	OR (IC95%)	P N (%)	A N (%)	OR (IC95%)
BCL-2 + NKX3-1 rs2279115 + rs117881886	CC + TT	7 (7,1)	24 (15)	Ref.	12 (8,7)	19 (15,7)	Ref.
	CA + TC	25 (25,5)	29 (18,1)	2,96 (1,09-8,01)*	39 (28,3)	15 (12,4)	4,12 (1,61-10,50)*
	CC + CC	2 (2,0)	9 (5,56)	0,76 (0,13-4,48)	9 (6,5)	3 (2,5)	4,75 (1,07-21,14)*
BCL-2 + CASP3 rs2279115 + rs4647603	CC + CC	10 (10,2)	38 (23,8)	Ref.	18 (13)	30 (24,8)	Ref.
	CA + CC	41 (41,8)	58 (36,3)	2,69 (1,20-6,00)*	60 (43,5)	39 (32,2)	2,56 (1,26-5,22)*
	CA + CT	15 (15,3)	15 (9,4)	3,80 (1,40-10,316)*	18 (13)	12 (9,9)	2,50 (0,98-6,37)
	AA + CT	8 (8,2)	7 (4,4)	4,34 (1,27-14,87)*	8 (5,8)	7 (5,8)	1,91 (0,59-6,14)

OR (IC95%)=Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%.

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

Discussão

A amostra do presente estudo foi composta por 58,7% de pacientes com CaP com idade igual ou superior a 65 anos, confirmando dados descritos na literatura, que associam diretamente o risco aumentado da doença com idade avançada (American Cancer Society, Cancer Facts & Figures, 2016; THORSTENSON et al., 2017).

Outras características avaliadas nesta amostra e relacionados com o risco da doença foram o histórico familiar de câncer e histórico familiar de CaP ($p=0,000$ e $p=0,016$, respectivamente). No presente estudo 57,6% dos pacientes possuíam pelo menos um parente de primeiro grau com algum tipo de câncer e 33,7% tinham parentes de primeiro grau com CaP. Estes dados estão de acordo com Lynch et al. (2016), que afirmaram que o risco para esta doença é proporcional ao número de parentes de primeiro grau acometidos e idade ao diagnóstico.

No presente estudo a associação do rs2279115 (proto-oncogene *BCL-2*) com o rs11781886 presente no gene supressor tumoral *NKX3-1*, conferiu maior suscetibilidade ao CaP. Isto pode ser consequência do desequilíbrio celular causado pelo aumento da proteína inibidora de apoptose BCL-2 e diminuição da expressão do supressor tumoral *NKX3-1* (NAKAGAWA et al., 2012; AKAMATSU et al., 2010), uma vez que proto-oncogenes e genes supressores tumorais são conhecidos por regularem o ciclo celular (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Em níveis normais a proteína BCL-2 é inibida por proteínas pró-apoptóticas, resultando em inibição da proliferação celular e favorecimento da apoptose (AKL et al., 2014; SORENSON, 2004; BURLACU, 2003). No entanto, segundo Nüchel et al. (2007), o SNP rs2279115, presente no promotor inibitório P2 aumenta a expressão de *BCL-2*, o que inibe a apoptose, favorecendo a sobrevivência celular, facilitando o desenvolvimento de tumores e piorando o prognóstico do paciente. Isto foi confirmado por Yoshino et al. (2006), que encontraram associação entre a superexpressão da proteína BCL-2 com alto escore de Gleason e CaP hormônio refratário.

No presente estudo a análise do mesmo polimorfismo demonstrou que a presença do alelo A (AA, CA ou CA + AA) foi associada com pior prognóstico quando comparado com o genótipo CC. Esses resultados analisados conjuntamente com os achados de Bachmann et al. (2011), indicam este SNP como um potencial marcador de prognóstico para esta doença.

Expresso predominantemente na próstata e envolvido na regulação da proliferação das células epiteliais e, conseqüentemente, no processo de crescimento normal da glândula, o gene supressor tumoral *NKX3-1*, quando alterado, parece influenciar no desenvolvimento de CaP tanto por sofrer redução na expressão do mRNA (KRISTIANSEN, 2012; BETHEL et al., 2006; ASATIANI et al., 2005), quanto por participar positivamente na regulação do gene *AR* (receptor de andrógeno), que é superexpresso em CaP avançado e recorrente (TAN et al., 2012).

Ao contrário do obtido para o proto-oncogene *BCL-2*, as variantes polimórficas do gene supressor tumoral *NKX3-1* (rs11781886), apresentaram, no presente estudo, associação com suscetibilidade para o CaP de maneira isolada (Tabela 3). Akamatsu et al. (2010) sugeriram que este SNP influencia a expressão proteica, facilitando o acúmulo de mutações e aumentando a chance de desenvolver esta neoplasia.

O polimorfismo rs11781886, presente na região 5'UTR do gene *NKX3-1*, reprime a atividade transcricional do promotor e diminui a expressão do mRNA (AKAMATSU et al., 2010; NAKAGAWA et al., 2012), estando associado com adenocarcinomas prostáticos metastáticos, o que confere aos pacientes um pior prognóstico da doença (GUREL et al., 2010). Por este motivo, pode-se supor que a associação encontrada no presente estudo entre variantes deste polimorfismo e bilateralidade do tumor (Tabela 4) seja resultado da alteração na função normal do gene. Estes dados reforçam os achados de Magee, Abdulkadir e Milbrandt (2003), que indicaram que a deleção de um ou dois alelos em *NKX3-1* é capaz de prolongar a fase proliferativa, bem como favorecer proliferação exacerbada, levando a um pior prognóstico.

Responsável por desempenhar papel chave no processo de morte celular programada, o gene *CASP3*, quando perde sua função, favorece o

desenvolvimento de tumores (LARSEN et al., 2010). As variantes polimórficas deste gene (rs4647603, presente na região 5'UTR) avaliadas nos indivíduos do presente estudo, apresentaram associação com suscetibilidade para o CaP de maneira isolada (Tabela 3). Este polimorfismo parece alterar a transcrição do gene, influenciando sua expressão e contribuindo para o desenvolvimento de câncer (CHEN et al., 2008). Mittal et al. (2012) associaram este SNP com o risco aumentado de desenvolver CaP. A diminuição da expressão da proteína CASP3, causada pelo polimorfismo rs4647603, e da proteína NKX3-1, causada pelo SNP rs11781886 juntas, parecem estar associadas com maior risco de desenvolver CaP. Apesar de estudos associando estes dois polimorfismos com a doença não terem sido relatados anteriormente, acreditamos que o resultado obtido neste estudo seja consequência da perda do controle celular causada pela baixa taxa apoptótica e redução da capacidade de supressor tumoral.

No presente estudo o polimorfismo rs4647603 (*CASP3*) conferiu um pior prognóstico aos pacientes com CaP, pois foi associado com estadiamento tumoral T3 e T4. Associação deste polimorfismo foi descrita em CaP (MITTAL et al., 2012) e em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CHEN et al., 2008).

O SNP rs1052571 (*CASP9*) avaliado no presente estudo também apresentou, de maneira isolada, associação com suscetibilidade para o câncer de próstata e este parece ser o primeiro relato na literatura. Lavender et al. (2012) observaram em análise univariada associação deste polimorfismo com redução da suscetibilidade à doença em homens americanos de ancestralidade europeia. Entretanto, nenhum resultado significativo foi visto em análise multivariada. Resultados negativos também foram vistos por Zhang et al. (2013) ao investigarem a associação deste polimorfismo com suscetibilidade em desenvolver câncer de pulmão. Porém, Marques et al. (2013) observam que a presença do alelo raro (A) em mulheres portuguesas aumentou o risco de desenvolver carcinoma de célula renal.

A suscetibilidade para o CaP parece ser resposta da influência desta variante (rs1052571) na formação defeituosa do apoptossomo, que impede que a proteína pró-caspase 3 seja clivada e ativada para que possa desempenhar sua função apoptótica (LAVENDER et al., 2012).

A análise estatística univariada realizada no presente estudo da combinação dos polimorfismos dos genes *CASP3* com *NKX3-1* e *CASP9* com *NKX3-1*, indicou associação destas com aumento de risco de CaP em 3,5 vezes. No entanto, na análise multivariada ajustada a combinação dos polimorfismos dos genes *CASP9* com *NKX3.1* não se manteve e nova associação entre SNPs dos genes *BCL-2* com *NKX3-1* foi observada com aumento de chance de 3,73 vezes de desenvolver a doença (Anexo 6).

Além das associações encontradas no presente estudo entre os polimorfismos e os dados histopatológicos, foram encontradas associações entre polimorfismos combinados em pares com os mesmos dados. Até o momento, este parece ser o primeiro estudo demonstrando essas associações em pacientes com CaP.

Os polimorfismos rs2279115 (*BCL-2*) e rs4647603 (*CASP3*) quando combinados demonstraram associação com os parâmetros de estadiamento T3 e T4, extensão extracapsular, bilateralidade e níveis elevados de PSA. A relação destes SNPs com um pior prognóstico pode ser facilmente explicada, uma vez que ambos os genes atuam em via apoptótica. Ainda que o SNP em *CASP3* não tenha sua função completamente esclarecida, parece alterar a transcrição do gene (MITTAL et al., 2012; CHEN et al., 2008).

A combinação dos SNPs rs2279115 (gene *BCL-2*) e rs11781886 (gene *NKX3-1*) também foi associada com estadiamento T3 e T4, extensão extracapsular e bilateralidade. A alteração na expressão do gene *BCL-2* causada pelo polimorfismo estudado altera a regulação normal do ciclo celular por aumentar a expressão da proteína, inibindo a apoptose (NÜCKEL et al., 2007). Por outro lado, o polimorfismo presente em *NKX3-1* diminui a expressão da proteína *NKX3-1*, reduzindo sua capacidade de supressor tumoral e favorecendo a sobrevivência e proliferação celulares (NAKAGAWA et al., 2012; AKAMATSU et al., 2010).

Conclusão

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que os SNPs avaliados nos genes *CASP3*, *CASP9* e *NKX3-1* estão associados com a suscetibilidade em desenvolver CaP, podendo-se inferir que estes sejam marcadores moleculares candidatos de suscetibilidade para esta neoplasia. Além disso, a associação dos polimorfismos presentes nos genes *BCL-2*, *CASP3* e *NKX3-1* com dados histopatológicos demonstrou forte associação com pior prognóstico, indicando a importância dessas variantes polimórficas na progressão do tumor, e indicando-os como marcadores candidatos para prognóstico do câncer de próstata.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMIS S., VARKARAKIS I. M. Defining prostate cancer risk after radical prostatectomy. **European Journal of Surgical Oncology**, v.40, n. 5, p. 496-504, mai. 2014.
- AKAMATSU, S. et al. A functional variant in Nkx3. 1 associated with prostate cancer susceptibility down-regulates NKX3. 1 expression. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 19, n. 21, p. 4265-4272, ago. 2010.
- AKL, H. et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 10, p. 2240–2252, out. 2014.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2016. **Cancer Facts & Figures 2016**, p. 1–9, 2016.
- ASATIANI, E. et al. Deletion, methylation, and expression of the NKX3. 1 suppressor gene in primary human prostate cancer. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 65, n. 4, p. 1164-1173, fev. 2005.
- BACHMANN, H. S. et al. Regulatory BCL2 promoter polymorphism (– 938C> A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma. **International Journal of Cancer**, Malden, v. 129, n. 10, p. 2390-2399, nov. 2011.
- BAKST R. L., WONG R. J. Mechanisms of Perineural Invasion. **Journal of Neurological Surgery**, Nova Iorque, v. 77, n. 2, p. 96-106, 2016.
- BASSIL, K.L. et al. Cancer health effects of pesticides. **Canadian Family Physician**, Mississauga v. 53, n. 10, p.1704-1711, out. 2007.
- BENSALAH, K.; ROUPRET, M.; XYLINAS, E.; SHARIAT, S. The survival benefit of lymph node dissection at the time of removal of kidney, prostate and urothelial carcinomas: what is the evidence? **World Journal Urology**. v.31, n. 6, p. 1369-76, dez. 2013.
- BETHEL, C. R. et al. Decreased NKX3. 1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 66, n. 22, p. 10683-10690, nov. 2006.
- BURLACU, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Malden, v. 7, n. 3, p 249-257, jul. 2003.
- CARY, K. C.; COOPERBERG, M. R. Biomarkers in prostate cancer surveillance and screening: past, present, and future. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 5, n. 6, p. 318-329, jul. 2013.
- CHEN, K. et al. CASP3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 14, n. 19, p. 6343-6349, out. 2008.
- DALL'ERA, M. A ALBERTSEN, P. C. et al. Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of the literature. **Europe Urology**, v. 62, n. 6, p. 976–983, dez. 2012.

- EKMAN, P. Genetic and environmental factors in prostate cancer genesis: identifying high-risk cohorts. **European Urology**, Sheffield, v. 35, n. 5-6, p. 362-369, mai/jun.1999.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, jun. 2007.
- GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Caspase-3 and prostaglandins signal for tumor regrowth in cancer therapy. **Oncogene**, Nova Iorque, v. 31, n. 23, p. 2805-2808, 2012.
- GUREL, B.; ALI, K. Z. et al. NKX3. 1 as a marker of prostatic origin in metastatic tumors. **The American Journal of Surgical Pathology**, Londres, v. 34, n. 8, p. 1097-1105, ago. 2010.
- HSING A. W.; CHOKKALINGAM A. P. Prostate cancer epidemiology. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, n. 5, p. 1388-1413, 2006.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.** Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>. Acesso em: 17 out. 2016.
- KARAVITAKIS, M. et al. Tumor focality in prostate cancer: implications for focal therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, Londres, v.8, n. 1, p. 48-55, jan. 2011.
- KRISTIANSEN, G. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. **Histopathology**, Malden, v. 60, n. 1, p. 125-141. Jan. 2012.
- LARSEN, B. D. et al. L. A. Caspase 3/caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 107, n. 9, p. 4230-4235, mar, 2010.
- LAVENDER, N. A. et al. Interaction among apoptosis-associated sequence variants and joint effects on aggressive prostate cancer. **BMC Medical Genomics**, Londres, v. 5, n. 1, p. 5-11, abr. 2012.
- LYNCH, H. T. et al. Screening for familial and hereditary prostate cancer. **International Journal of Cancer**, Malden, v. 138, n. 11, p. 2579–2591, jun. 2016.
- MAGEE, J. A.; ABDULKADIR, S. A.; MILBRANDT, J. Haploinsufficiency at the Nkx3. 1 locus: a paradigm for stochastic, dosage-sensitive gene regulation during tumor initiation. **Cancer Cell**, Maryland Heights, v. 3, n. 3, p. 273-283, mar. 2003.
- MARQUES, I. et al. Influence of survivin (BIRC5) and caspase-9 (CASP9) functional polymorphisms in renal cell carcinoma development: a study in a southern European population. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 8, p. 4819-4826, ago. 2013.
- MARTINEZ, E. E. et al. A functional variant in NKX3.1 associated with prostate cancer risk in the Selenium and Vitamin e Cancer Prevention Trial (SELECT). **Cancer Prevention Research**, Philadelphia, v. 7, n. 9, p. 950–957, jun. 2014.
- MEYER, A. et al. Apoptosis gene polymorphisms and risk of prostate cancer: A hospital-based study of German patients treated with brachytherapy. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 31, n. 1, p. 74–81, jan. 2013.

MITTAL, R. D.; MITTAL, T.; SINGH, A. K.; MANDAL, R. K. Association of caspases with an increased prostate cancer risk in north Indian population. **DNA and Cell Biology**, New Rochelle, v. 31, n. 1, p. 67-73, jan. 2012.

MOTTET, N. et al. Guidelines on Prostate Cancer. **European Association of Urology**, abr. 2014

MOURAVIEV, V. et al. Prostate cancer laterality as a rationale of focal ablative therapy for the treatment of clinically localized prostate cancer. **Cancer**. Malden, v.110, n. 4, p.906–910, ago. 2007.

NAKAGAWA, H. et al. Prostate cancer genomics, biology, and risk assessment through genome-wide association studies. **Cancer Science**, Malden, v. 103, n. 4, p. 607-613, abr. 2012.

NÜCKEL, H. et al. Association of a novel regulatory polymorphism (– 938C> A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, Washington, v. 109, n. 1, p. 290-297, set. 2007.

NUTT, M.; REED, Z.; KÖHLER, T. S. Vasectomy and prostate cancer risk: a historical synopsis of undulating false causality. **Research and Reports in Urology**. v.8, p.85–93, jul. 2016.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 2, p. 97-106, abr. 2016.

SHIOZAKI, E. N.; CHAI, J.; SHI, Y. Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 99, n. 7, p. 4197-4202, abr. 2002.

SORENSEN, C. M. Bcl-2 family members and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, n. 2–3, p. 169–77, mar. 2004.

TAN, P. Y. et al. Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 32, n. 2, p. 399-414, jan. 2012.

THORSTENSON, A.; GARMO, H.; ADOLFSSON, J.; BRATT, O. Cancer-specific mortality in men diagnosed with prostate cancer before age 50 years, a nationwide population-based study. **The Journal of Urology**, Linthicum, v. 20, n. 10, p. 59-59, jan. 2016.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, Malden. v. 36, n. 3, p. 131-149, jun. 2003.

YOSHINO, T. et al. Bcl-2 expression as a predictive marker of hormone-refractory prostate cancer treated with taxane-based chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 12, n. 20, p. 6116-6124, out. 2006.

ZHANG, Z. Y. et al. A literature-based systematic HuGE review and meta-analysis show that CASP gene family polymorphisms are associated with risk of lung cancer. **Genetics and Molecular Research**, São Francisco, v. 12, n. 3, p. 3057-3069, jan. 2013.

VII. APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES E CONTROLES

1. 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^ª. Dr^ª. Ilce Mara de Syllos Cólus

Assinatura do pesquisador responsável

Marilesia Ferreira de Souza

Coletor / Entrevistador

2. 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: _____

3. 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^ª. Dr^ª. Ilce Mara de Syllos Cólus
Assinatura do pesquisador responsável

Marilesia Ferreira de Souza
Coletor / Entrevistador

4. Consentimento pós-informado para 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 nº _____

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

() Antinflamatório

() 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	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()
Frango	()	()	()	()
Porco	()	()	()	()
Outros	()	()	()	()

Histórico genético

33- Você possui algum irmão idêntico? () SIM () NÃO

VIII. APÊNDICE 3

Frequências genótípicas e alélicas dos genes *BCL-2*, *CASP3*, *CASP9*, *NKX3-1* em pacientes e em seus respectivos controles.

Genes (SNP)	Genótipos	Pacientes com CaP N (%)	Indivíduos controle N (%)	OR (IC95%)	Valor de <i>p</i>
<i>BCL-2</i> (rs2279115)	CC	79 (27,9)	75 (26,5)	Ref.	
	CA	138 (48,8)	130 (45,9)	1,01 (0,68-1,50)	0,969
	AA	66 (23,3)	78 (27,6)	0,80 (0,51-1,27)	0,346
	CA+AA	204 (72,1)	208 (73,5)	0,93 (0,64-1,35)	0,706
<i>CASP3</i> (rs4647603)	CC	206 (72,8)	205 (72,4)	Ref.	
	CT	73 (25,8)	67 (23,7)	1,08 (0,74-1,59)	0,680
	TT	4 (1,4)	11 (3,9)	0,36 (0,11-1,16)	0,086
	CT+TT	77 (27,2)	78 (27,6)	0,98 (0,68-1,42)	0,925
<i>CASP9</i> (rs1052571)	GG	61 (21,6)	68 (24,0)	Ref.	
	GA	151 (53,4)	132 (46,6)	1,28 (0,84-1,94)	0,253
	AA	71 (25,1)	83 (29,3)	0,95 (0,60-1,52)	0,843
	GA+AA	221 (78,1)	214 (76,0)	1,12 (0,76-1,67)	0,549
<i>NKX3-1</i> (rs11781886)	TT	135 (47,7)	153 (54,1)	Ref.	
	TC	117 (41,3)	104 (36,7)	1,28 (0,90-1,81)	0,175
	CC	31 (11)	26 (9,2)	1,35 (0,76-2,39)	0,301
	TC+CC	148 (52,3)	130 (45,9)	1,29 (0,93-1,79)	0,130

OR (IC95%)=Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%.

*Valor estatisticamente significativo $p \leq 0.05$

X. APÊNDICE 4

Associação entre os genótipos dos genes *BCL-2*, *CASP3*, *CASP9*, *NKX3-1* em pacientes com câncer de próstata e seus controles.

Genes (SNP)		Pacientes com CaP N (%)	Indivíduos controle N (%)	OR (IC95%)	Valor de <i>p</i>
<i>BCL-2 + CASP3</i>	CC+CC	54 (19,1)	55 (19,4)	Ref.	
	CC+CT	24 (8,5)	17 (6,0)	1,44 (0,70-2,97)	0,327
	CC+TT	1 (0,4)	3 (1,1)	0,34 (0,03-3,37)	0,356
	CA+CC	105 (37,1)	94 (33,2)	1,14 (0,71-1,82)	0,588
	CA+CT	32 (11,3)	33 (11,7)	0,99 (0,53-1,83)	0,968
	CA+TT	1 (0,4)	3 (1,1)	0,34 (0,03-3,37)	0,356
	AA+CC	47 (16,6)	56 (19,8)	0,86 (0,50-1,47)	0,569
	AA+CT	17 (6,0)	17 (6,0)	1,02 (0,47-2,20)	0,963
	AA+TT	2 (0,7)	5 (1,8)	0,41 (0,08-2,19)	0,295
<i>BCL-2 + CASP9</i>	CC+GG	15 (5,3)	16 (5,7)	Ref.	
	CC+GA	49 (17,3)	36 (12,7)	1,45 (0,64-3,31)	0,376
	CC+AA	15 (5,3)	23 (8,1)	0,70 (0,27-1,81)	0,458
	GA+GG	31 (11)	32 (11,3)	1,03 (0,43-2,44)	0,940
	CA+GA	73 (25,8)	65 (23,0)	1,20 (0,55-2,61)	0,650
	CA+AA	34 (12,0)	33 (11,7)	1,09 (0,47-2,58)	0,828
	AA+GG	15 (5,3)	20 (7,1)	0,80 (0,30-2,11)	0,653
	AA+GA	29 (10,2)	31 (11,0)	1,00 (0,42-2,38)	0,996
	AA+AA	22 (7,8)	27 (9,5)	0,87 (0,35-2,14)	0,760

OR (IC95%)=Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%.

*Valor estatisticamente significativo $p \leq 0.05$

<i>BCL-2 + NKX3-1</i>	CC +TT	36 (12,7)	35 (12,4)	Ref.	
	CC+TC	30 (10,6)	32 (11,3)	0,91 (0,46-1,80)	0,790
	CC+CC	13 (4,6)	8 (2,8)	1,58 (0,58-4,28)	0,368
	CA+TT	71 (25,1)	73 (25,8)	0,95 (0,54-1,67)	0,847
	CA+TC	57 (20,1)	46 (15,9)	1,23 (0,67-2,26)	0,502
	CA+CC	10 (3,5)	12 (4,2)	0,81 (0,31-2,11)	0,667
	AA+TT	28 (9,9)	45 (15,9)	0,61 (0,31-1,17)	0,137
	AA+TC	30 (10,6)	27 (9,5)	1,08 (0,54-2,17)	0,828
	AA+CC	8 (2,8)	6 (2,1)	1,30 (0,41-4,12)	0,660
<i>CASP3 + NKX3-1</i>	CC+TT	101 (35,7)	109 (38,5)	Ref.	
	CC+TC	87 (30,7)	77 (27,2)	1,22 (0,81-1,84)	0,342
	CC+CC	18 (6,4)	19 (6,7)	1,02 (0,51-2,06)	0,950
	CT+TT	34 (12,0)	39 (13,8)	0,94 (0,55-1,60)	0,823
	CT+TC	26 (9,2)	24 (8,5)	1,16 (0,63-2,17)	0,620
	CT+CC	13 (4,6)	4 (1,4)	3,51 (1,11-11,11)	0,033*
	TT+TT	0 (0,0)	5 (1,8)	-	-
	TT+TC	4 (1,4)	3 (1,1)	1,44 (0,31-6,59)	0,639
	TT+CC	0 (0,0)	3 (1,1)	-	-
<i>CASP9 + NKX3-1</i>	GG+TT	28 (9,9)	35 (12,4)	Ref.	
	GG+TC	23 (8,1)	22 (7,8)	1,31 (0,61-2,82)	0,494
	GG+CC	10 (3,5)	11 (3,9)	1,14 (0,42-3,06)	0,800

OR (IC95%)=Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%.

*Valor estatisticamente significativo $p \leq 0.05$

	GA+TT	71 (25,1)	72 (25,4)	1,23 (0,68-2,24)	0,491
	GA+TC	66 (23,3)	55 (19,4)	1,50 (0,81-2,78)	0,194
	GA+CC	14 (4,9)	5 (1,8)	3,50 (1,12-10,90)	0,031*
	AA+TT	36 (12,7)	46 (16,3)	0,98 (0,51-1,90)	0,948
	AA+TC	28 (9,9)	27 (9,5)	1,30 (0,63-2,68)	0,483
	AA+CC	7 (2,5)	10 (3,5)	0,86 (0,30-2,60)	0,810
<i>CASP9 + CASP3</i>	GG+CC	43 (15,2)	45 (15,9)	Ref.	
	GG+CT	18 (6,4)	21 (7,1)	0,94 (0,44-2,01)	0,878
	GG+TT	0 (0,0)	3 (1,1)	-	-
	GA+CC	111 (39,2)	95 (33,6)	1,22 (0,74-2,01)	0,430
	GA+CT	37 (13,1)	31 (11,0)	1,25 (0,66-2,36)	0,492
	GA+TT	3 (1,1)	6 (2,1)	0,52 (0,12-2,23)	0,381
	AA+CC	52 (18,4)	65 (23,0)	0,84 (0,48-1,46)	0,530
	AA+CT	18 (6,4)	16 (5,7)	1,18 (0,53-2,60)	0,666
	AA+TT	1 (0,4)	2 (0,7)	0,52 (0,05-5,98)	0,602

OR (IC95%)=Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%.

*Valor estatisticamente significativo $p \leq 0.05$

XI. APÊNDICE 5

Associação entre os genótipos dos genes *BCL-2*, *CASP3*, *CASP9*, *NKX3-1* em pacientes com câncer de próstata e seus controles.

Genes (SNP)		Pacientes com CaP N (%)	Indivíduos controle N (%)	OR (IC95%)	Valor de <i>p</i>
<i>BCL-2 + CASP3</i>	CC+CC	54 (19,1)	55 (19,4)	Ref.	
	CC+CT	24 (8,5)	17 (6,0)	1,69 (0,45-6,28)	0,434
	CC+TT	1 (0,4)	3 (1,1)	0,47 (0,02-11,16)	0,640
	CA+CC	105 (37,1)	94 (33,2)	1,80 (0,77-4,22)	0,177
	CA+CT	32 (11,3)	33 (11,7)	1,34 (0,43-4,15)	0,609
	CA+TT	1 (0,4)	3 (1,1)	-	-
	AA+CC	47 (16,6)	56 (19,8)	0,93 (0,36-2,43)	0,883
	AA+CT	17 (6,0)	17 (6,0)	2,31 (0,56-9,44)	0,245
	AA+TT	2 (0,7)	5 (1,8)	1,22 (0,03-44,36)	0,914
<i>BCL-2 + CASP9</i>	CC+GG	15 (5,3)	16 (5,7)	Ref.	
	CC+GA	49 (17,3)	36 (12,7)	0,95 (0,23-3,86)	0,941
	CC+AA	15 (5,3)	23 (8,1)	0,63 (0,11-3,60)	0,601
	GA+GG	31 (11)	32 (11,3)	1,14 (0,25-5,25)	0,869
	CA+GA	73 (25,8)	65 (23,0)	1,54 (0,40-5,94)	0,531
	CA+AA	34 (12,0)	33 (11,7)	1,07 (0,23-5,12)	0,931
	AA+GG	15 (5,3)	20 (7,1)	0,67 (0,13-3,60)	0,640
	AA+GA	29 (10,2)	31 (11,0)	1,18 (0,25-5,59)	0,833
	AA+AA	22 (7,8)	27 (9,5)	0,94 (0,20-4,35)	0,936

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 doença sexualmente transmissível.

*Valor estatisticamente significativo $p \leq 0.05$

<i>BCL-2 + NKX3-1</i>	CC+TT	36 (12,7)	35 (12,4)	Ref.	
	CC+TC	30 (10,6)	32 (11,3)	0,90 (37-2,16)	0,806
	CC+CC	13 (4,6)	8 (2,8)	3,73 (1,15-12,12)	0,028*
	CA+TT	71 (25,1)	73 (25,8)	1,94 (0,91-4,10)	0,081
	CA+TC	57 (20,1)	46 (15,9)	1,65 (0,76-3,58)	0,202
	CA+CC	10 (3,5)	12 (4,2)	2,32 (0,58-9,25)	0,233
	AA+TT	28 (9,9)	45 (15,9)	1,09 (0,47-2,50)	0,843
	AA+TC	30 (10,6)	27 (9,5)	1,66 (0,67-4,12)	0,272
	AA+CC	8 (2,8)	6 (2,1)	1,22 (0,32-4,64)	0,770
<i>CASP3 + NKX3-1</i>	CC+TT	101 (35,7)	109 (38,5)	Ref.	
	CC+TC	87 (30,7)	77 (27,2)	0,75 (0,53-1,06)	0,100
	CC+CC	18 (6,4)	19 (6,7)	1,01 (0,57-1,77)	0,982
	CT+TT	34 (12,0)	39 (13,8)	0,68 (0,44-1,07)	0,097
	CT+TC	26 (9,2)	24 (8,5)	1,72 (0,93-3,17)	0,082
	CT+CC	13 (4,6)	4 (1,4)	3,79 (1,49-9,62)	0,005*
	TT+TT	0 (0,0)	5 (1,8)	-	-
	TT+TC	4 (1,4)	3 (1,1)	1,35 (0,32-5,77)	0,687
	TT+CC	0 (0,0)	3 (1,1)	-	-
<i>CASP9 + NKX3-1</i>	GG+TT	28 (9,9)	35 (12,4)	Ref.	
	GG+TC	23 (8,1)	22 (7,8)	1,65 (0,55-4,98)	0,372
	GG+CC	10 (3,5)	11 (3,9)	1,45 (0,35-6,08)	0,609

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 doença sexualmente transmissível.

*Valor estatisticamente significativo $p \leq 0.05$

	GA+TT	71 (25,1)	72 (25,4)	1,74 (0,76-3,98)	0,190
	GA+TC	66 (23,3)	55 (19,4)	1,33 (0,59-3,02)	0,496
	GA+CC	14 (4,9)	5 (1,8)	3,35 (0,90-12,53)	0,072
	AA+TT	36 (12,7)	46 (16,3)	1,07 (0,43-2,71)	0,881
	AA+TC	28 (9,9)	27 (9,5)	1,12 (0,39-3,20)	0,828
	AA+CC	7 (2,5)	10 (3,5)	2,04 (0,44-9,50)	0,362
<i>CASP9 + CASP3</i>	GG+CC	43 (15,2)	45 (15,9)	Ref.	
	GG+CT	18 (6,4)	21 (7,1)	0,67 (0,26-1,72)	0,4105
	GG+TT	0 (0,0)	3 (1,1)	-	-
	GA+CC	111 (39,2)	95 (33,6)	1,03 (0,54-1,95)	0,928
	GA+CT	37 (13,1)	31 (11,0)	2,11 (0,88-5,07)	0,094
	GA+TT	3 (1,1)	6 (2,1)	0,29 (0,04-2,42)	0,255
	AA+CC	52 (18,4)	65 (23,0)	0,77 (0,37-1,61)	0,490
	AA+CT	18 (6,4)	16 (5,7)	0,98 (0,35-2,75)	0,970
	AA+TT	1 (0,4)	2 (0,7)	-	-

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 doença sexualmente transmissível.

*Valor estatisticamente significativo $p \leq 0.05$

XII. ANEXO 1



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

Parecer CEP/UEL:	176/2013
CAAE:	19769913.0.0000.5231
Data da Relatoria:	19/09/2013
Pesquisador(a):	Ilce Mara de Syllos Cólus
Unidade/Órgão:	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

