



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HELLEN KUASNE

**INVESTIGAÇÃO DOS GENES APEX1, XRCC1, PSA E AR
COMO CANDIDATOS A MARCADORES MOLECULARES
PARA O CÂNCER DE PRÓSTATA**

HELLEN KUASNE

**INVESTIGAÇÃO DOS GENES APEX1, XRCC1, PSA E AR
COMO CANDIDATOS A MARCADORES MOLECULARES
PARA O 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.

Orientadora: Profa. Dra.. Ilce Mara de Syllos Cólus

Londrina
2009

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

K95i Kuasne, Hellen.

Investigação dos genes APEX1, XRCC1, PSA e AR como candidatos a marcadores moleculares para o câncer de próstata / Hellen Kuasne. – Londrina, 2009.
98 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, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Câncer – Aspectos genéticos – Teses. 2. Próstata – Marcadores biológicos de tumor – Teses. 3. Genética molecular – Teses. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agronômico do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 575.1

HELLEN KUASNE

**INVESTIGAÇÃO DOS GENES APEX1, XRCC1, PSA E AR
COMO CANDIDATOS A MARCADORES MOLECULARES
PARA O 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

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Claudete Ruas
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Cláudia Parecida Rainho
UNESP – São Paulo - SP

Londrina, 26 de fevereiro de 2009.

*"Senhor,
"Dai-me serenidade para aceitar as coisas que não posso mudar. Dai-me
coragem para mudar as que posso mudar. Dai-me sabedoria para distinguir
umas das outras." Reinhold Niebuhr*

A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma certa grandeza emergirá.

Aristóteles, 350a.C

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e motivação durante todos esses anos e principalmente pelo entusiasmo pela pesquisa, sem o qual, não vale a pena continuar.

À minha família, pai (Valter), mãe (Josefina), irmãs (Herika e Hedi) e gata (Charlotte), pela união, companhia, amor, conselhos valiosos, e compreensão nos meus momentos de ausência.

À minha orientadora Profa Dra Ilce Mara de Syllos Cólus, que para mim é um exemplo de ética, mulher e pesquisadora e que durante todos esses anos não foi apenas minha orientadora, mas também minha amiga.

Aos pacientes e controles que aceitaram a participar deste trabalho.

À banca de qualificação, que contribuiu para a melhoria dessa dissertação.

- *Dra Roberta Losi-Guembarovski, que me ensinou a segurar uma micropipeta e mesmo de oito meses de gestação não mediu esforços para me ajudar e contribuiu muito na confecção dos artigos. Que nossa amizade perdure para sempre.*
- *Dr Paulo Emílio Fuganti, sem sua ajuda na obtenção dos pacientes e controles esse trabalho não seria realizado em dois anos. Além disso, é uma satisfação trabalhar com um médico interessado em pesquisa e que trata os seus pacientes com dignidade, humildade, respeito e ética.*

À Iara Sant 'Ana Rodrigues, amiga de graduação, coletas, PCRs, estudos, festas e fiascos. Foi muito divertido ter a sua companhia apesar do sono toda quarta e sexta de manhã.

À Profa Dra Claudete Ruas, pelos seus ensinamentos na disciplina de Marcadores Moleculares e por ter aceitado o convite para ser da minha Banca.

À Profa Dra e amiga Cláudia Aparecida Rainho, que sempre me recebeu com muito hospitalidade e carinho em sua casa e laboratório. Sempre disposta a tirar minhas dúvidas e dar bons conselhos. Um exemplo de ética e seriedade, uma pessoa amável e uma profissional brilhante.

À Profa Dra Sílvia Regina Rogatto, por abrir as portas do seu laboratório e nos ceder reagentes para que essa dissertação pudesse ser realizada.

À equipe de Botucatu, principalmente a Priscila, que colaborou com as reações de PCR e ao Rodrigo que me ajudou maciçamente com as placas e sequenciamento e sempre foi muito paciente e atencioso.

Aos médicos urologistas Dr Marco Aurélio de Freitas Rodrigues, Dr Emerson Pereira Gregório, Dr Farid Libos Júnior e Dr Paulo Emílio Fuganti, por nos ceder os seus pacientes.

Aos médicos patologistas Dra Marina O. Kishima e Dr Kazuhiro Ito, que realizaram as análises histopatológicas das lâminas.

À Mariana Bizarro dos Reis, pela amizade e ajuda nos genes de reparo.

Aos colegas e ex-colegas de Laboratório, Ju Mara, Gustavo, Zé Pedro, Priscilas, Manú, Natália, Mateus, Milene, Heloisa, André, Juliana, que contribuem para que o clima de trabalho seja harmonioso e divertido.

Aos meus professores de pós-graduação, que contribuíram para a minha formação profissional.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos de estudos e divertimentos.

Aos técnicos Dário e Melissa e à secretária da Pós Graduação Suely, que sempre foi muito atenciosa e simpática.

Aos funcionários do Hospital do Câncer de Londrina, que nos acolheram e nos ajudam muito, em especial às enfermeiras do terceiro andar, às técnicas da patologia e ao pessoal do arquivo, farmácia e portaria.

Ao meu pai, por me liberar o carro para realizar as coletas.

Ao Alessandro, pela ajuda na estatística e pelas caronas.

Aos funcionários da Santa Casa e Urolit.

À Universidade Estadual de Londrina, pela estrutura e formação profissional.

À CAPES pelo auxílio financeiro, sem o qual não seria possível realizar todas as viagens necessárias para a confecção desta dissertação.

MUITO OBRIGADA!!

LISTA DE ABREVIACÃO

APEX1	Apurínico/Apirimidínico Endonuclease I
AR	Receptor de Andrógeno
ARA70	co-Ativadores do Receptor de Andrógeno
ARE	Elemento de Resposta ao Andrógeno
BER	Reparo por Excisão de Bases
DHT	dihidrotestosterona
GTA	aparato geral de transcrição
HSP	heat-shock proteins
INCA	Instituto Nacional do Câncer
UICC	União Internacional Contra o Câncer
OR	Odss Ratios
TNM	Sistema de Classificação dos Tumores Malignos PSA: Antígeno Específico da Próstata
XRCC1	X-ray Cross Complementing Group 1
SHBG	Globulina Carreadora de Hormônios Sexuais

KUASNE, Hellen. **Investigação dos genes Apex1, Xrcc1, Psa E Ar como candidatos a marcadores moleculares para o câncer de próstata**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais incidente no Brasil. Dentre os genes de interesse relacionados com esta neoplasia, destacam-se os participantes da via dos andrógenos, como o Receptor de Andrógeno (*AR*), o Antígeno Específico da Próstata (*PSA*) e os da via de reparo a danos no DNA (*APEX1* e *XRCC1*). Polimorfismos nesses genes são freqüentes na população, podendo levar a alterações das atividades gênicas e contribuir para o risco de desenvolvimento e progressão do tumor. O objetivo deste trabalho foi analisar as freqüências dos genótipos prevalentes, heterozigotos e raros dos genes *PSA*, *XRCC1* e *APEX1* e o tamanho das repetições CAGs do gene *AR* em pacientes com carcinoma de próstata (níveis de *PSA* superiores a 2,5 ng/mL e confirmação histopatológica) e em indivíduos-controle (*PSA* menor que 2ng/mL). Peças tumorais de 60 pacientes foram genotipadas por análise de fragmentos utilizando seqüenciador automático para caracterizar o comprimento das repetições CAG, as quais foram divididos em alelos curtos (CAG < 20 repetições) ou alelos longos (CAG > 20 repetições). Os genes *PSA*, *XRCC1* e *APEX1* foram analisados por *PCR-RFLP* e juntamente com o *AR* foram avaliados quanto a parâmetros histopatológicos e clínicos. A freqüência dos genótipos considerados de risco para o gene *XRCC1* (*A/A* ou *A/G*) foi de 57,6% nos pacientes e 62,2% nos controles. Para o gene *APEX1* obteve-se 51,2% dos genótipos considerados de risco (*G/G* ou *G/T*) nos pacientes e 38,4% nos controles. A análise estatística pelo cálculo da Odds Ratio (OR) e do intervalo de confiança (IC=95%) mostrou associação positiva entre o gene *APEX1* (OR=1,68 IC95% 1,10-2,58) e o câncer de próstata. O mesmo resultado não foi observado para o gene *XRCC1* (OR=0,82 IC95% 0,53-1,27) e na análise combinada (OR=1,27 IC95% 0,792,05). Ambas as variantes dos genes de reparo não se mostraram relacionadas a graus mais agressivos do processo tumoral. Este estudo demonstrou associação do genótipo *G/G* do gene *PSA* com um maior risco de desenvolver câncer de próstata. (OR=1,75 IC95% 1,05-2,92), assim como as repetições CAGs curtas do gene *AR* (OR=1,89 IC95% 1,21-2,96). A análise combinada para os dois genes mostrou um aumento de duas vezes no risco para o desenvolvimento da neoplasia (OR=2,02; IC 95%=1,07-3,82). As repetições curtas CAG estão relacionadas com escore de Gleason 7 (4+3), de pior prognóstico (OR=8,8 IC95% 1,06-73,05), enquanto o genótipo *G/G* está associado a escores de Gleason maiores que 7 (OR=2,54 IC95% 1,27 -5,07). Os resultados das peças tumorais demonstraram que 38,3 % das amostras apresentaram quadros de instabilidade de microssatélites, tanto no sentido de ganhos como de perdas das repetições CAGs. Concluindo, o genótipo raro do gene *APEX1* e as variantes gênicas dos genes *AR* e *PSA* parecem influenciar a suscetibilidade para o câncer de próstata, além de estarem envolvidas com estágios mais agressivos do processo tumoral.

Palavras chaves: Câncer de próstata. Marcadores moleculares. *PSA*. *AR*. *APEX1* e *XRCC1*.

KUASNE, Hellen. **Research genes Apex1, Xrcc1, Psa and ir as candidate markers molecular for prostate cancer.** 2009. 98 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

The prostate cancer is the second most common type of cancer in Brazil. From the genes of interest related to the prostate cancer, those belong to the androgen pathway, as the Androgen Receptor (AR) and Prostate Specific Antigen (PSA) and those from the DNA repair pathway (*APEX1* and *XRCC1*) have particularly prominence. Polymorphisms in these genes are often seen in the population and may lead to gene activate alterations, contributing to a higher risk of cancer and tumor progression. The aim of this study was to analyze the frequencies of prevalent, heterozygous and rare genotype from the *PSA*, *XRCC1* and *APEX1* genes and the length of CAGs repeats of *AR* gene in patients with prostate cancer (levels of PSA higher than 2,5 ng/mL and histological confirmation) and in free-cancer controls (PSA lower than 2 ng/mL). Tumors from 60 patients were genotyped by a fragment analysis on an automated DNA sequencer to verify the length of the CAG repeats, The length of alleles were considered short (CAG <20 repeats) and long (CAG > 20 repeats). The genes *PSA*, *XRCC1* and *APEX1* were analyzed by the *PCR-RFLP* method and, as the *AR* gene, were evaluated for clinical and pathological parameters. The frequencies of the consider risk genotype for the *XRCC1* gene (*A/A* or *A/G*) were 57,6% in the patients and 62,2% in the controls. For the *APEX1* gene 51,2% of the considered risk genotype (*G/G* or *G/T*) were found in the patients and 38,4% in the controls. The statistical analysis by the Odds ratio (OR) and confidence interval (CI=95%) showed positive association between the *APEX1* gene and prostate cancer (OR=1,68 CI95% 1,10-2,58). No association was found for the *XRCC1* gene (OR=0,82 CI95% 0,53-1,27) or the combined analysis (OR=1,27 CI95% 0,79-2,05). No relationship was found between tumor aggressiveness and variants of repair genes. The genotype *G/G* of *PSA* showed association with development prostate cancer risk (OR=1,75 CI95% 1,05-2,92), as like as the short repeats of CAG of *AR* gene (OR=1,89 CI95% 1,21-2,96). The combined analysis for these two genes showed a double risk for this neoplasia (OR=2,02; CI 95%=1,07-3,82). The short repeats of CAG were related with Gleason score 7 of worse prognosis (4+3=7), while the genotype *G/G* of *PSA* were associates with Gleason score higher than 7 (OR=2,54 IC95% 1,27 -5,07). The results of tumors analysis showed that 38,3% of the samples had instability of microsatellites, both for gain or lost of the CAG repeats. In conclusion, the rare genotype of the *APEX1* gene is associated with a higher risk of prostate cancer, in the same way, the genetics variants of *PSA* and *AR* seems to influence the genetic susceptibility for this cancer and tumor aggressiveness.

Key words: Prostate Cancer. Molecular markers. PSA. AR. APEX1 and XRCC1.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições de reação de PCR e clivagem	38
---	----

Artigo A

Tabela 1 – Sequência dos primers, condições de reação de PCR e clivagem	50
--	----

Tabela 2 – Frequências alélicas dos genes XRCC1 e APEX1	52
--	----

Tabela 3 – Análise dos genótipos considerados de risco e não risco do gene XRCC1 e APEX1 em relação à parâmetros histopatológicos.....	53
---	----

Tabela 4 – Relação dos genótipos do gene XRCC1 e APEX1 nos pacientes com diferentes escores de Gleason.....	54
--	----

Tabela 5 – Análise dos genótipos de XRCC1 e APEX1 nos pacientes em relação ao risco de recorrência, graus de estadiamento e níveis sanguíneos de PSA	54
---	----

Artigo B

Tabela 1 – Condições de reação de PCR e clivagem	65
---	----

Tabela 2 – Características histopatológicas dos pacientes estudados	68
--	----

Tabela 3 – Frequências genótípicas do gene PSA e AR e análise combinada	69
--	----

Tabela 4 – Valores médios de PSA em relação aos genótipos de PSA e AR	70
--	----

Tabela 5 – Análise dos genótipos dos genes PSA e AR nos pacientes com diferentes escores de Gleason.....	71
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via longa e via curta do reparo de excisão de bases.....	25
Figura 2 – Ativação do receptor de andrógeno (AR).....	30
Figura 3 – Fragmento amplificado do gene PSA e visualização do gel após clivagem com a enzima de restrição NheI.....	38
Figura 4 – Fragmento amplificado do gene XRCC1 e visualização do gel após clivagem com a enzima de restrição HpaII.....	39
Figura 5 – Fragmento amplificado do gene APEX1 e visualização do gel após clivagem com a enzima de restrição BfaI.....	40
Figura 6 – Gráfico do HRM validando o ensaio PCR- RFLP para o gene APEX1.....	41
Figura 7 – Fragmento amplificado do gene AR e visualização do gel antes do sequenciamento	42
Figura 8 – Eletroferograma das repetições CAG do gene AR.....	43

Artigo B

Figura 1 – Distribuição das repetições CAG em pacientes e controles	69
Figura 2 – Análise das repetições CAG do sangue (A) e tumor (B) de um mesmo indivíduo, indicando encurtamento da repetição	71

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
Câncer de Próstata: aspectos clínicos e epidemiológicos	15
Câncer de Próstata: aspectos genéticos e moleculares	22
OBJETIVOS	35
MATERIAIS E MÉTODOS	36
Coleta de Amostras.....	36
Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico e tumoral	37
Genotipagem dos genes <i>XRCC1</i> , <i>APEX1</i> , <i>PSA</i> e <i>AR</i>	37
Parâmetros histopatológicos	43
Análise Estatística.....	44
ARTIGO A – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES DE REPARO POR EXCISÃO DE BASES <i>XRCC1</i> E <i>APEX1</i> EM PORTADORES DE CÂNCER DE PRÓSTATA	45
Resumo	46
INTRODUÇÃO	46
MATERIAIS E MÉTODOS	48
Coleta de Amostras.....	48
Extração de DNA e Genotipagem dos genes <i>XRCC1</i> e <i>APEX1</i>	49
Análise Estatística e Parâmetros histopatológicos.....	50
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO	55
AGRADECIMENTOS	56
REFERÊNCIAS	57

ARTIGO B – POLIMORFISMOS NOS GENES RECEPTOR DE ANDRÓGENO (AR) E ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA) E SUA RELAÇÃO COM O CÂNCER DE PRÓSTATA	60
Resumo	61
INTRODUÇÃO	62
MATERIAIS E MÉTODOS	64
Coleta de Amostras.....	64
Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico e tumoral.....	65
Genotipagem dos genes PSA e AR.....	65
Parâmetros histopatológicos.....	66
Análise Estatística.....	66
RESULTADOS	67
DISCUSSÃO	71
AGRADECIMENTOS	74
REFERÊNCIAS	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	79
BIBLIOGRAFIA	80
ANEXOS	90
ANEXO A	91
ANEXO B	92
ANEXO C	94

INTRODUÇÃO

A próstata é uma estrutura acessória ímpar do sistema reprodutor masculino, que circunda a uretra na cavidade pélvica. Situa-se em posição imediatamente inferior à bexiga, posterior à sínfise púbica e anterior ao reto (Gray *et al.*, 2005). Classicamente a próstata é dividida em cinco lobos (laterais, anterior, posterior e mediano), aos quais são atribuídas relevâncias distintas no desenvolvimento de tumores e de aumentos volumétricos benignos (hiperplasia benigna da próstata). Esta divisão em lobos somente é nítida no período embrionário. No adulto, o limite entre os lobos é impreciso. De acordo com esta definição anatômica, o carcinoma origina-se mais no lobo posterior e a hiperplasia nodular nos lobos laterais e mediano. Atualmente a principal classificação da próstata se baseia nos estudos de McNeal *et al.* (1988), que, com base em parâmetros histopatológicos, divide a glândula prostática em zona de transição, zona central e zona periférica. A zona de transição corresponde à porção que envolve a uretra proximal; a zona central, à porção que acompanha os ductos ejaculadores; e a periférica, à porção que envolve a uretra distal, correspondendo à região apical da próstata. Cerca de 10% dos carcinomas se originam na zona central, 15-20% na zona de transição e 70 a 75% na zona periférica (Young *et al.*, 2000). As secreções da próstata, juntamente com as secreções das vesículas seminais e com os espermatozóides, contribuem para a formação de sêmen durante a ejaculação (Gray *et al.*, 2005). Sem o líquido produzido pela próstata os espermatozóides não viveriam até atingir o óvulo no momento da fecundação, pois a secreção prostática liquefaz o esperma, otimizando o processo de fecundação do óvulo.

Entre as doenças que podem acometer a próstata, as mais comuns são as prostatites, a hiperplasia benigna e o câncer da próstata. As prostatites são inflamações causadas principalmente por bactérias comumente encontradas em doenças das vias urinárias (Robbins *et al.*, 2000). A hiperplasia prostática é o aumento da própria glândula, pela ação hormonal da testosterona (hormônio masculino produzido principalmente pelo testículo), dos receptores androgênicos, estrógenos e fatores de crescimento, que acomete quase 90% dos homens ao atingirem 90 anos de idade. O câncer de próstata pode coexistir com o aumento benigno, no qual ocorre um crescimento glandular, porém de células com comportamento aberrante; e se manifesta quase sempre depois que os homens completam 50 anos (Paludo e Haas, 2002).

A hiperplasia da próstata é considerada um tumor benigno, onde o tecido cresceu além do normal, acometendo principalmente as células da parte central da próstata, geralmente na zona de transição. O câncer da próstata origina-se em 70% das vezes na zona periférica, podendo invadir órgãos e tecidos vizinhos e produzir metástases. Esta diferença é fundamental para se avaliar e tratar uma ou outra doença, tendo em vista que dificilmente alguém morre devido a uma hiperplasia benigna de próstata (Bachega, 2005).

Câncer de Próstata: aspectos clínicos e epidemiológicos

O câncer de próstata tem se tornado um dos maiores problemas de saúde das últimas décadas e sua incidência tem aumentado rapidamente durante os últimos 15 anos. Esse aumento observado nas taxas de incidência pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação e também pelo aumento na expectativa de vida da população (Hankey *et al.*, 1999).

Estima-se que em 2008 foram diagnosticados no Brasil cerca de 49.530 casos. Embora existam tratamentos eficazes através da cirurgia e radioterapia para o tumor clinicamente localizado, o câncer de próstata metastático ainda permanece incurável. É o segundo tipo de câncer com maior taxa de mortalidade no Brasil, sendo superado apenas pelo de pulmão (INCA, 2008). Nos EUA, a incidência para o câncer de próstata no ano passado foi de 186.320 casos, levando a cerca de 28.660 mortes (Ries *et al.*, 2008).

Para Friedenreich (2001), os fatores de risco que desencadeiam o câncer de próstata podem ser divididos em fatores de riscos variáveis, no qual os riscos seriam passíveis de modificações, como por exemplo, vida sedentária, hábitos alimentares, obesidade, tabagismo e alcoolismo além de e fatores de risco permanentes, por enquanto não modificáveis ou parcialmente modificáveis, exemplificados por idade, hereditariedade e etnia. Na prática, o que se observa é a influência de diversos fatores variáveis e não modificáveis na gênese deste câncer.

Assim como em outros cânceres, a idade é um fator de risco importante, ganhando um significado especial no câncer da próstata, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam exponencialmente após a idade de 60 anos. Estima-se que 75% do total dos casos diagnosticados de câncer de próstata ocorram em homens com 65 anos ou mais (Parkin *et al.*, 2002).

A grande maioria dos cânceres de próstata se desenvolve devido a um acúmulo de mutações em células somáticas, sendo, por isto, esporádicos. Porém, um dos principais fatores de risco para este câncer é o histórico familiar. Os riscos aumentam de 2,2 vezes quando um parente de 1º grau (pai ou irmão) é acometido pelo problema; de 4,9 vezes quando dois parentes de 1º grau são portadores do tumor e de 10,9 vezes quando três parentes de 1º grau têm a doença. Nos casos hereditários, o câncer se manifesta mais precocemente, muitas vezes antes dos 50 anos (Srougi e Simon, 1996).

Srougi e Simon (1996) e Parkin *et al.* (2002) relatam que a prevalência do câncer de próstata varia entre as etnias e entre as populações dos diferentes países. Na China, a incidência de novos casos por ano é de 0,8/100.000 habitantes e nos Estados Unidos a doença é identificada em 100/100.000 habitantes. Um estudo realizado por Whittemore *et al.* (1991) demonstrou que japoneses que migraram para os Estados Unidos passaram a apresentar a doença com a mesma frequência que os norte-americanos. Portanto, ao contrário do que se pensava, são fatores ambientais os principais reguladores do aparecimento deste câncer. Um estudo com membros da tribo Parkategê, que vive no sul do Pará, mostrou que esses índios tinham baixa incidência de câncer da próstata e, quando foram colonizados pelos brancos, assumindo seus hábitos, tornaram-se obesos e passaram a apresentar a doença com a mesma frequência que seus colonizadores (Srougi *et al.*, 2001).

Estudos realizados nos Estados Unidos apontam que os homens negros têm mais câncer de próstata que os homens brancos e estes, mais que os orientais. Em negros observa-se um risco 2 vezes maior de apresentar a doença, além de chance 2,5 a 3 vezes maior de morrer por câncer de próstata (Platz *et al.*, 2000; Toles, 2008). Aparentemente, essa diferença ocorre devido aos níveis de testosterona circulante em cada etnia (Litman *et al.*, 2006), pois há evidências de que o câncer de próstata pode estar relacionado aos níveis dos hormônios sexuais masculinos. Os eunucos (homens castrados) não desenvolvem a doença, sugerindo que os hormônios produzidos pelos testículos favorecem o desenvolvimento do câncer de próstata (Robbins *et al.*, 2000). Outros fatores que podem estar distribuídos de forma diferente nas etnias e podem ser responsáveis por essa diferença na distribuição deste tipo de câncer, são os hábitos alimentares (Meilke e Smith, 1990).

A influência que a dieta pode exercer sobre a gênese do câncer ainda é incerta, não sendo conhecidos os exatos componentes ou através de quais mecanismos estes poderiam influenciar o desenvolvimento do câncer da próstata. Contudo, várias evidências apontam para o importante papel da nutrição na prevenção deste câncer (Chan *et al.*, 2005). Existem compostos da dieta que podem apresentar um potencial de proteção em relação à

incidência deste câncer, incluindo a ingestão de tomates, vegetais crucíferos, carotenóides, vitamina E, selênio, peixes, polifenóis e fitoestrógenos (Cohen *et al.*, 2000), enquanto outros fatores como as altas concentrações de cálcio, zinco, gorduras saturadas, aminas heterocíclicas encontradas em carnes grelhadas e carnes vermelhas podem aumentar o risco (Demarzo *et al.*, 2000).

Os tumores de próstata variam desde formas indolentes, de evolução lenta, até formas extremamente agressivas, de desenvolvimento rápido. Na maioria dos casos, o tumor apresenta um crescimento lento, de longo tempo de duplicação, levando cerca de 15 anos para atingir 1 cm³. Assim, o câncer da próstata em sua fase inicial tem uma evolução silenciosa. Muitos pacientes não apresentam nenhum sintoma ou, quando apresentam, são semelhantes ao crescimento benigno da próstata, como dificuldade miccional e frequência urinária aumentada durante o dia ou à noite. A fase avançada da doença pode ser caracterizada por dor óssea, sintomas urinários ou, quando mais grave, por infecções generalizadas ou insuficiência renal (INCA, 2008).

Noventa e cinco por cento dos cânceres de próstata são adenocarcinomas, sendo os restantes carcinomas de células de transição, epidermóide e sarcomas. O adenocarcinoma geralmente está localizado na zona periférica da próstata. Seu crescimento local pode invadir a luz uretral produzindo, subseqüentemente, obstrução urinária. A maioria dos cânceres de próstata metastizam para linfonodos (gânglios) pélvicos e esqueleto, especialmente a pélvis e coluna lombar. Metástases viscerais são mais raras e ocorrem mais tardiamente, sendo mais freqüentes em pulmões, fígado e glândulas adrenais (Mostofi *et al.*, 1992).

A triagem do câncer de próstata é feita pelo exame clínico (toque digital retal) e pela dosagem do antígeno prostático específico (*Prostate Specific Antigen-PSA*), que podem sugerir a existência da doença e indicar a realização de biópsia prostática transretal. O toque digital retal é um exame rápido, de baixo custo e de fácil realização. Permite ao examinador reconhecer as dimensões, o formato e os limites do órgão, bem como a presença de deformidades, abaulamentos, alterações de consistência e mobilidade, tornando-se, assim, essencial na conduta terapêutica (Fagundes *et al.*, 2002). Apesar deste ser o exame mais utilizado, possui limitações, uma vez que somente as porções posterior e lateral da próstata podem ser palpadadas, deixando 30% a 40% dos tumores fora do seu alcance. As estimativas de sensibilidade variam entre 55% e 68% (INCA, 2008).

A próstata elimina uma substância que não é produzida por nenhum outro órgão. Seu nome é antígeno prostático específico, conhecido como PSA. O PSA é uma

glicoproteína encontrada em altas concentrações no líquido seminal, é produzida apenas no citoplasma de células epiteliais benignas ou malignas da próstata e das glândulas periuretral e perianal, cuja função está relacionada com a liquefação do sêmen e com a fertilidade masculina (Yu *et al.*, 1995).

A dosagem do antígeno prostático específico (PSA) surgiu como um teste promissor na detecção precoce do câncer de próstata e tem sido utilizada desde os anos 80. Considerando um ponto limiar do nível normal de PSA em 4 ng/mL, a sensibilidade estimada varia de 35% a 71%. O seu nível no sangue se correlaciona com o volume prostático e com o número de células malignas, isto é, quanto maior a próstata, maior são os níveis de PSA. Sendo assim, se existir tecido prostático em outras regiões (metástases), maior também será o valor do PSA (INCA, 2008).

A medida do PSA pode ser útil na detecção precoce do câncer, na avaliação da resposta ao tratamento e na detecção de recidiva antes delas serem óbvias clinicamente. Dos pacientes com níveis elevados de PSA, aproximadamente 30% têm câncer de próstata. Por outro lado, 25% dos pacientes com câncer (2% em estágio avançado), têm níveis normais de PSA (Lefort e Almeida, 2004). Elevações do PSA sempre exigem uma atenção médica, mas não indicam necessariamente a presença de câncer na próstata, pois sabe-se que em casos de hiperplasia e prostatites também há aumento de PSA.

Mesmo sendo um teste promissor, o uso do PSA apresenta algumas limitações, principalmente com relação à sua especificidade ao diagnóstico do câncer de próstata, gerando, em muitos casos, tanto resultados falso-negativos quanto positivos. Como marcador prognóstico, no entanto, o uso do PSA é de grande importância, estando seus níveis séricos diretamente relacionados com a progressão e/ou regressão do câncer de próstata, apesar de não predizer o potencial metastático dos tumores primários (COBEU, 2005).

Levando em conta a relação custo/benefício, definiu-se que a melhor forma de triar o câncer da próstata é representada pela combinação de toque digital retal e dosagem do PSA. O toque retal falha em 30% a 40% dos casos; as medidas de PSA falham em 20%, mas a execução conjunta dos dois exames deixa de identificar o câncer em menos de 5% dos pacientes (INCA, 2008). Portanto, a elucidação e validação de novos marcadores biológicos para esta doença deverão auxiliar na sua detecção e melhorar a aplicação das terapias disponíveis (Ferreira e Rocha, 2004).

O diagnóstico do câncer de próstata é confirmado pelo estudo histopatológico do tecido obtido pela biópsia do órgão. Tumores pouco diferenciados

histologicamente geralmente progridem rapidamente, enquanto tumores bem diferenciados apresentam uma progressão lenta (Gleason, 1992).

A classificação mais utilizada atualmente foi estabelecida por Gleason (1992), que permite caracterizar a agressividade dos tumores malignos da próstata, sendo um critério adicional de prognóstico para se estabelecer com precisão as características biológicas das neoplasias prostáticas. Pelo fato do tecido do câncer de próstata ser frequentemente composto de áreas que têm graus diferentes, o patologista examina rigorosamente as áreas que compõem a porção maior do tecido e gradua de 1 a 5 as duas áreas mais frequentes do tumor. Os graus de Gleason são então atribuídos aos dois padrões de células que ocorrem mais comumente. Uma vez que os dois graus tenham sido atribuídos, uma pontuação pode ser determinada. Isto é feito através da somatória dos dois graus de Gleason. A pontuação terá como resultado um número entre 2 e 10. As características dos diferentes graus obtidos por este sistema são: Grau 1 - As células são geralmente uniformes e pequenas e formam glândulas regulares, com pouca variação de tamanho e forma, com bordos bem definidos, densamente agrupadas, distribuídas homoganeamente e com pouco estroma entre si; Grau 2 - As células variam mais em tamanho e forma e as glândulas, ainda uniformes, mostram-se frouxamente agrupadas e com bordos irregulares; Grau 3 - As células variam ainda mais em tamanho e forma, constituindo glândulas muito pequenas, uniformes, anguladas ou alongadas, individualizadas e anarquicamente espalhadas pelo estroma. Podem formar também massas fusiformes ou papilíferas, com bordas lisas; Grau 4 - Muitas das células estão fusionadas em grandes massas amorfas ou formando glândulas irregulares, que são distribuídas anarquicamente, exibindo infiltração irregular e invadindo os tecidos adjacentes; e Grau 5 - Tumor anaplásico, apresentando a maioria das células agrupadas em grandes massas que invadem os órgãos e tecidos vizinhos. As massas de células podem exibir necrose central. Muitas vezes, a diferenciação glandular pode não existir, observando-se um padrão de crescimento infiltrativo tipo cordonal (com células formando fileiras) ou de células soltas (perde a característica de tecido glandular e se assemelham a células isoladas). Se as células forem semelhantes ao tecido prostático normal, diz-se que são bastante diferenciadas e são consideradas de grau 1 pela escala de Gleason. Isto significa que não é esperado que o tumor cresça rapidamente. Por outro lado, se as células do tecido em questão forem irregulares e muito diferentes das células prostáticas normais, então serão menos diferenciadas e serão consideradas como sendo de grau 5 pela escala de Gleason. Com escores de Gleason de 2 a 4 os tumores compreendem lesões diferenciadas, onde o câncer provavelmente terá um crescimento lento; já os de escores de 5 a 6 incluem as lesões moderadamente diferenciadas e

podem indicar um câncer de crescimento lento ou rápido, sendo este dependente de uma série de outros fatores, incluindo o tempo durante o qual o paciente tem a doença. Por último, os de escores 7 a 10 relacionam-se às lesões indiferenciadas e indicam câncer de crescimento muito rápido. Levando em conta essa classificação, a sobrevida de 15 anos é de 90%, 60% e 30% nos pacientes com escores de Gleason de 2 a 4, 5 a 6 e de 7 a 10, respectivamente (Calvete *et al.*, 2003). Deste modo, quanto mais elevado o escore, maior a agressividade do câncer (Walsh, 1997). Consequentemente, quanto mais baixo o escore de Gleason, melhor será o prognóstico do paciente.

A necessidade de se classificar os casos de câncer em estádios baseia-se na constatação de que as taxas de sobrevida são diferentes quando a doença está restrita ao órgão de origem ou quando ela se estende a outros órgãos. Estadiar significa avaliar o grau de disseminação. Para tal, há regras internacionalmente estabelecidas, que estão em constante aperfeiçoamento. O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N1 e de M0 a M1, respectivamente (Anexo A).

O estadiamento pode ser clínico ou patológico. O estadiamento clínico é estabelecido a partir dos dados do exame físico e dos exames complementares pertinentes ao caso. Para o câncer de próstata pode-se citar como exemplo os exames de toque retal e níveis séricos de PSA (COBEU, 2005). O estadiamento patológico baseia-se nos achados cirúrgicos e no exame anátomopatológico da peça operatória. É estabelecido após tratamento cirúrgico e determina a extensão da doença com maior precisão. O estadiamento patológico pode ou não coincidir com o estadiamento clínico.

D'Amico *et al.* (1998) sugeriram um modelo para estratificar indivíduos com câncer de próstata em pacientes de baixo risco, risco intermediário e alto risco de recorrência bioquímica após a cirurgia. Baseadas nessa estratificação, várias análises multivariadas têm mostrado que os níveis de PSA, escore de Gleason das biópsias e o estadiamento TNM são os fatores mais importantes no prognóstico baseado em sobrevida livre de recidiva bioquímica (Hamdy, 2001; Chatelard, 2002). O emprego destes três fatores leva ao estabelecimento de três grupos de pacientes: (i) os de baixo risco, com 85% de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos, que correspondem a indivíduos com PSA

menor que 10 ng/mL, escore de Gleason menor que 7 e estágio TNM pT1c a pT2a; (ii) os de risco moderado, com 50% de chance de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos, apresentando PSA entre 10 e 20 ng/mL, ou escore de Gleason 7 ou estágio pT2b-pT2c; e (iii) os de risco alto, com 33% de chance de sobrevida livre de recidiva bioquímica em 5 anos e com PSA > 20 ng/mL ou escore de Gleason maior que 7 ou estágio pT3a-pTxNxM1 (D'Amico *et al.*, 1998 adaptado por NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Prostate Cancer, Version 1.2009).

A curabilidade do câncer de próstata está intimamente ligada ao estágio em que ele se encontra. Enquanto um homem com câncer de próstata localizado tem uma maior chance de morrer por outras morbidades, a probabilidade de óbito por este câncer supera a chance de outras causas de óbito no homem com câncer de próstata com metástases clínicas (Smaletz, 2004). O tratamento para doença localizada implica em cirurgia ou radioterapia. Para doença localmente avançada, a radioterapia ou a cirurgia em combinação com tratamento hormonal tem sido utilizada. Para doença metastática, o tratamento de eleição é hormonioterapia (drogas antiandrogênicas, que bloqueiam a ação dos andrógenos, interruptores do hormônio liberador de gonadotrofina, que impedem que os testículos produzam testosterona) ou orquiectomia (retirada dos testículos para diminuir a produção de testosterona). Estudos sobre crescimento tumoral indicam que as formas agressivas do câncer da próstata, quando não tratadas, levam entre dois e oito anos para se espalhar pelo organismo, tornando a doença de difícil controle (Srougi, 1996). As regiões mais frequentemente afetadas por metástases a partir do tumor primário de próstata são linfonodos, ossos, pulmões e raramente a bexiga, fígado e cérebro (Dutt *et al.*, 2000).

Alguns trabalhos têm sugerido a triagem via a realização de toque retal digital e dosagem do PSA para a detecção precoce do câncer da próstata. Embora esses exames possam indicar a existência do câncer de próstata em seus estágios iniciais, as evidências científicas não permitem concluir se tal detecção reduz a mortalidade por esse câncer ou melhora a qualidade de vida dos pacientes. Apesar da detecção e do tratamento precoce prevenirem a progressão do câncer e o aparecimento de metástases, também é possível que sejam detectados tumores que tenham um crescimento muito lento e que não causem problemas à saúde do homem (disponível em <http://www.saude.pr.gov.br/cancer/tipos/prostata.html>). Sendo assim, surge a necessidade da busca de marcadores moleculares que possam prever qual a possibilidade de um tumor vir a tornar-se de fato um problema de saúde.

Câncer de Próstata: aspectos genéticos e moleculares

Apesar das altas taxas de incidência e de mortalidade, os mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese e na progressão do câncer de próstata ainda são pouco claros, especialmente com relação à progressão para a forma metastática. A ausência de terapias que sejam capazes de curar o câncer de próstata avançado torna seu diagnóstico precoce uma importante meta para os pesquisadores. Marcadores diagnósticos e prognósticos vêm sendo, por esta razão, desenvolvidos (Ferreira e Rocha, 2004).

Existem várias evidências sugerindo que a manifestação do carcinoma de próstata depende da interação de fatores genéticos e de agentes ambientais. A exposição contínua a andrógenos, metabólitos de andrógenos, e outros fatores fisiológicos, pode também desempenhar um papel importante na predisposição dos homens ao desenvolvimento do câncer de próstata (Coughlin e Hall, 2002).

Avanços recentes no campo de estudos genômicos e da biotecnologia aumentaram dramaticamente a quantidade e a acessibilidade da informação molecular relevante para o estudo da carcinogênese da próstata. Essa fonte vem sendo explorada para identificar biomarcadores candidatos para a avaliação do câncer de próstata, baseados nos polimorfismos genéticos, mutações raras ou alterações na expressão gênica (Ferreira e Rocha, 2004).

Durante o desenvolvimento e progressão do câncer, alterações no DNA das células, como mutações em genes supressores de tumor e proto-oncogenes levam, respectivamente, à perda e ganho de função (Dong *et al.*, 2006). Alguns genes candidatos para o desenvolvimento do câncer de próstata hereditário foram identificados nas últimas décadas (*ELAC2 (HPC2)*, *MSR1*, e *RNASEL (HPC1)*) (Dong *et al.*, 2006). Porém, mutações raras em genes de alta penetrância associados com câncer de próstata hereditário acometem apenas 8% de todos os portadores dessa doença; nesses casos, quando há a mutação, o risco de desenvolver a doença é muito alto (Verhage *et al.*, 2001).

A etiologia do câncer de próstata esporádico (não hereditário) envolve uma combinação de fatores, desde polimorfismos em múltiplos genes de suscetibilidade de baixa penetrância, que são mais comuns na população e podem ser determinantes no risco populacional, até a interação destes com fatores ambientais. Polimorfismo é definido como a ocorrência em uma população de duas ou mais formas descontínuas de um determinado fenótipo, em tal proporção que o alelo mais raro esteja presente em mais de 1% desta

população. Genes são considerados funcionalmente polimórficos quando as variantes alélicas existentes na população alteram a atividade da proteína codificada em relação à proteína selvagem. Em muitos casos a presença de variantes alélicas está associada com atividade enzimática reduzida ou aumentada, o que pode levar a uma suscetibilidade diferencial no desenvolvimento de doenças (Ferreira e Rocha, 2004).

Polimorfismos em genes de baixa penetrância envolvidos no reparo a danos do DNA, metabolismo de xenobióticos, e participantes da via dos andrógenos (*AR* e *PSA*), levam a um aumento modesto no risco de desenvolver a doença, embora sejam muito freqüentes na população. Desta forma, o estudo de tais polimorfismos é considerado cada vez mais importante para a saúde pública (Conforti-Froes *et al.*, 2002), já que a presença dessas variantes pode levar à codificação de proteínas com funções alteradas e resultar em variações no risco para a doença (Coughlin e Hall, 2002).

Apesar de variações genéticas serem de extrema importância para a evolução de uma espécie, a sobrevivência do indivíduo depende da estabilidade do seu genoma. A estabilidade resulta não só de um acurado mecanismo de replicação, mas também de mecanismos que reparem os danos que ocorrem continuamente no DNA. Danos no DNA podem ser induzidos por um grande número de agentes físicos e químicos presentes no ambiente, como também por compostos produzidos pelo próprio metabolismo celular. Estes danos podem interferir com processos celulares como replicação e transcrição, levando à morte celular e/ou a mutações (De Laat *et al.*, 1999). Os baixos níveis de mutação nas células são devidos à presença de vias enzimáticas que reparam os danos no DNA. Diversos genes de reparo de DNA têm sido clonados e seus produtos caracterizados principalmente em bactérias, leveduras e mamíferos. No geral, células deficientes em mecanismos de reparo a danos no DNA são mais suscetíveis a processos mutagênicos, os quais podem levar ao desenvolvimento de doenças como o câncer (Agnéz-Lima *et al.*, 2001).

Existem cinco principais vias de reparo do DNA que são requeridas frente aos efeitos deletérios causados por fatores endógenos e exógenos: Reparo do mal pareamento de bases ou *Mismatch repair* (MMR), Reparo por excisão de bases (BER), Reparo por excisão de nucleotídeos (NER), Reparo direto e Reparo por recombinação (Eisen e Hanawalt, 1999). Atualmente, as pesquisas relacionam polimorfismos em genes de reparo a danos do DNA à suscetibilidade ao tumor, pois diferenças nas atividades das enzimas codificadas por tais genes podem influenciar na suscetibilidade ao desenvolvimento tumoral (Yang *et al.*, 2006).

Dentre os polimorfismos de reparo mais estudados destacam-se os genes do *reparo por excisão de nucleotídeos* (NER), tal como o gene *XPD* (Matullo *et al.*, 2001), os genes do reparo de quebra de dupla fita do DNA (*DSB repair*), como o gene *XRCC3* (Matullo *et al.*, 2001; Vodicka *et al.*, 2004) e os genes envolvidos com o *reparo por excisão de bases* (BER), como os genes *XRCCI* e *APEXI* (Matullo *et al.*, 2001; Olshan *et al.*, 2002).

O BER é o tipo de reparo mais freqüente que ocorre no material genético. Esta via é responsável pela remoção diária de mais de 10.000 lesões no DNA (Krwawicz *et al.*, 2007) e requer atividade coordenada de diversas proteínas. Os alvos do BER são principalmente danos induzidos por processos endógenos (eventos hidrolíticos, espécies reativas de oxigênio e metabólitos celulares), como também por processos exógenos (alquilação e radiação ionizante) (Cunningham, 1997; Yu *et al.*, 1999), normalmente em DNA fita simples. A deficiência de genes chaves desta via, como por exemplo, *XRCCI* e *APEXI*, durante o desenvolvimento embrionário é letal (Hung *et al.*, 2005).

O BER tem início com a ação das enzimas DNA glicosilases, que reconhecem e removem bases lesadas da cadeia do DNA pela quebra da ligação N-glicosil, a qual mantém a base nitrogenada associada com o esqueleto de açúcar-fosfato (Krokan *et al.*, 1997). As enzimas com atividade de DNA glicosilase foram inicialmente estudadas e caracterizadas em *E. coli*, mas atualmente diferentes DNA glicosilases foram caracterizadas em eucariotos e apresentam homologia com as enzimas procariotas. A maioria das DNA glicosilases reconhece lesões como deaminação, oxidação, metilação e depuração de bases (Memisoglu e Samson, 2000).

Após a retirada da base lesada, gera-se no DNA um sítio abásico, também chamado de sítio apurínico ou apirimidínico (AP). Este sítio é reconhecido por um outro grupo de enzimas, as AP endonucleases (Doetsch e Cunningham, 1990), que realizam a quebra do esqueleto açúcar-fosfato na região 5' ou 3' do sítio AP, formando um *gap* (espaço). Outras enzimas como DNA polimerase e DNA ligase são recrutadas a esta região para que a lacuna gerada pela retirada do nucleotídeo possa ser preenchida com um novo nucleotídeo (Cadet *et al.*, 2000; Seeberg *et al.*, 2000).

A proteína de reparo *XRCC1* é um componente muito importante do BER, pois ela serve como suporte para outras duas proteínas, a DNA ligase III e a Polimerase P e também age como um sensor de quebra de fita simples de DNA pela interação com PARP (poly (ADP-ribose) polymerase-1) (Caldecott *et al.*, 1996). O gene *XRCCI* (*Xray cross complementing group 1*) contém 17 exons e está localizado no cromossomo 19q13.12 (Lamerdin *et al.*, 1995). *XRCC1* possui um domínio chamado BCRT que é encontrado em

muitas outras proteínas envolvidas na resposta a danos no DNA e nos pontos de checagem do ciclo celular (Bork *et al.*, 1997). *XRCC1* forma um complexo protéico com a DNA ligase III via o domínio BCRT no seu terminal carboxila (COOH) e com a DNA polimerase P via seu domínio amino terminal NH2, para reparar falhas deixadas durante o reparo por excisão de bases (Kubota, 1996). Como outros componentes do BER, a enzima *XRCC1* tem duas vias de ação, uma via curta e outra via longa, as quais serão executadas dependendo do comprometimento da lesão (Figura 1) (Hung *et al.*, 2005).

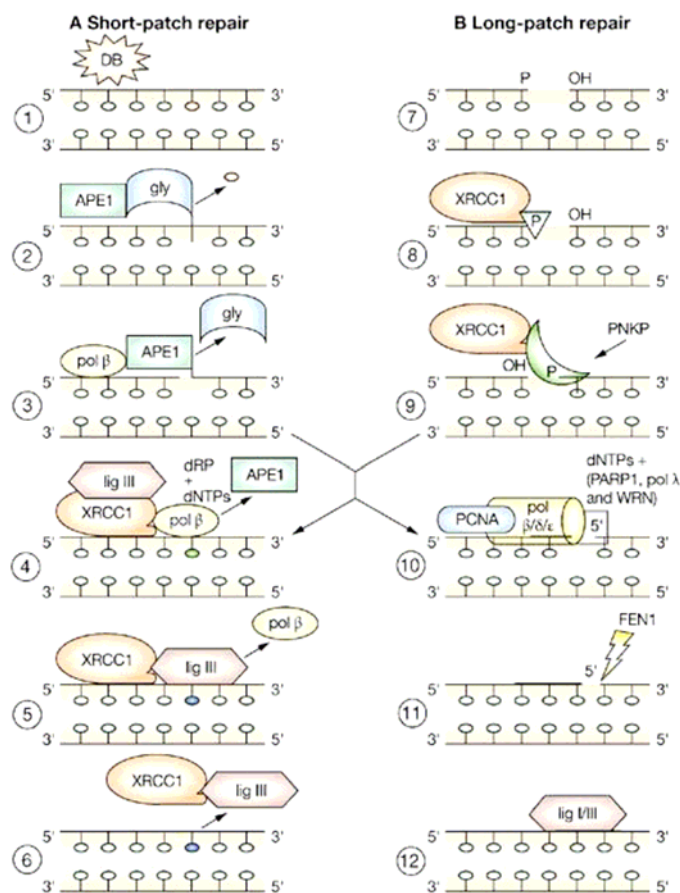


Figura 1 – Via longa e via curta do reparo de excisão de bases.

Fonte: Rao (2007)

Embora muitas variantes alélicas tenham sido documentadas no gene *XRCC1* (Han *et al.*, 2003), apenas duas: Arg194Trp (troca alélica C—T, rs:1799782) e Arg399Gln (troca alélica G—A) demonstraram alterações na capacidade de reparar o DNA em alguns fenótipos estudados. O polimorfismo Arg399Gln (éxon 10, rs:25487) se encontra no lado do domínio C-terminal de interação PARP e de ligação com DNA ligase III, dentro de uma região relativamente não conservada (Matullo *et al.*, 2001). Os resíduos de aminoácidos

envolvidos nos complexos multiproteicos são muito importantes no papel funcional da enzima. Deste modo, polimorfismos em *XRCC1* podem resultar em eficiência alterada da enzima. Devido a este importante papel na capacidade de reparo, a variabilidade na expressão de *XRCC1* tem sido examinada extensivamente em doenças relacionadas com a idade, incluindo o câncer de próstata (De Marzo *et al.*, 1999; Rybicki *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). Um mecanismo de carcinogênese proposto na glândula prostática envolve danos e regeneração tecidual, eventos que ocorrem na presença de altas taxas de espécies reativas de oxigênio liberadas através de inflamação e da oxidação peroxisomal de ácidos graxos. As espécies reativas de oxigênio podem interagir com o DNA das células epiteliais prostáticas em proliferação e produzir uma série de mutações permanentes. O DNA danificado por espécies reativas de oxigênio normalmente é reparado por enzimas pertencentes à via do BER (De Marzo *et al.*, 1999), incluindo a *XRCC1* e a *APEX1*.

O polimorfismo Arg399Gln foi associado com uma diminuição na capacidade de reparo (Abdel-Rahman e El-Zein, 2000). Existem poucos estudos na literatura relacionando polimorfismos no gene *XRCC1* e o câncer de próstata, principalmente em relação ao códon 399. Até o momento os resultados obtidos ainda são inconclusivos, pois enquanto em alguns trabalhos a variante *XRCC1399Gln/Gln* tem sido relacionada com esta neoplasia, em outros trabalhos não se observou associação (Van Gils *et al.*, 2002; Rybicki *et al.*, 2004; Ritchey e Huang, 2005; Chen *et al.*, 2006).

O gene *APEX1* (apurínico/apirimidínico endonuclease 1) localiza-se no cromossomo 14q11.2. *APEX1* agrega-se à polimerase B dentro de sítiosapurínicos/apirimidínicos (AP) e permite que a polimerase B e a ligase III restaurem o DNA a ser reparado (Kelley *et al.*, 2001). Como citado anteriormente, para que as enzimas polimerase B e ligase III atuem é importante também que interajam com a enzima *XRCC1*.

A enzima *APEX1* é uma enzima multifuncional, que age não somente como uma endonuclease AP, mas também como um fator redutor, ativando uma variedade de fatores de transcrição. Um total de 18 polimorfismos já foram descritos no gene *APEX1* (Xi *et al.*, 2004), o mais estudado deles é a variação originada a partir de uma mutação pontual T—G no códon 148 na posição 2197 do gene. *APEX1* tem sido associado com câncer de próstata em poucos trabalhos na literatura (Kelley *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006). Segundo os estudos de Hu *et al.* (2001), o alelo Glu do gene *APEX1* parece estar relacionado com uma hipersensibilidade à radiação ionizante. Além dos poucos estudos relacionando variações no gene *APEX1* e o câncer de próstata, alguns trabalhos analisaram o polimorfismo com o risco de câncer de pâncreas, pulmão, tireóide, colon e mama, obtendo cada um deles diferentes

resultados (Jiao *et al.*, 2006; Ruyck *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2008; Kasahara *et al.*, 2008; Mitra *et al.*, 2008). Chiang *et al.* (2008) em cancer de tireóide e Jiao *et al.* (2006) em câncer de pâncreas não encontraram associação com o gene *APEX1* enquanto Ruyck *et al.* (2007) em câncer de pulmão, Kasahara *et al.* (2008) em câncer de colon e Mitra *et al.* (2008) em câncer de mama encontraram.

De acordo com os dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) existem diversas variantes polimórficas do tipo SNP nos genes de reparo *XRCC1* (n=470) e *APEX1* (n=76). Apesar da grande quantidade, muitos desses SNPs não acarretam modificações funcionais nas enzimas codificadas, sendo poucas dessas variações relevantes para estudos populacionais. Os trabalhos existentes na literatura relatam cerca de 4 SNPs para o gene *XRCC1* (rs: 25487, rs: 25478, rs: 1799782 e rs: 3213235) e 3 SNPs para o gene *APEX1* (rs: 1130409, rs: 2307486 e rs: 1048945) relacionados ao risco de câncer (NCBI, 2009)

Diferenças enzimáticas nas capacidades de reparar o DNA e de modular o risco do câncer tem sido foco de diversos estudos (Kelley *et al.*, 2001; Spitz *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). Como os genes *XRCC1* e *APEX1* pertencem à via do BER e interagem neste tipo de reparo a danos no DNA, o estudo da presença de variantes polimórficas nestes genes é relevante, já que a presença de alelos raros pode acarretar uma deficiência de reparo e uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer.

Genes da via dos andrógenos também são candidatos atrativos para a suscetibilidade ao câncer de próstata, pois os andrógenos são requeridos para o desenvolvimento e proliferação celular da próstata, aumentando, deste modo, a oportunidade de ocorrerem erros genéticos ao acaso, acúmulo de mutações e origem de um fenótipo de malignidade (Sieh *et al.*, 2006).

O gene *PSA* (Antígeno Prostático Específico) pode se apresentar sob a forma polimórfica e indicar suscetibilidade ao câncer de próstata. Suspeita-se que este gene esteja envolvido com a proliferação das células prostáticas. A glicoproteína *PSA* faz parte da família das calicreínas, que são proteases do soro com diversas funções fisiológicas. Elas são representadas por uma família composta por quinze genes, localizados continuamente ao longo do cromossomo 19q13.2, e o mais conhecido deles é o *PSA*, também chamado de *KLK-3*, que codifica o antígeno prostático específico (Diamandis e Yousef, 1997).

O gene *PSA* é regulado por andrógenos. A produção de andrógenos, estrógenos e corticosteróides tem uma via comum, iniciada pelo colesterol, que após sucessivas oxidações pelas enzimas do complexo do Citocromo P450 são convertidos em pregnenolona. A pregnenolona é o principal precursor dos hormônios esteróides

androgênicos, dentre eles a testosterona, que é produzido em maior escala pelas células de Leydig nos testículos e em menor escala pelo córtex da supra-renal (Secchi *et al.*, 1994; Handelsman *et al.*, 2001).

Cerca de 80% da testosterona é carregada no sangue pela globulina carreadora de hormônios sexuais (SHBG), 19% pela albumina e o restante 1% é a chamada testosterona livre. Somente esta última efetivamente atingirá a célula alvo e agir como hormônio masculino. A testosterona livre é convertida em dihidrotestosterona (DHT) por uma enzima chamada 5 α -redutase. A DHT é cerca de cinco vezes mais potente do que a testosterona, fazendo uma ligação mais forte e mais estável com o receptor de andrógeno (Quigley *et al.*, 1995). A ligação da DHT ao AR induz a dissociação das proteínas HSPs (*Heat-shock proteins*), a fosforilação do receptor e sua dimerização. O complexo hormônio-receptor modulará a expressão de genes alvos específicos no núcleo celular por se ligar nas regiões ARE (Feldman e Feldman, 2001) e modificarem a estrutura da cromatina nessas regiões, facilitando o recrutamento da maquinaria de transcrição basal (Heinlein e Chang, 2002)

A partir da ligação andrógeno-AR, ocorre uma seqüência de eventos celulares que resultam na translocação do AR para dentro do núcleo. No núcleo, esses produtos se ligam a regiões específicas chamadas elementos de resposta a andrógenos (AREs) que se localizam no promotor dos genes alvos e, assim, iniciam o processo de transcrição (Lai *et al.*, 2007) (Figura 2). Os AREs consistem em repetições hexâmeras palindrônicas separadas por três nucleotídeos espaçadores (Nelson, 1999). Já foram descritas três AREs no promotor do gene PSA. Duas estão localizadas dentro do promotor proximal na região -170 (AREI) e -394 (AREII), e a terceira ARE está localizada numa região distal (*enhancer*) na posição -4200 (AREIII) (Cleutjens *et al.*, 1997).

Alguns autores têm demonstrado que polimorfismos no gene *PSA* estão associados com variações nos níveis séricos da glicoproteína PSA (Cramer *et al.*, 2003). Dentre os polimorfismos mais estudados, a troca G>A na posição -158 (rs266882) resulta na substituição de uma guanina por uma adenina a 158 bases *upstream* do sítio de início da transcrição e potencialmente afeta o controle transcricional do AR. Este polimorfismo tem sido alvo de diversos estudos, pois acredita-se que pode influenciar individualmente o risco ao câncer de próstata, por alterar a afinidade de ligação do AR no elemento AREI (Xue *et al.*, 2000; Lai *et al.*, 2007). Lai *et al.*, (2007) utilizaram diversos ensaios *in vitro* para identificar um possível papel funcional da variação G-158A na região AREI do gene PSA. Segundo os autores, os alelos A e G se ligam com diferentes afinidades ao AR. O alelo A parece ser mais

responsivo aos andrógenos, além de se ligar ao AR com o dobro de afinidade do alelo G. Especula-se que o maior poder de ligação do alelo A ocorre devido à presença de duas pontes de hidrogênio a mais obtidas pela substituição do nucleotídeo guanina por uma adenina, o que estabilizaria melhor o AR e seus co-reguladores no promotor do gene PSA.

Ainda estudando o polimorfismo G-158A, Xue *et al.* (2001) demonstraram que o nível de PSA em homens saudáveis está associado com o genótipo G/G na região promotora AREI do gene e/ou ao número de repetições CAG no exon 1 do gene AR. Este polimorfismo também foi associado com o risco ao câncer de próstata e com agressividade do mesmo (Xue *et al.*, 2000). Segundo Chiang *et al.* (2004), o alelo G também está relacionado com maior volume tumoral, além de estágios patológicos mais agressivos da doença.

Embora existam diversos estudos, o real papel da variante G-158A na suscetibilidade para o câncer de próstata ainda deve ser elucidado, dado que há uma grande quantidade de resultados contraditórios na literatura (Salinas *et al.*, 2005; Clements *et al.*, 2006; Severi *et al.*, 2006; Sieh *et al.*, 2006). Tem sido sugerido que os diferentes alelos do gene PSA tem relevante importância apenas em combinação com outras variantes, como por exemplo, os diferentes alelos do gene AR (Sieh *et al.*, 2006).

Os hormônios andrógenos mediam respostas diversas através do receptor de andrógeno (AR), que pode ser ativado por dois principais ligantes, a testosterona e a dihidrotestosterona, que se ligam ao receptor com afinidades diferentes (Keller *et al.*, 1996).

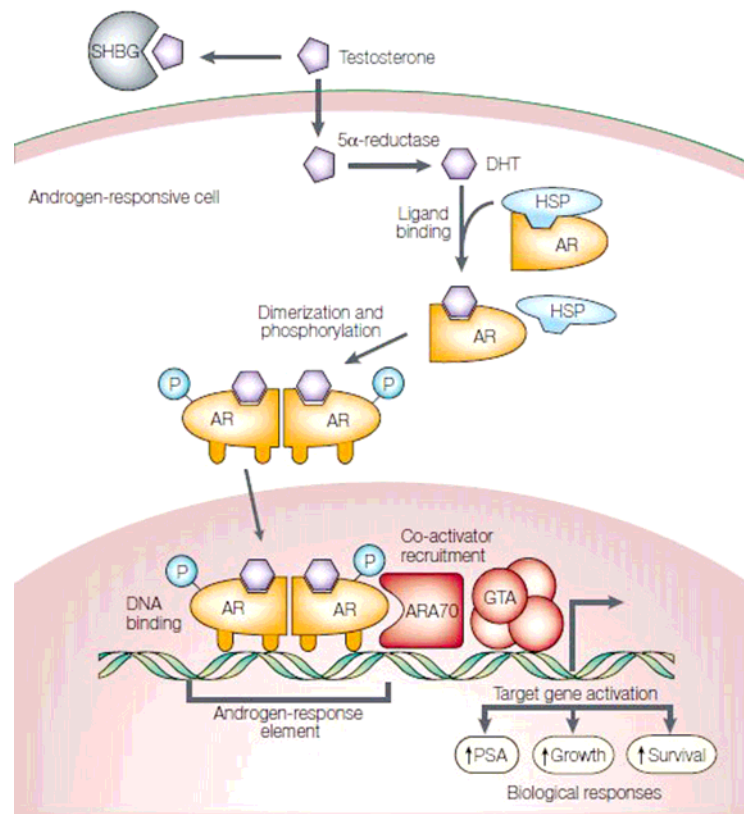


Figura 2 – Ativação do receptor de andrógeno (AR) SHBG: globulina carreadora de hormônios sexuais / DHT: dihidrotestosterona HSP: heat-shock proteins / ARA70: co-ativadores / GTA: aparato geral de transcrição.

Fonte: Modificado de Feldman e Feldman (2001)

O gene *AR* está localizado no cromossomo Xq12. Este gene codifica o receptor de andrógeno, cuja principal função é modular a resposta androgênica e estimular a expressão de genes associados com o fenótipo diferenciado da próstata, como por exemplo, o *PSA* citado anteriormente (Giovanucci *et al.*, 1997).

Dado que os andrógenos são essenciais para o crescimento normal da glândula prostática, vias de sinalização aberrantes do *AR* têm um papel crítico no início e progressão do câncer de próstata (Sadar, 1999). O *AR* é membro da superfamília dos receptores nucleares de hormônios, que mediam a ação de ligantes lipofílicos, incluindo esteróides, retinóides, vitamina D3 e hormônio tireoidianos (Mangelsdorf *et al.*, 1995). O receptor de andrógeno possui três domínios funcionais principais: 1) domínio de transativação amino terminal, que é bastante variável e tem a função de modulação da transcrição, 2) domínio de ligação ao DNA, altamente conservado, e 3) domínio de ligação carboxi terminal, também conservado e que tem a função de se ligar aos andrógenos (Mangelsdorf *et al.*, 1995). O gene *AR* possui oito éxons e tem um comprimento de 90Kb. A sequência que codifica para

o primeiro domínio é encontrada no éxon 1 (1586 pb), o segundo domínio é codificado pelos éxons 2 e 3 (152 e 117 pb), enquanto o terceiro domínio é codificado pelos éxons de 4 a 8 (variam de 131 a 288 pb) (Brown *et al.*, 1989; McPhaul, 1999), formando um produto codificado de aproximadamente 2730 pares de bases. A proteína AR consiste de 917 aminoácidos (Brinkmann, 1999).

O exon 1, que codifica o domínio de transativação, contém um microsatélite CAG altamente polimórfico, um polimorfismo de base única no códon 211 (G1733A) e uma repetição menos polimórfica, a repetição GGN (Correa-Cerro *et al.*, 1999).

Os microsatélites consistem de unidades de cerca de um a quatro nucleotídeos, repetidas em tandem (em seqüência) dentro do genoma humano. Apresentam padrão co-dominante de herança mendeliana, um alto grau de polimorfismo e altas taxas de mutação, que variam de 10^{-3} a 10^{-6} por locus (Foissac *et al.*, 1997). Estas mutações ocorrem principalmente durante a replicação do DNA, na qual há um ganho ou perda de repetições, geralmente de apenas uma repetição por vez, por um mecanismo denominado escorregamento da DNA polimerase (*slippage*) (Strachan e Read, 2002). As seqüências de DNA que flanqueiam os microsatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo o desenho de *primers* para amplificações específicas desses loci, via reação em cadeia da polimerase (PCR) (Oliveira *et al.*, 2006). Essas amplificações tendem a mostrar extensivo polimorfismo, que é conseqüência da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microsatélite. Os diferentes números de repetições caracterizam os diferentes alelos, que podem ser detectados numa eletroforese em gel de poliacrilamida (Strachan e Read, 2002). Alguns estudos indicam que os microsatélites possam apresentar relevância funcional na regulação da transcrição gênica. Segundo Kashi e King (1997), o nível de transcrição *in vivo* de alguns genes estaria relacionado ao número de repetições dos microsatélites.

O domínio de transativação amino terminal do gene AR, codificado pelo exon 1, é indispensável para a atividade genômica deste gene (Brinkmann, 1999). Este exon contém um microsatélite CAG bastante polimórfico em comprimento (número variável de poliglutaminas), e é importante por influenciar na função de transativação do AR. Em experimentos de transfecção, o comprimento da repetição CAG é inversa e linearmente correlacionado com a atividade de transativação do AR. Assim, um número menor de repetições estaria relacionado a um alto risco de desenvolvimento do câncer de próstata ou na sua progressão (Santos *et al.*, 2003) e quanto maior o tamanho da repetição CAG, menor a capacidade de ativação do AR (Ding, 2004).

Wang *et al.* (2004) examinaram o efeito da variação do número de repetição CAG e sua relação com a atividade funcional do AR em cultura de células de câncer de próstata em estágio inicial e metastático. Eles construíram diferentes plasmídeos contendo 9, 20 e 44 repetições CAG e os inseriram, respectivamente, nas linhagens celulares PC-3, DU 145 e 1532T. Os resultados demonstraram que a atividade transativacional do AR aumenta conforme o número de CAGs diminui; além disso, células com 9 repetições CAG responderam a níveis muito mais baixos de dihidrotestosterona que células com 20 ou 44 repetições.

Diversos estudos epidemiológicos têm relatado que o polimorfismo CAG é associado com o risco de câncer, não somente em tumores de próstata (Xue *et al.*, 2000; Platz *et al.*, 2005), mas também em outros tumores relacionados com hormônios esteroidais, como câncer de mama, endométrio e ovário (Levine e Boyd, 2001; Rodriguez *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008).

Stanford *et al.* (1997) demonstraram que, para cada repetição CAG adicional, correspondia uma diminuição de 3% no risco de desenvolvimento do câncer de próstata. Segundo os autores, o mecanismo pelo qual os alelos que possuem repetições curtas de CAG aumentam o risco para o câncer de próstata está aparentemente relacionado ao aumento na sua eficiência de transativação dos genes alvos regulados por andrógenos, como por exemplo, o PSA.

Os asiáticos, pouco acometidos pelo câncer de próstata, também possuem regiões CAG longas, diferente dos negros, que as têm muito curtas. Isto explica parcialmente a maior incidência e maior gravidade do carcinoma de próstata nos afroamericanos (Sartor *et al.*, 1999). Sabendo-se que o polimorfismo do gene *AR* apresenta o número de repetições CAG variável entre as populações, deve-se definir o ponto de corte para determinar se os alelos são curtos ou longos em uma dada população estudada. Ribeiro *et al.* (2002), em um estudo com 400 homens brasileiros, encontraram uma média de repetições [CAG]_n de 20,65 e consideraram alelos com < 20 repetições como curtos e alelos com > 20 repetições como longos.

Em 1997 La Spada e Clark relataram que expansões nas repetições CAG para mais de 40 repetições indicavam uma doença neurodegenerativa chamada atrofia muscular bulbar (Síndrome de Kennedy). Os indivíduos portadores dessa doença apresentam resistência ao andrógeno, e possuem esta região polimórfica muito longa, com 40 a 62 repetições (Ruijter *et al.*, 1999). A doença normalmente se manifesta em fases tardias, mas depois de sucessivas gerações, a idade para o surgimento da doença diminui, num processo

chamado antecipação, que ocorre devido à inclusão de repetições adicionais. Acredita-se que proteínas contendo expansões de repetições CAG para mais de 40 resíduos de poliglutamina têm um efeito citotóxico para o sistema nervoso central (Sisodia, 1998).

Devido à alta taxa de mutações, os microssatélites podem ser regiões muito instáveis e tal instabilidade tem sido encontrada também em neoplasias. O DNA de células de determinados tumores apresenta diferenças no número de unidades repetitivas em um ou mais microssatélites, quando comparados aos mesmos microssatélites existentes no DNA de células normais, fato este denominado instabilidade de microssatélites (*MSI, Microsatellite Instability*). Essa variação nos microssatélites de células normais e tumorais de um mesmo indivíduo sugere que os microssatélites possam apresentar um importante papel no desenvolvimento de tumores. Diversos estudos já demonstraram instabilidade de microssatélites em genes responsáveis pelo reparo do DNA *Mismatch repair* (MMR) relacionada ao câncer colorretal (Kloor *et al.*, 2005; Søreide *et al.*, 2006; Mead *et al.*, 2007; Deschoolmeester *et al.*, 2008). Para o carcinoma de próstata, poucos trabalhos têm estudado a instabilidade do microssatélite CAG do gene AR e a maioria deles são estudos do tipo caso-controle ou coorte, que avaliaram as repetições CAG em células do sangue periférico, que não são como o tecido prostático, responsivas à andrógenos (Alvarado *et al.*, 2005).

Alguns estudos prévios na literatura demonstraram instabilidade das repetições CAGs em algumas amostras de câncer de próstata. Schoenberg *et al.* (1994) estudaram 40 amostras deste carcinoma e identificaram em uma delas um encurtamento das repetições CAGs de 24 para 18. Santos *et al.* (2008) encontraram resultados semelhantes em uma amostra de 47 biópsias de câncer de próstata, onde uma delas apresentou um encurtamento de 23 para 18 CAGs quando comparada com a do sangue periférico. Estudos recentes utilizando captura de microdissecção a laser encontraram um encurtamento das repetições CAGs em 26% das 34 amostras de câncer de próstata (Tsujiimoto *et al.*, 2004). Alvarado *et al.* (2005) utilizaram a mesma metodologia e estudaram o tamanho das repetições CAGs em 72 amostras de câncer de próstata provenientes de áreas com diferentes graus histopatológicos. Todas as células mostraram um grau de mosaicismosomático, contendo várias ou até mesmo nenhuma repetição CAG. Os autores demonstraram que células provenientes de regiões tumorais apresentavam um grau bem mais elevado de heterogeneidade quando comparadas com as de tecidos benignos e adjacentes ao tumor, além de possuírem CAGs mais curtas. Os autores sugerem que o mosaicismosomático das repetições CAGs do gene AR pode ser um evento genético importante, que pode levar uma célula em um estado pré canceroso a um estado canceroso. Além disso, variações nas

repetições CAG ainda podem estar relacionadas à progressão do câncer de próstata dependente para a forma independente (Schoenberg *et al.*, 1994; Alvarado *et al.*, 2005).

Em vista do exposto, podemos afirmar que portadores de variantes alélicas nos gene *PSA* e no gene *AR* podem apresentar risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias de próstata. Futuramente, ao se fazer a avaliação anatomopatológica do tumor, será imprescindível conhecer também os genes alterados, pois a escolha terapêutica, bem como a avaliação do prognóstico, serão baseados nas análises destes parâmetros. Com isto, se supostamente tivermos um tumor de baixo grau, porém com o envolvimento de um gene que induza a um mau prognóstico, a conduta a ser tomada deverá ser mais agressiva (Gattás, 1998).

OBJETIVOS

Geral:

Verificar a ocorrência de variantes genéticas polimórficas em pacientes com carcinomas prostáticos de Londrina e região e compará-los com indivíduos-controle livres da doença.

Específicos:

- 1 Comparar, por meio de um estudo de associação do tipo caso-controle, as frequências genótípicas individuais ou combinadas dos genes do reparo de DNA *XRCC1* e *APEX1*; do gene antígeno prostático específico (PSA) e do gene do receptor de andrógeno (*AR*) em pacientes com carcinomas prostáticos.
- 2 Correlacionar as frequências de variantes alélicas com resultados do estadiamento anátomopatológico da peça cirúrgica obtidos pelo médico patologista e indicar quais genótipos estão correlacionados a um maior risco para o desenvolvimento do câncer de próstata.
- 3 Comparar as variações de microsatélite do gene *AR* no sangue e na peça tumoral de alguns pacientes, correlacionando as regiões repetitivas com agressividade tumoral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de Amostras

Esse projeto empregou para a análise genético-molecular amostra de DNA obtidos a partir de leucócitos de sangue periférico e de tumores fixados em parafina, advindos de pacientes com confirmação histopatológica de carcinoma de próstata, bem como amostras de DNA extraídas de sangue periférico de indivíduos-controles saudáveis, todos de base hospitalar, cujos níveis de PSA total eram menores que 2 ng/mL.

O trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética da UEL, Hospital do Câncer de Londrina (HCL), CISMENPAR e da Irmandade Santa Casa de Londrina. Todos os pacientes e seus controles receberam um código e foram incluídos no estudo apenas após a assinatura do Termo de Consentimento Informado e após responderem a um Questionário sobre seu estilo de vida. Os doadores em hipótese alguma tiveram sua identidade divulgada para outras pessoas ou entidades, além daquelas que participaram efetivamente do estudo. Também foram mantidas em sigilo todas as informações obtidas que estivessem relacionadas com a privacidade do doador.

Amostras de sangue periférico de 170 pacientes do Hospital do Câncer de Londrina (ICL) e de clínicas urológicas de Londrina (PR) foram coletadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. O critério de inclusão dos pacientes foi confirmação histopatológica de carcinoma de próstata, além de apresentarem níveis de PSA superiores a 2,5 ng/mL e/ou nódulos no exame de toque digital retal. Todos os pacientes participantes deste trabalho foram submetidos à prostatectomia radical e amostras tumorais provenientes de 60 pacientes foram embebidas em formol tamponado e incluídas em parafina. Após o processamento do material para análise anátomopatológica, o tecido tumoral resultante da macrodissecção foi processado para extração de DNA. Foram excluídos deste trabalho pacientes submetidos à radioterapia ou quimioterapia prévias à cirurgia.

Indivíduos-controles sem histórico familiar de câncer de próstata, que apresentavam nível de PSA menor do que 2ng/mL e não eram portadores de nenhuma neoplasia maligna foram pareados aos pacientes na proporção 1:1 quanto à idade (\pm 5 anos), grupo étnico (euro descendentes, asiáticos e afro descendentes) e hábitos (tabagismo e etilismo).

Extração de DNA de leucócitos de sangue periférico e tumoral

A técnica utilizada para extração do DNA sanguíneo foi a descrita por Miller *et al.* (1988).

Para a extração do DNA tumoral, cortes de 5 a 8 mm de tecido contendo regiões tumorais foram processados para a retirada da parafina, adicionando xilol na temperatura de 65°C, com posterior centrifugação durante 15 minutos. Esse processo se repetiu até a retirada total da parafina. Após lavagens com álcool em diferentes concentrações para a retirada do xilol, o material foi submetido a uma digestão protéica na presença de um tampão de digestão (NaCl 500mM; Tris-HCl 5mM; EDTA 12,5mM, SDS 10% e proteinase K 20mg/mL). Diariamente os tumores foram suplementados com uma dose de 10 mg/mL de proteinase K. No quinto dia foi realizada a extração do DNA com solventes orgânicos (fenol:clorofórmio - 24:1 e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico - 25:24:1). O sobrenadante foi isolado e precipitado com etanol absoluto, acetato de amônio 7,5M e glicogênio (20mg/mL). O DNA foi ressuspendido em um volume final de 30 µL de água ultrapura estéril e armazenado em freezer - 20°C até a sua utilização.

As amostras de DNA de leucócitos de sangue periférico e tumorais foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Labtrade) ou em fluorímetro Qubit™ (Invitrogen), usando-se o kit Quant-iT™ dsDNA.

Genotipagem dos genes *XRCC1*, *APEX1*, *PSA* e *AR*

Os diferentes genótipos de *PSA* (AA, AG e GG) foram analisados pela técnica de PCR-RFLP, usando a enzima de restrição *NheI* (New England Biolabs) segundo o protocolo de Xu *et al.* (2002). Os produtos de clivagem foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio (10mg/mL) (Figura 3). As condições de reação e os *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

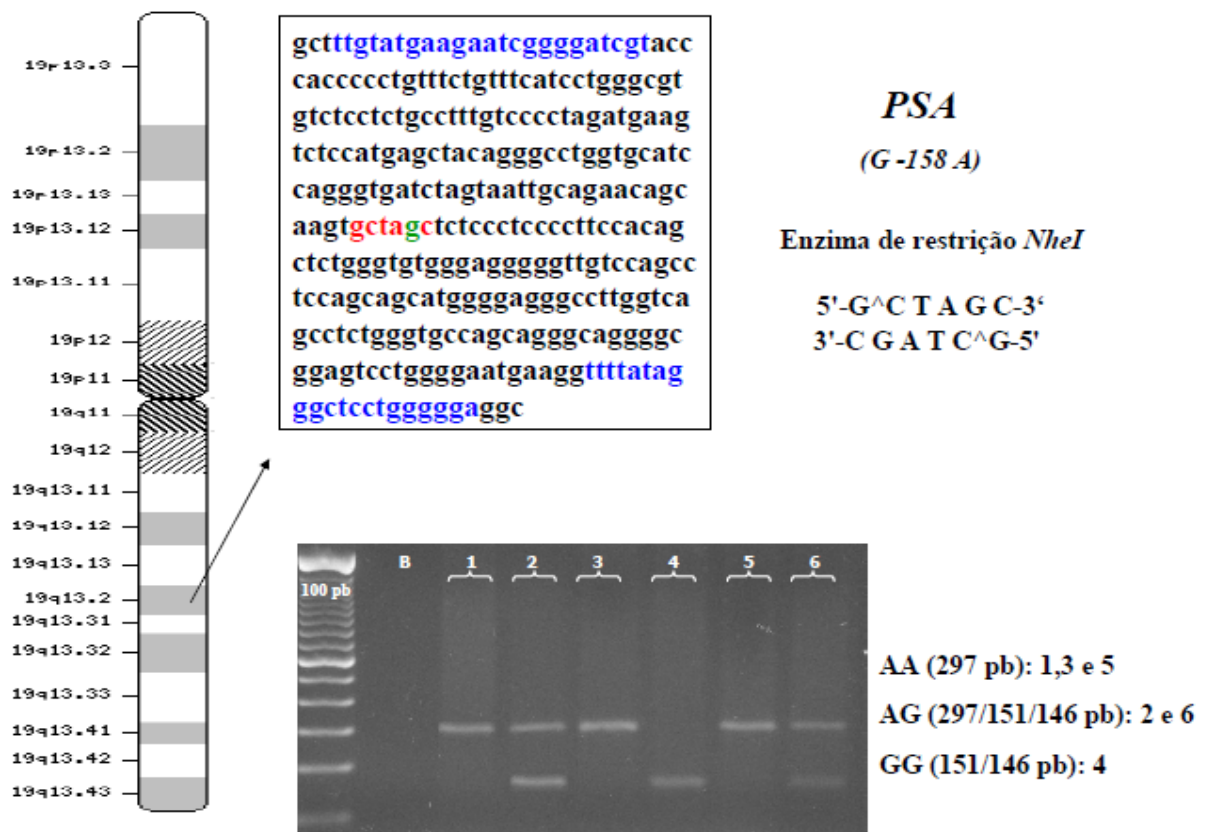


Figura 3 – Fragmento amplificado do gene *PSA* e visualização do gel após clivagem com a enzima de restrição *NheI*.

Tabela 1 – Condições de reação de PCR e clivagem.

Genes	Seqüência de primers	Condições da reação	Enzima
<i>APEXI</i>	F: 5' CTG TTT CAT TTC TAT AGG CTA 3' R: 5' AGG AAC TTG CGA AAG GCT TC 3'	95°C 5' 94°C 50'' 55°C 50'' 35x 72°C 50'' 72°C 10'	<i>BfaI</i> – 37°C 16 horas
<i>XRCCI</i>	F: 5' TCT GTC TCC CCT GTC TCG TT 3' R: 5' ATT GCC CAG CAC AGG ATA AG 3'	95°C 2' 94°C 15'' 60°C 45'' 40x 72°C 45'' 72°C 5'	<i>HpaII</i> – 37°C 16 horas 10 U
<i>PSA</i>	F: 5' TTG TAT GAA GAA TCG GGG ATC GT 3' R: 5' TCC CCC AGG AGC CCT ATA AAA 3'	94°C 10' 94°C 60'' 59°C 60'' 35x 72°C 40'' 72°C 10'	<i>NheI</i> – 37°C 16 horas 1,5 U
<i>AR</i>	F: 5' TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC 3' F: 5' GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT 3'	94°C 10' 95°C 30'' 65°C 60'' 35x 72°C 5' 72°C 7'	

O polimorfismo no gene de reparo a danos do DNA, *XRCC1* foi analisado pela técnica de PCR-RFLP com a enzima de restrição *HpaII* (New England Biolabs) segundo o protocolo de Hu *et al.* (2001) com modificações (aumento de 3°C na temperatura de anelamento) e analisado em gel de agarose 3% (Figura 4). Todas as amostras foram aplicadas em géis de agarose (Invitrogen) em diferentes concentrações e posteriormente corados com brometo de etídeo (10mg/mL) e visualizados em um sistema de fotodocumentação com transiluminador UV (Loccus biotecnologia L-Pix).

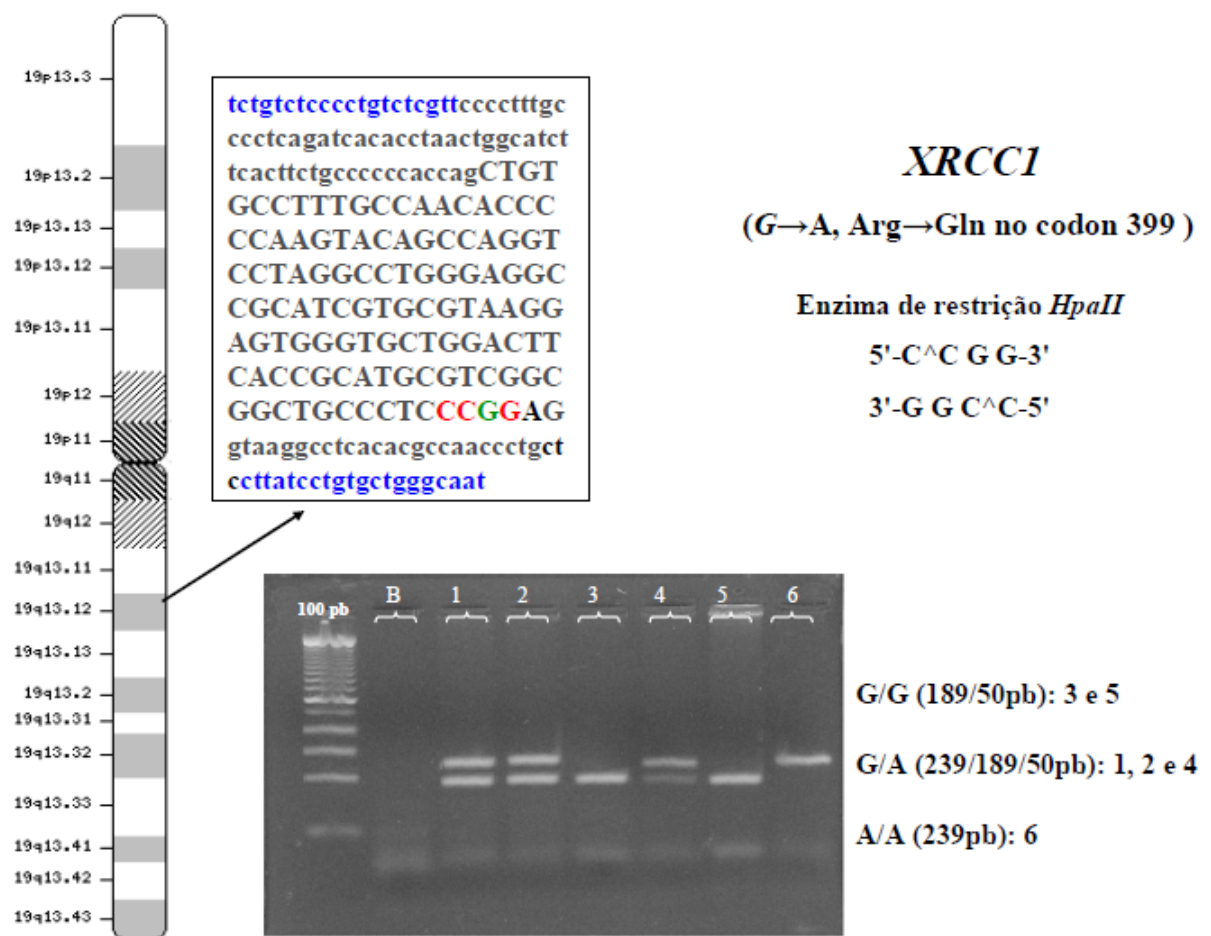


Figura 4 – Fragmento amplificado do gene *XRCC1* e visualização do gel após clivagem com a enzima de restrição *HpaII*.

Os diferentes genótipos do gene *APEX1* Asp148Glu (troca alélica T—G, exon 5) foram analisados pela técnica de PCR-RFLP, usando a enzima de restrição *Bfal I*, segundo o protocolo de Hu *et al.* (2001), modificado em nosso laboratório (diminuição de 2°C na temperatura de anelamento e purificação dos produtos de PCR antes da clivagem. Os

produtos de clivagem foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 4% e corados com brometo de etídio (10mg/mL) (Figura 5). As condições de reação de ambos os genes e os *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.



Figura 5 – Fragmento amplificado do gene *APEX1* e visualização do gel após clivagem com a enzima de restrição *BfaI*.

O sítio para essa enzima de restrição *BfaI* seria inexistente no fragmento amplificado se não fosse uma modificação no primer *Forward* do gene. Esse *primer* foi desenhado a fim de criar um sítio para a enzima de restrição *BfaI*, e por isso a sua penúltima base foi modificada e não é complementar à sequência do DNA. Para verificar se tal modificação estaria comprometendo a eficiência e especificidade do *primer* e se há a ocorrência dos 3 possíveis genótipos (*T/T*, *T/G* e *G/G*), um teste HRM (High Resolution Melting - PCR em tempo Real) foi realizado. A validação do *primer* e do ensaio de *PCR-RFLP* estão representados na Figura 6.

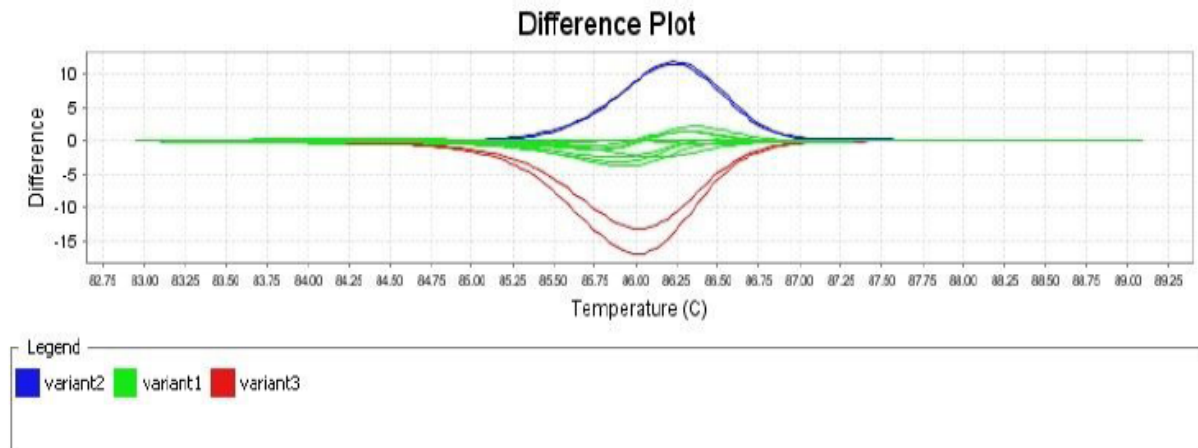


Figura 6 – Gráfico do HRM validando o ensaio PCR- RFLP para o gene *APEX1*. As 3 linhas demonstram os possíveis genótipos (*T/T*, *T/G* e *G/G*)

Para a avaliação da repetição CAG do gene *AR* foram utilizados DNAs extraídos de amostras de leucócitos de sangue periférico e tumorais. A detecção do microssatélite [CAG]*n* presente no exon 1 do gene *AR* foi realizada por amplificação por PCR utilizando os iniciadores descritos por Bharaj *et al.* (1999) (Tabela 1).

O primer *forward* foi marcado com o fluoróforo FAM para a posterior análise automatizada, utilizada para determinar o tamanho exato dos alelos em pares de bases. Esta análise foi realizada no Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina da UNESP-Botucatu (Laboratório Neogene). O tamanho exato dos alelos em pares de bases foi determinado por análise das amostras em gel desnaturante de uréia-poliacrilamida 5% (Long Ranger Singel Packs/FMC), utilizando-se o seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Perkin- Elmer). Um volume de 1µL do produto final da PCR foi acrescido com 2 µL de *loading buffer* (50mg/mL de *blue dextran*, 25mM EDTA/ Formamida, numa concentração de 1:8) e 0,5µL de um marcador fluorescente de tamanho definido (ROX-500, ABI-Perkin-Elmer). A mistura foi desnaturada a 95°C durante 3 minutos, transferida para uma cuba com gelo e 2,2µL do produto foram aplicados em cada poço do gel. A corrida eletroforética foi realizada segundo o protocolo de Kinoshita *et al.* (1999).

Os dados do gel fluorescente coletados durante a eletroforese foram analisados utilizando-se o *software GeneScan Analysis* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer). Cada pico fluorescente foi quantificado pelo seu tamanho (em pares de bases). Os resultados foram exportados ao *Software Genotyper* (Applied Biosystem) para análises adicionais, onde foi feito um cálculo para se determinar o número de repetições dos microssatélites analisados (Figura 8) (Bharaj *et al.*, 1999).

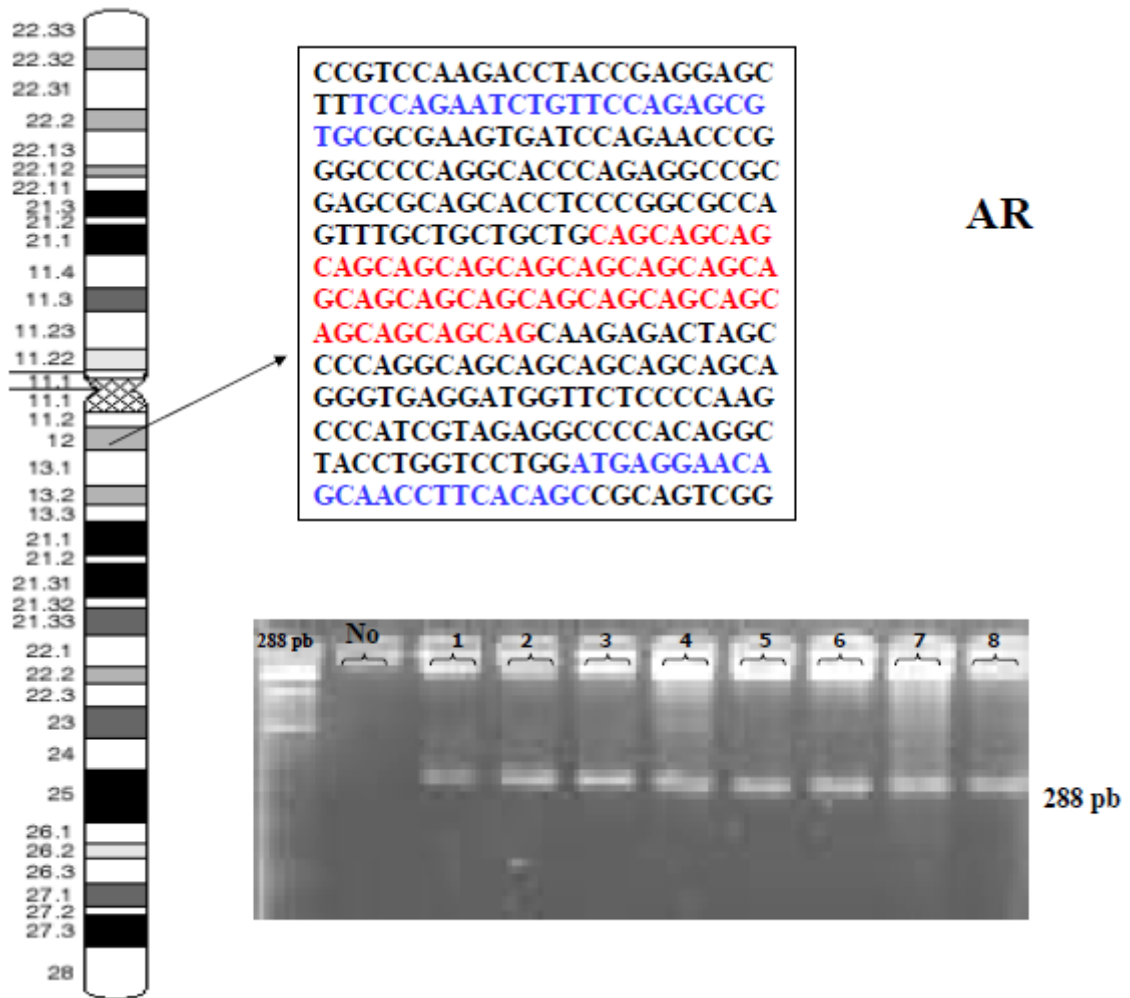


Figura 7 – Fragmento amplificado do gene *AR* e visualização do gel antes do sequenciamento.

O iniciador *forward* foi marcado com o fluoróforo FAM para a posterior análise automatizada, utilizada para determinar o tamanho exato dos alelos em pares de bases. Esta análise foi realizada no Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina da UNESP-Botucatu (Laboratório Neogene). As amostras foram genotipadas no sequenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer). Os dados do gel fluorescente coletados durante a eletroforese foram analisados utilizando-se o *software GeneScan Analysis* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer). Cada pico fluorescente foi quantificado pelo seu tamanho (em pares de bases). Os resultados foram exportados ao *Software Genotyper* (Applied Biosystem) para análises adicionais, onde foi determinado o número de repetições dos microssatélites analisados (Figura 8).

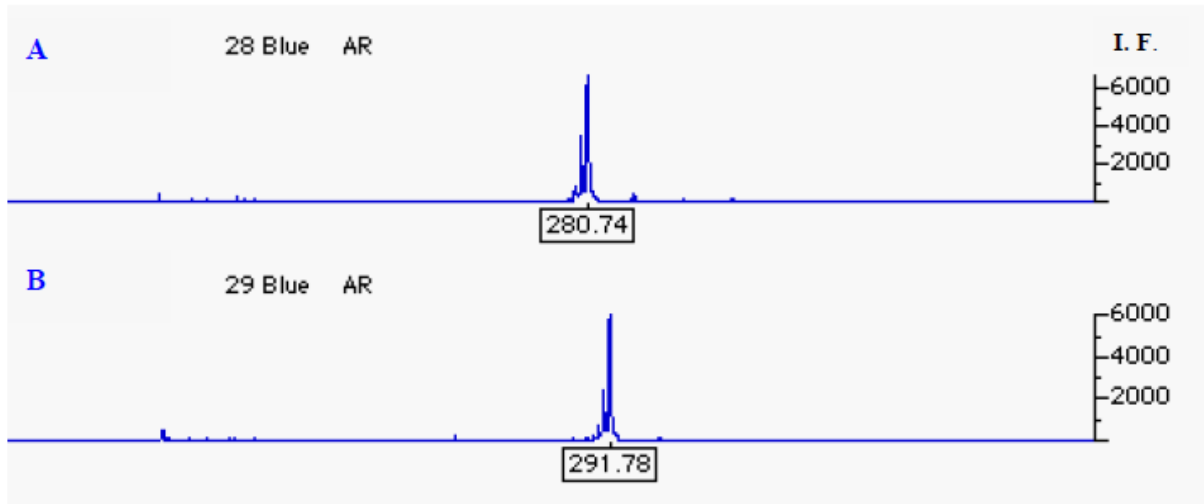


Figura 8 – Eletroferograma das repetições CAG do gene *AR* de um pacientes (A) e de seu controle pareado (B). O retângulo abaixo de cada pico representa tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases. A coluna da direita indica a Intensidade de Fluorescência (I.F.) de cada pico

O tamanho das repetições polimórficas (CAG) $_n$ do gene *AR* foi determinado pela subtração de 222pb (seqüência não variável) do tamanho do fragmento amplificado e posterior divisão deste valor por 3 (Bharaj *et al.*,1999). Considerando-se as diferenças étnicas na frequência do polimorfismo (CAG) $_n$ do gene *AR* e a miscigenação da população brasileira, foram utilizados os dados de Ribeiro *et al.* (2002) para definir alelos curtos e longos.

Parâmetros histopatológicos

Os parâmetros histopatológicos e clínicos de todos os pacientes foram compilados e análises envolvendo níveis de PSA, grau de Gleason, estadiamento, extensão extracapsular, comprometimento de vesículas e invasão perineural foram analisados e comparados com as análises dos polimorfismos genéticos. O sistema para o estadiamento do tumor (TNM) utilizado foi o proposto pela *American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer* (AJCC/UICC-2009), conforme Tabela I.

Análise Estatística

Empregando-se o programa estatístico DPP Braile Biomedical (<http://www.braile.com.br>) e o programa BIOESTAT Versão 2008, uma estimativa do risco relativo (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) de cada genótipo do gene *PSA*, *XRCC1* e *APEXI* foi obtida pela comparação do número de indivíduos com genótipos raros, prevalentes e heterozigotos do grupo de pacientes com o do grupo controle.

Para o gene *AR*, a proporção de CAGs curtas e CAGs longas no grupo de pacientes e no grupo controle foram comparadas. O número de indivíduos obtido para cada um dos três genótipos estudados para o gene *PSA*, *XRCC1* e *APEXI* e para os tamanhos variáveis de comprimento CAG foram avaliados frente aos parâmetros histopatológicos empregando os testes ANOVA e Qui-quadrado (BIOESTAT Versão 2008), todos ao nível de 5% de significância.

ARTIGO A**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES DE REPARO POR EXCISÃO DE BASES
XRCC1 E *APEX1* EM PORTADORES DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

**Hellen Kuasne; Iara Sant'Ana Rodrigues; Paulo Emílio Fuganti; Émerson Pereira
Gregório; Farid Libos Junior; Mariana Bizarro dos Reis; Roberta Losi-
Guembarovski¹; Henrique Mitsu Matsuda; Kazuhiro Ito; Marina O. Kishima; Marco
Aurélio de Freitas Rodrigues; Ilce Mara de Syllos Cólus.**

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS GENES DE REPARO POR EXCISÃO DE BASES *XRCCI* E *APEXI* EM PORTADORES DE CÂNCER DE PRÓSTATA

Hellen Kuasne¹; Iara Sant'Ana Rodrigues¹; Paulo Emílio Fuganti²; Émerson Pereira Gregório²; Farid Libos Junior²; Mariana Bisarro dos Reis¹; Roberta Losi-Guembarovski¹; Henrique Mitsu Matsuda¹; Kazuhiro Ito³; Marina O. Kishima³; Marco Aurélio de Freitas Rodrigues⁴; Ilce Mara de Syllos Cólus¹.

Resumo

O câncer de próstata apresenta altas taxas de incidência e mortalidade sendo o segundo tipo de câncer mais comum no Brasil. Variantes alélicas polimórficas em genes do reparo a danos do DNA são prevalentes na população, podendo levar a uma alteração na capacidade de reparo e, assim, contribuir para o aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias. O objetivo deste trabalho foi analisar variantes alélicas nos genes *XRCCI* (G—A Arg399Gln, rs: 25487) e *APEXI* (T—G, Asp148Glu, rs: 1130409), ambos pertencentes à via de reparo por excisão de bases (BER), em 172 pacientes com carcinoma de próstata (níveis de PSA superiores a 2,5 ng/mL e confirmação histopatológica) e em 172 indivíduos-controle (PSA menor que 2ng/ml). Os genes foram analisados por *PCR-RFLP* e avaliados quanto a parâmetros histopatológicos e clínicos. A frequência dos genótipos considerados de risco para o gene *XRCCI* (A/A ou A/G) foi de 57,6% nos pacientes e 62,2% nos controles. Para o gene *APEXI* obteve-se 51,2% dos genótipos considerados de risco (G/G ou G/T) nos pacientes e 38,4% nos controles. A análise estatística pelo cálculo da Odds ratio (OR) e do intervalo de confiança (IC=95%) mostrou associação positiva entre o gene *APEXI* (OR=1,68 IC95% 1,10-2,58) e o câncer de próstata. O mesmo resultado não foi observado para o gene *XRCCI* (OR=0,82 IC95% 0,53-1,27) e na análise combinada (OR=1,27 IC95% 0,79-2,05). Ambas as variantes não se mostraram relacionadas a graus mais agressivos do processo tumoral. Concluímos que o genótipo raro do gene *APEXI* aumenta o risco para o câncer de próstata e pode ser considerado um marcador de suscetibilidade a este tipo de tumor maligno.

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata tem se tornado um dos maiores problemas de saúde das últimas décadas e sua incidência tem aumentado rapidamente durante os últimos 15 anos. Estimou-se para o ano de 2008 cerca de 49.530 casos deste câncer no Brasil, sendo a segunda principal causa de óbito por câncer no sexo masculino (INCA, 2008).

¹ Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR, Brasil.

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

³ Departamento de Patologia, CCS, Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR, Brasil.

⁴ Departamento de Cirurgia, CCS, Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR, Brasil.

Existem várias evidências sugerindo que o surgimento do câncer de próstata depende da interação de fatores genéticos e ambientais (Hsing e Chokkalingam, 2006; Nelson *et al.*, 2008).

Atualmente, pesquisas relacionam a presença de variantes alélicas polimórficas em genes de reparo a danos no DNA e suscetibilidade genética ao câncer de próstata (Kelley *et al.*, 2001; Spitz *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007). O reparo por excisão de bases (BER) é o tipo de reparo mais freqüente, seus alvos são principalmente danos induzidos por processos endógenos (eventos hidrolíticos, ação de espécies reativas de oxigênio e de metabólitos celulares), como também por processos exógenos (alquilação e radiação ionizante) (Cunningham, 1997; Yu *et al.*, 1999), normalmente em DNA fita simples.

Dentre os polimorfismos de reparo por excisão de bases (BER), mais estudados, destacam-se os encontrados nos genes *XRCC1* e *APEX1* (Matullo *et al.*, 2001; Olshan *et al.*, 2002). A deficiência destes genes durante o desenvolvimento embrionário é letal (Hung *et al.*, 2005). Algumas variações de bases únicas (SNP) descritas em sua estrutura levam a uma redução na atividade de reparar danos (Lunn *et al.*, 1999; Matullo *et al.*, 2001), levando a um acúmulo de mutações e conseqüente aumento do risco de câncer, incluindo o de próstata (Chen *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007).

O gene *XRCC1* (*X-ray cross complementing group 1*) contém 17 exons e está localizado no cromossomo 19q13.12 (Lamerdin *et al.*, 1995). A proteína de reparo *XRCC1* atua como um suporte para outras duas proteínas, a DNA ligase III e a Polimerase B e também age como um sensor de quebra de fita simples de DNA pela interação com a poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-I) (Caldecott *et al.*, 1996). Embora muitas variantes alélicas tenham sido documentadas no gene *XRCC1* (Han *et al.*, 2003), a troca alélica G—A (Arg399Gln, rs: 25487) demonstrou redução na capacidade da enzima em reparar o DNA em alguns fenótipos estudados (Lunn *et al.*, 1999; Matullo *et al.*, 2001).

A variabilidade na expressão de *XRCC1* tem sido examinada extensivamente em doenças relacionadas com a idade, incluindo o câncer de próstata (Chen *et al.*, 2006; Rybicki *et al.*, 2004; De Marzo *et al.*, 1999). Até o momento os resultados obtidos em relação ao códon 399 do gene *XRCC1* ainda são inconclusivos, pois enquanto em alguns trabalhos a variante *XRCC1399Gln/Gln* tem sido relacionada com esta neoplasia (Ritchey e Huang, 2005; Chen *et al.*, 2006), em outros trabalhos não se observou associação (Van Gils *et al.*, 2002; Rybicki *et al.*, 2004).

O gene *APEX1* (apurínico/apirimidínico endonuclease 1) localiza-se no cromossomo 14q11.2. *APEX1* agrega-se à polimerase B dentro de sítiosapurínicos/apirimidínicos (AP) e permite que a polimerase B e a ligase III reparem o DNA lesado (Kelley *et al.*, 2001). A variação mais estudada neste gene é troca T—G no códon 148 na posição 2197 (rs: 1130409). Segundo os estudos de Hu *et al.* (2001), o alelo G do gene *APEX1* parece estar relacionado com a hipersensibilidade à radiação ionizante. Chiang *et al.* (2008) estudando a variação T—G em câncer de tireóide e Jiao *et al.* (2006) em câncer de pâncreas não encontraram associação com o gene *APEX1*, enquanto Ruyck *et al.* (2007), Kasahara *et al.* (2008) e Mitra *et al.* (2008) encontraram, respectivamente, um aumento do risco de câncer de pulmão, colon e mama na presença desta variante. Em relação ao câncer de próstata, há poucos trabalhos descritos na literatura e alguns observaram relação entre a variante T—G e a doença (Kelley *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006).

Como os genes *XRCC1* e *APEX1* interagem no reparo a danos no DNA, o estudo da presença de variantes polimórficas nesses genes é relevante, já que alguns alelos podem acarretar uma deficiência de reparo e uma maior suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de próstata. Há diversos polimorfismos do tipo SNP envolvendo ambos os genes *XRCC1* e *APEX1*, porém a literatura tem relatado que apenas algumas variantes, como por exemplo, a rs: 25487 e rs: 1130409 estão associadas com uma modificação funcional da enzima e risco para o desenvolvimento de câncer. Além disso, há escassos trabalhos na literatura que correlacionam variações nestes genes e agressividade tumoral. Deste modo, este trabalho teve como objetivo comparar, por meio de um estudo de associação do tipo caso-controle, as frequências genótípicas individuais ou combinadas das variantes rs: 25487 do gene *XRCC1* e rs: 1130409 do gene *APEX1* em pacientes com carcinomas prostáticos e controles, além de correlacionar os resultados das análises genéticas a parâmetros clínicos e histopatológicos dos pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de Amostras

O DNA foi obtido a partir de leucócitos de sangue periférico de pacientes com confirmação histopatológica de carcinoma de próstata (níveis de PSA superiores a 2,5 ng/mL e/ou nódulos no exame de toque digital retal) e de indivíduos-controle sem histórico familiar (PSA menor do que 2ng/mL). Os controles foram pareados aos pacientes na

proporção 1:1 quanto à idade (± 5 anos), grupo étnico (euro-descendentes, asiáticos e afro-descendentes) e hábitos (tabagista e etilista). Foram excluídos pacientes submetidos a radio e/ou quimioterapia.

O trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética das instituições participantes. Todos os participantes receberam um código e foram incluídos no estudo apenas após a assinatura do Termo de Consentimento Informado e após responderem a um Questionário sobre seu estilo de vida.

Extração de DNA e Genotipagem dos genes *XRCCI* e *APEXI*

A técnica utilizada para extração do DNA sanguíneo foi a descrita por Miller *et al.* (1988). As amostras de DNA sanguíneo foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Labtrade) ou em fluorímetro Qubit™ (Invitrogen), usando-se o kit Quant-iT™ dsDNA. Os primers utilizados para amplificação dos genes estudados estão descritos na Tabela 1 e foram obtidos a partir de trabalhos da literatura (Vodicka *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2001) e conferidos no Genome Data Bank (GDB) (<http://www.gdb.org>.) com a ferramenta Blast Primer.

O polimorfismo no gene de reparo a danos do DNA *XRCCI* Arg399Gln (troca alélica G—A, exon 10, rs: 25487) foi analisado pela técnica de *PCR-RFLP* com a enzima de restrição *HpaII*, segundo o protocolo de Hu *et al.* (2001) com modificações. Os resultados foram analisados em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídeo (10mg/mL) e visualizados em um sistema de foto documentação com transiluminador UV (Loccus biotecnologia L-Pix).

Tabela 1 – Sequência dos primers, condições de reação de PCR e clivagem.

Genes	Sequência de primers	Condições da reação		Enzima	
<i>APEXI</i>		95°C 5'	Tampão: 10X	<i>BfaI</i> – 45°C 16	
		94°C 50''	MgCl ₂ : 1,5mM	horas	
	F: 5' CTG TTT CAT TTC TAT AGG CTA 3'	55°C 50''	35x	DNTP: 2mM	5U
	R: 5' AGG AAC TTG CGA AAG GCT TC 3'	72°C 50''		Primer: 10 pmol	
		72°C 10'		Taq DNA: 1U	
			DNA: 300 ng		
<i>XRCCI</i>		95°C 2'	Tampão: 10X	<i>HpaII</i> – 37°C	
		94°C 15''	MgCl ₂ : 1,5mM	16 horas	
	F: 5' TCT GTC TCC CCT GTC TCG TT 3'	60°C 45''	40x	DNTP: 2mM	10 U
	R: 5' ATT GCC CAG CAC AGG ATA AG 3'	72°C 45''		Primer: 10 pmol	
		72°C 5'		Taq DNA: 1U	
			DNA: 300 ng		

Os diferentes genótipos do gene *APEXI* Asp148Glu (troca alélica T—G, exon 5, rs: 1130409) foram analisados por *PCR-RFLP*, com a enzima de restrição *BfaI*, segundo o protocolo de Hu *et al.* (2001), modificado em nosso laboratório. Os produtos de PCR foram purificados com a utilização do Kit PureLink (Invitrogen). Os produtos de clivagem foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 4% e corados com brometo de etídio (10mg/mL). As condições de reação de ambos os genes e os *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

Análise Estatística e Parâmetros histopatológicos

Uma estimativa do risco relativo (OR) foi obtida pela comparação do número de indivíduos com genótipos raros, prevalentes e heterozigotos do grupo de pacientes com o grupo controle. Em seguida foi avaliada a combinação dos genótipos de risco em ambos os genes simultaneamente. Estas comparações foram realizadas utilizando-se a razão de risco (OR) com 95% de intervalo de confiança, empregando-se o programa estatístico DPP Braille Biomedical (<http://www.braille.com.br>) e o programa BIOESTAT Versão 2008.

Os diferentes genótipos de *XRCCI* e *APEXI* foram avaliados frente a parâmetros histopatológicos e clínicos (risco de recorrência, níveis de PSA, grau de Gleason, estadiamento, extensão extracapsular, comprometimento de vesículas, invasão perineural e bilateralidade) empregando os testes de OR (Razão de risco) e Quiquadrado (programa

BIOESTAT), todos ao nível de 5% de probabilidade. O sistema para o estadiamento do tumor (TNM) utilizado foi o proposto pela *American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer (AJCC/UICC)*.

RESULTADOS

A maioria dos pacientes (76,7%) se encontrava na faixa etária de 60 a 79 anos, sendo que as médias de idade do grupo dos pacientes ($65,64 \pm 7,56$ anos) e dos controles ($63,86 \pm 8,54$ anos) não diferiram estatisticamente entre si ($t=0,1793$; $P>0,8579$). Nos dois grupos 46 indivíduos (26,7%) eram fumantes enquanto 126 (73,3%) não tinham o hábito tabagista. Quanto ao hábito etilista, 62 (36%) consumiam bebidas alcoólicas e 110 (64%) não.

A Tabela 2 mostra as frequências genóticas dos genes *APEX1* e *XRCC1* para 172 pacientes e 172 controles. A frequência dos genótipos considerados de risco para o gene *XRCC1*(*A/A* ou *A/G*) foi de 57,6% nos pacientes e 62,2% nos controles (OR=0,82 IC95% 0,53-1,27). Para o gene *APEX1* obteve-se 51,2% dos genótipos considerados de risco (*G/G* ou *G/T*) nos pacientes e 38,4% nos controles (OR=1,68 IC95% 1,10-2,58). A análise combinada dos dois genes não mostrou significância estatística (OR=1,27 IC95% 0,79-2,05).

As análises dos genótipos de *XRCC1* (*G/G* vs *G/A* e *A/A*) e *APEX1* (*T/T* vs *T/G* e *G/G*) em relação à presença ou ausência de extensão extracapsular e invasão perineural, invasão de vesículas e bilateralidade indicou que os genótipos não influenciaram os parâmetros histopatológicos analisados (Tabela 3). A hipótese de que os diferentes genótipos estariam influenciando o acometimento de graus de Gleason mais altos e, conseqüentemente, tumores mais agressivos, também não foi confirmada ($p = 0,38$ para *XRCC1* e $p = 0,465$ para *APEX1*); ($p = 0,62$ para *XRCC1* e $p = 0,75$ para *APEX1*) (Tabela 4). Resultados não significativos também foram obtidos quanto ao risco de recorrência, sendo: $p = 0,34$ para *XRCC1* e $p = 0,74$ para *APEX1*. A análise dos genótipos nos pacientes com diferentes graus de estadiamento não mostrou diferença significativa, sendo: *XRCC1* ($p = 0,74$) e *APEX1* ($p = 0,92$). A estratificação dos valores sanguíneos de PSA em 3 grupos mostrou que os diferentes genótipos não estão envolvidos com níveis mais elevados da glicoproteína ($p = 0,784$ para *XRCC1* e $p = 0,97$ para *APEX1*) (Tabela 5).

Tabela 2 – Frequências alélicas dos genes *XRCC1* e *APEX1* em 172 pacientes e seus controles pareados e análise combinada dos diferentes genótipos de *XRCC1* e *APEX1*

GENE	GENÓTIPO	PACIENTES		CONTROLES		OR (IC 95 %)
		Nº	%	Nº	%	
<i>XRCC1</i>	<i>G/G (Arg/Arg)</i>	73	42,4	65	37,8	Referencia
	<i>A/G (Arg/Gln)</i>	52	30,2	73	42,4	0,63 (0,389-1,03) p = 0,08
	<i>A/A (Gln/Gln)</i>	47	27,4	34	19,8	1,23 (0,71-2,14) p = 0,5
	<i>A/A e A/G</i>	99	57,6	107	62,2	0,82 (0,53-1,27) p = 0,44
<i>APEX1</i>	<i>T/T (Asp/Asp)</i>	84	48,8	106	61,6	Referencia
	<i>T/G (Asp/Glu)</i>	83	48,2	64	37,2	1,64 (1,06-2,53) p = 0,03*
	<i>G/G (Glu/Glu)</i>	5	3	2	1,2	3,1 (0,59-16,67) p = 0,30
	<i>G/G e T/G</i>	88	51,2	66	38,4	1,68 (1,10-2,58) p = 0,02*
<i>Considerados de não risco</i>						
<i>XRCC1</i>	<i>APEX1: T/T</i>	122	70,9	130	75,6	
	<i>e</i>					1,27 (0,79-20,5) p = 0,39
<i>Considerados de risco</i>						
<i>APEX1</i>	<i>XRCC1: G/A ou A/A e APEX1: T/G ou GG</i>	50	29,1	42	24,4	

P<0,05*

Tabela 3 – Análise dos genótipos considerados de risco e não risco do gene *XRCC1* e *APEX1* em relação aos parâmetros histopatológicos.

Parâmetros		Genótipos de <i>XRCC1</i>				Genótipos de <i>APEX1</i>				OR (IC95%)	
		<i>Risco</i>		<i>Não risco</i>		<i>Risco</i>		<i>Não risco</i>			
		<i>A/G e A/A</i>		<i>G/G</i>		<i>T/G e G/G</i>		<i>T/T</i>			
		N	%	N	%	Nº	%	Nº	%		
Extensão extracapsular	Presente	37	21,8	30	17,6	0,88 (0,47-1,6) p = 0,82	31	18,2	36	21,2	0,69 (0,37-1,28) p = 0,66
	Ausente	60	35,3	43	25,3		57	33,5	46	27,1	
Invasão Perineural	Presente	26	15,3	12	7	1,86 (0,86-3,9) p = 0,15	18	10,6	20	11,8	0,79 (0,38-1,64) p = 0,66
	Ausente	71	41,8	61	35,9		70	41,2	62	36,4	
Comprometimento de Vesícula	Presente	13	7,6	5	2,9	2,01 (0,71-6,19) p = 0,26	6	3,5	12	7,1	0,42 (0,15-1,19) p = 0,16
	Ausente	84	49,5	68	40		82	48,2	70	41,2	
Bilateralidade	Presente	48	28,2	44	25,9	0,64 (0,39-1,19) p = 0,21	50	29,4	42	24,7	1,25 (0,68-2,29) p = 0,56
	Ausente	49	28,8	29	17,1		38	22,4	40	23,5	

Tabela 4 – Relação dos genótipos do gene *XRCC1* e *APEX1* nos pacientes com diferentes escores de Gleason.

Gene	Genótipos	Escore			X ²	Gleason ≥ 7		Gleason < 7		OR (IC95%)
		4 a 6	7	8 a 10		Nº	%	Nº	%	
<i>XRCC1</i>	<i>G/A e A/A</i>	45	42	10	X ² =0,77	50	29,4	47	27,7	1,22 (0,66-2,24)
	<i>G/G</i>	41	24	8	p = 0,38	34	20	39	22,9	p = 0,62
<i>APEX1</i>	<i>T/G e G/G</i>	40	40	8	X ² =0,53	45	26,5	43	25,3	1,15 (0,63-2,1)
	<i>T/T</i>	46	26	10	p = 0,465	39	22,9	43	25,3	p = 0,75

Tabela 5 – Análise dos genótipos de *XRCC1* e *APEX1* nos pacientes em relação ao risco de recorrência, graus de estadiamento e níveis sanguíneos de PSA.

Gene	Genótipo	Risco de recorrência			X ²	Graus de Estadiamento			X ²	Níveis de PSA (ng/mL)			X ²
		Baixo	Moderado	Alto		pT2 e 2a	pT2b e c	pT3 à pT4		3-10	10,1-20	>20	
<i>XRCC1</i>	<i>G/A e A/A</i>	37	47	13	0,9	22	39	36	0,41	62	27	9	0,075
	<i>G/G</i>	30	38	5	P = 0,34	14	29	30	p = 0,74	41	27	4	p = 0,784
<i>APEX1</i>	<i>T/G e G/G</i>	32	48	8	0,11	14	44	30	0,009	54	28	7	0,0008
	<i>T/T</i>	35	37	10	P = 0,74	22	24	36	p = 0,92	49	26	6	p = 0,977

DISCUSSÃO

Embora as causas específicas do câncer de próstata ainda sejam desconhecidas, a capacidade de reparar danos no DNA tem sido citada como um fator contribuinte. As espécies reativas de oxigênio oriundas do metabolismo celular ou de fatores exógenos podem interagir com o DNA das células epiteliais prostáticas em proliferação e produzir uma série de mutações permanentes. Nessas situações, o DNA danificado é reparado por enzimas pertencentes à via do BER (De Marzo *et al.*, 1999), como a XRCC1 e a APEX1. Variações nos genes de reparo do DNA podem modular a capacidade de reparar danos e, conseqüentemente, aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento de vários cânceres, incluindo o de próstata (Hung *et al.*, 2005; Hállström e Laiho, 2008).

Neste trabalho foram avaliadas variantes alélicas de genes envolvidos no reparo a danos do DNA (*XRCC1* e *APEX1*) em relação à suscetibilidade ao câncer de próstata. Estudos brasileiros com genes de reparo em câncer de próstata são inexistentes, o que torna a presente análise importante, já que a população brasileira é bastante miscigenada, o que dificulta comparações com outras populações do mundo e até mesmo entre as diferentes regiões do país.

Nossos resultados indicam que a variante Arg399Gln do gene *XRCC1* não está associada a esta neoplasia (OR=0,82 IC95% 0,53-1,27) (Tabela 2). Estes dados corroboram os descritos na literatura pelo grupo de Rybicki *et al.* (2004), que também estudou uma população de maioria caucasóide (OR= 0,57 IC95% 0,56-1,38) e Hirata *et al.* (2007) em uma população japonesa (OR=1,06 IC95%=0,76-1,5). No entanto, alguns trabalhos relatam uma correlação entre a variante alélica rara A/A do gene *XRCC1* e o câncer de próstata em diferentes etnias, como os de Xu *et al.* (2007) em uma população chinesa (OR=1,67, IC95% 1,11-2,51) e Chen *et al.* (2006) em uma população negra (OR=1,6, IC95% 1,1-2,4).

Para o gene *APEX1* observou-se uma associação positiva entre os genótipos de risco T/G ou G/G e câncer de próstata (Tabela 2). Indivíduos portando estes alelos possuem um risco 0,68 vezes maior de desenvolver câncer de próstata que os portadores da forma prevalente T/T (OR=1,68 IC95% 1,10-2,58). O trabalho de Kelley *et al.* (2001) demonstrou que os níveis de expressão da enzima *APEX1* em indivíduos com câncer de próstata são elevados, porém os trabalhos populacionais envolvendo a variante Asp148Glu em câncer de próstata são escassos. Kasahara *et al.* (2008) estudando uma amostra de fumantes encontrou associação entre o alelo raro G/G e câncer colon retal (OR=2,69 IC95% 1,45-4,99). No presente trabalho, foram realizadas análises ajustadas (dados não apresentados) para o hábito tabagista e etilista em relação ao gene *APEX1*, não se obtendo resultados significativos para nenhum deles (OR=1,35 IC95% 0,69-2,66 para hábito tabagista e OR=1,06 IC95% 0,56-2,00 para hábito etilista).

Trabalhos recentes na literatura preconizam a importância de se realizar uma análise combinada de diferentes polimorfismos, já que algumas enzimas agem numa mesma via e muitas vezes a ausência de uma enzima pode ser compensada pela ação de outra. Chen *et al.* (2006)

encontraram associação entre o câncer de próstata e o gene *APEXI* somente quando a variante rara foi analisada em combinação com o gene *XRCCI* (OR= 2,9 IC95% 1,4- 6,1), mas não quando analisado isoladamente. Já Ito *et al.* (2004), estudaram os mesmos genes em uma amostra de câncer de pulmão, não encontrando associação positiva (OR= 1,22 IC95% 0,63- 2,37). No presente estudo também foi feita uma análise combinada dos dois genes, cujo resultado não foi significativo (OR=1,27 IC95% 0,79-2,05) (Tabela 2).

Estudos envolvendo genes de reparo, câncer de próstata e correlações histopatológicas são praticamente inexistentes na literatura. Hirata *et al.* (2007) estudando alguns genes de reparo em uma população japonesa não encontraram relação entre o gene *XRCCI* e escore de Gleason ou estágios mais agressivos do tumor em 165 pacientes com câncer de próstata. Os diferentes genótipos de *XRCCI* e *APEXI* foram analisados no presente estudo quanto aos seguintes parâmetros histológicos e clínicos: risco de recorrência bioquímica, níveis de PSA, grau de Gleason, estadiamento, extensão extracapsular, comprometimento de vesículas, invasão perineural e bilateralidade. A análise estatística dos dados indicou que a presença das variantes alélicas não foi associada a nenhum dos parâmetros analisados (Tabelas 3, 4 e 5).

A ausência de terapias que sejam capazes de curar o câncer de próstata avançado torna seu diagnóstico precoce uma importante meta para os pesquisadores. Por essa razão, marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico vêm sendo desenvolvidos. A investigação de genes envolvidos no reparo a danos do DNA é importante, porque visa uma maior compreensão de como alterações em genes de suscetibilidade podem modular o risco para o desenvolvimento do câncer. Neste trabalho, a variante rara do gene *APEXI* se mostrou associada ao desenvolvimento do câncer de próstata, mas nenhum dos dois genes analisados mostrou associação com a evolução da doença para formas mais agressivas. Este resultado demonstra que o alelo raro do gene *APEXI* pode ser considerado um marcador de suscetibilidade para o câncer de próstata.

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e Fundação Araucária de Apoio a Pesquisa pelo suporte financeiro.

Ao Hospital do Câncer de Londrina (ICL), Irmandade Santa Casa de Londrina e CISMENPAR pelas amostras de pacientes e controles.

REFERÊNCIAS

- Bosland MC. The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst. Monogr.* 27:39-66, 2000.
- Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly(ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.* 24:4387-4394, 1996.
- Chen L, Ambrosone CB, Lee J, Sellers TA, Pow-sang J, Park JY, Popanda O. Association between polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and APE1, and the risk of prostate cancer in white and black Americans. *The Journal of urology*, 175:108-112, 2006.
- Chiang FY, Wu CW, Hsiao PJ, Kuo WR, Lee KW, Lin JC, Liao YC, Juo SH. Association between polymorphisms in DNA base excision repair genes XRCC1, APE1, and ADPRT and differentiated thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res.* 14(18):5919-24, 2008.
- Coughlin SS e Hall IJ. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Annals Epidemiology.* 12(3):182-96, 2002.
- Cunningham RP. DNA glycosylases. *Mut Res.* 383 (3):189-196, 1997.
- De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 155:1985, 1999.
- Hallstrom TM, Laiho M. Genetic changes and DNA damage responses in the prostate. *Prostate.* 68(8):902-18, 2008.
- Han J, Hankinson SE, Devivo I, Spiegelman D, Tamimi RM, Mohrenweiser HW, Colditz GA, Hunter DJ. A prospective study of XRCC1 haplotypes and their interaction with plasma carotenoids on breast cancer risk. *Cancer Research.* 63: 8536-8541, 2003.
- Hirata H, Hinoda Y, Tanaka Y, Okayama N, Suehiro Y, Kawamoto K, Kikuno N, Majid S, Vejdani K, Dahiya R. Polymorphisms of DNA repair genes are risk factors for prostate cancer. *Eur J Cancer.* 43(2):231-7, 2007.
- Hsing AW e Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci.* 11:1388-413, 2006.
- Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*, 22(6):917-922, 2001.
- Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 162(10):925-42, 2005.
- Ito H, Matsuo K, Hamajima N, Mitsudomi T, Sugiura T, Saito T, Yasue T, Lee KM, Kang D, Yoo KY, Sato S, Ueda R, Tajima K. Gene-environment interactions between the smoking habit and polymorphisms in the DNA repair genes, APE1 Asp148Glu and XRCC1 Arg399Gln, in Japanese lung cancer risk. *Carcinogenesis.* 25(8):1395-401, 2004.
- INCA: Disponível em : <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>, último acesso 05/12/2008.

- Jiao L, Bondy ML, Hassan MM, Wolff RA, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D. Selected polymorphisms of DNA repair genes and risk of pancreatic cancer. *Cancer Detection and Prevention*. 30:284-291, 2006.
- Kasahara M, Osawa K, Yoshida K, Miyaishi A, Osawa Y, Inoue N, Tsutou A, Tabuchi Y, Tanaka K, Yamamoto M, Shimada E, Takahashi J Association of MUTYH Gln324His and APEX1 Asp148Glu with colorectal cancer and smoking in a Japanese population. *J Exp Clin Cancer Res*. 27:49, 2008.
- Kelley MR, Cheng L, Foster R, Tritt R, Jiang J, Broshears J, Koch M. Elevated and altered expression of the multifunctional DNA base excision repair and redox enzyme Ape1/ref-1 in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 7(4):824-30, 2001.
- Lamerdin J, Montgomery M, Stilwagen S, Scheidecker L, Tebbs R, Brookman K, Thompson L, Carrano A. Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics*. 25:547-554, 1995.
- Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA XRCC1 Polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Research*. 59:2557-2561, 1999.
- Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, Krogh V, Munnia A, Tumino R, Polidoro S, Piazza A, Vieneis P. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and ³²P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis*. 22(9):1437-1445, 2001.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Research*. 16: 1215, 1988.
- Mitra AK, Singh N, Singh A, Garg VK, Agarwal A, Sharma M, Chaturvedi R, Rath SK.
- Association of polymorphisms in base excision repair genes with the risk of breast cancer: a case-control study in North Indian women. *Oncol Res*. 17(3):127-35, 2008.
- Nelson EC, Rodriguez RL, Dawson K, Galvez AF, Evans CP. The interaction of genetic polymorphisms with lifestyle factors: implications for the dietary prevention of prostate cancer. *Nutr Cancer*. 60(3):301-12, 2008.
- Olshan AF, Watson MA, Weissler MC, Bell DA. XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Letters*. 178:181-186, 2002.
- Ritchey JD, Huang WY, Chokkalingam AP, *et al*. Genetic variants of DNA repair genes and prostate cancer: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14:1703-9, 2005.
- Ruyck K, Szaumkessel M, Rudder I, Dehoorne A, Vrai A, Claes K, Velghe A, Meerbeeck JV, Thierens H Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutation Research*. 631 101-110, 2007.
- Rybicki BA, Conti DV, Moreira A, Cicek M, Casey G, Witte JS. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13(1):23-9, 2004.

Spitz Mr, Wei Q, Dong Q *et al.* Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12:689-98, 2003.

Van Gils CH, Bostick RM, Stern MC, Taylor JA. Differences in base excision repair capacity may modulate the effect of dietary antioxidant intake on prostate cancer risk: an example of polymorphisms in the XRCC1 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11:1279-84, 2002.

Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V, Dusinska M, Kuricova M, Zamecnikova M, Musak L, Buchancova J, Norppa H, Hirvonen A, Vodickova L, Naccarati A, Matousu Z, Hemminki K. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis.* 25 (5): 757-763, 2004.

Xu Z, Hua LX, Qian LX, Yang J, Wang XR, Zhang W, Wu HF. Relationship between XRCC1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in men from Han, Southern China. *Asian J Androl.* 9(3):331-8, 2007.

Yang J, Quian LX, Wu HF, Xu ZQ, Sui YG, Wang XR, Zhang W. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 1A1 and 2E1 genes, smoking, drinking and prostate cancer susceptibility: a case-control study in a Han nationality population in Southern China. *International Journal of Urology.* 13:773-780, 2006.

Yu Z, Chen J, Ford B, Brackley M, Glickman B. Human DNA repair systems: an overview. *Environ. Mol. Mutagen.* 33:3-20, 1999.

ARTIGO B**POLIMORFISMOS NOS GENES RECEPTOR DE ANDRÓGENO (AR) E
ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA) E SUA RELAÇÃO COM O
CÂNCER DE PRÓSTATA**

**Hellen Kuasne ; Iara Sant'Ana Rodrigues ; Paulo Emílio Fuganti ; Roberta Losi-
Guembarovski ; Kazuhiro Ito ; Marina O. Kishima ; Marco Aurélio de Freitas
Rodrigues ; Silvia Regina Rogatto ; Rodrigo Mattos dos Santos ; Ilce Mara de Syllos
Cólus.**

**POLIMORFISMOS NOS GENES RECEPTOR DE ANDRÓGENO (AR) E
ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA (PSA) E SUA RELAÇÃO COM O
CÂNCER DE PRÓSTATA**

**Hellen Kuasne¹ ; Iara Sant'Ana Rodrigues¹ ; Paulo Emílio Fuganti² ; Roberta Losi-
Guembarovski¹; Kazuhiro Ito³; Marina O. Kishima³; Marco Aurélio de Freitas
Rodrigues⁴; Silvia Regina Rogatto⁵; Rodrigo Mattos dos Santos⁵, Ilce Mara de Syllos
Cólus¹.**

Resumo

O câncer de próstata apresenta altas taxas de incidência e de mortalidade, sendo o segundo tipo de câncer mais incidente no Brasil. Dentre os genes de interesse relacionados com o câncer de próstata, destacam-se os da via dos andrógenos, como o Receptor de Andrógeno (*AR*) e o Antígeno Específico da Próstata (*PSA*). Os polimorfismos nesses genes incluem variações de repetições de microssatélites no éxon 1 do gene *AR* e substituições de bases únicas no gene *PSA*, que podem levar a alterações das atividades gênicas e contribuir para o risco de desenvolvimento e progressão do tumor. O presente estudo foi realizado com sangue periférico de 177 pacientes (*PSA* superior a 2,5 ng/mL e confirmação histopatológica de carcinoma de próstata) e de 177 indivíduos-controle (*PSA* menor que 2ng/mL) pareados por etnia, idade e hábitos tabagista e etilista. DNAs obtidos de peças tumorais de 60 pacientes foram genotipados por análise de fragmentos utilizando um seqüenciador automático o que permitiu a indentificação do comprimento das repetições CAG, as quais foram divididas em alelos curtos (CAG á 20 repetições) ou alelos longos (CAG > 20 repetições). Os genótipos (*G/G*, *G/A* e *A/A*) do gene *PSA*, estudados através de *PCR-RFLP*, e os do gene *AR* foram analisados em relação a parâmetros histopatológicos e clínicos. Os resultados obtidos pelo teste de Razão de Risco (OR), ANOVA e Qui-Quadrado indicaram que tanto os alelos curtos do gene *AR* (OR=1,89 IC95% 1,21-2,96), quanto o genótipo *G/G* de *PSA* (OR=1,75 IC95% 1,05-2,92), estão associados com um maior risco de desenvolver câncer de próstata. A análise combinada para os dois genes mostrou um aumento de duas vezes no risco para o desenvolvimento da neoplasia (OR=2,02; IC 95%=1,07-3,82). As repetições curtas CAG estão relacionadas com escore de Gleason 7 de pior prognóstico (OR=8,8 IC95% 1,06-73,05), enquanto o genótipo *G/G* está associado a escores de Gleason maiores que 7 (OR=2,54 IC95% 1,27 -5,07). O fato das variantes genéticas dos genes *AR* e *PSA* terem sido associadas ao risco de câncer de próstata e também aos estágios mais agressivos da doença, permitem-nos indicar os polimorfismos estudados como potenciais marcadores do processo tumoral da próstata.

¹ Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR, Brasil.

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

³ Departamento de Patologia, CCS, Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR, Brasil.

⁴ Departamento de Cirurgia, CCS, Universidade Estadual de Londrina - Londrina, PR, Brasil.

⁵ Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Botucatu, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer com maior taxa de mortalidade no Brasil, sendo superado apenas pelo de pulmão (INCA, 2008).

Os fatores de risco que desencadeiam o câncer de próstata podem ser divididos em variáveis, no qual os riscos são passíveis de modificações, como por exemplo, vida sedentária, hábitos alimentares, obesidade, tabagismo e alcoolismo e permanentes, não modificáveis ou parcialmente modificáveis, exemplificados por idade, hereditariedade e etnia. Na prática, o que se observa é a influência de uma combinação de ambos na gênese deste câncer (Friedenreich *et al.*, 2001).

Apesar das altas taxas de incidência e de mortalidade, os mecanismos moleculares envolvidos na oncogênese e na progressão do câncer de próstata ainda são pouco claros, especialmente com relação à progressão para a forma metastática. A ausência de terapias que sejam capazes de curar o câncer de próstata avançado torna seu diagnóstico precoce uma importante meta para os pesquisadores. Marcadores de diagnóstico e prognóstico vêm sendo por esta razão, desenvolvidos (Ferreira e Rocha, 2004).

Dentre os genes candidatos mais importantes para a suscetibilidade ao câncer de próstata encontram-se o *PSA* e o *AR*, pois participam da via da testosterona/dihidrotestosterona, principais andrógenos requeridos para o desenvolvimento e proliferação celular da próstata, aumentando, deste modo, a chance de ocorrerem erros genéticos ao acaso, acúmulo de mutações e origem de um fenótipo maligno (Sieh *et al.*, 2006).

O gene *PSA* é alvo do receptor de andrógeno (*AR*) e apresenta em sua região promotora diversos polimorfismos de base única funcionais e não funcionais (Cramer *et al.*, 2008). Dentre os polimorfismos mais estudados, a troca G>A na posição -158 (rs266882) na região *ARE* (elemento de resposta a andrógeno) parece influenciar individualmente o risco ao câncer de próstata por alterar a afinidade de ligação do *AR* na região promotora *AREI* (Xue *et al.*, 2000, Lai *et al.*, 2007). Este polimorfismo também foi associado com uma maior agressividade, maior volume tumoral e estágios patológicos mais agressivos da doença. (Xue *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2004). Embora existam diversos estudos, o real papel da variante G-158A na suscetibilidade ao câncer de próstata ainda deve ser elucidado, dado que há uma grande quantidade de resultados contraditórios na literatura (Salinas *et al.*, 2005; Clements *et al.*, 2006; Severi *et al.*, 2006; Sieh *et al.*, 2006).

O domínio de transativação amino terminal do gene *AR*, codificado pelo exon 1, é indispensável para sua atividade genômica (Brinkmann, 1999). Em experimentos de transfecção, o comprimento da repetição CAG é inversa e linearmente correlacionado com a atividade de transativação do *AR*. Assim, um número menor de repetições estaria relacionado a um alto risco de desenvolvimento do câncer de próstata ou sua progressão (Santos *et al.*, 2003; Wang *et al.* 2004). Stanford *et al.* (1997) demonstraram que, para cada repetição CAG adicional, correspondia uma diminuição de 3% no risco de desenvolvimento do câncer de próstata.

Diversos estudos epidemiológicos têm relatado que o polimorfismo CAG está associado com o risco de câncer, não somente em tumores de próstata (Xue *et al.*, 2000; Platz *et al.*, 2005), mas também em outros tumores relacionados com hormônios esteroidais, como câncer de mama, endométrio e ovário (Levine e Boyd, 2001; Rodriguez *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008). O polimorfismo do gene *AR* apresenta o número de repetições CAG variável entre as populações estudadas e deve-se definir o ponto de corte para determinar se os alelos são curtos ou longos. Ribeiro *et al.* (2002), em um estudo com 400 homens brasileiros consideraram alelos com á 20 repetições como curtos e alelos com > 20 repetições como alelos longos.

Para o carcinoma de próstata, poucos trabalhos têm estudado a instabilidade do microsatélite (MSI) CAG do gene *AR*. Alguns estudos prévios na literatura demonstraram instabilidade das repetições CAGs em algumas amostras de câncer de próstata (Schoenberg *et al.*, 1994; Tsujimoto *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2008). Alvarado *et al.* (2005) estudaram o tamanho das repetições CAGs em 72 amostras de câncer de próstata com diferentes graus histopatológicos e mostraram que um único tumor de próstata pode conter várias ou até mesmo nenhuma repetição CAG. A literatura sugere que o mosaïcismo somático das repetições CAGs do *AR* pode ser um evento genético importante e levar uma célula em um estado pré canceroso a um estado canceroso. Além disso, variações nas repetições CAG ainda podem estar relacionadas à passagem de câncer de próstata dependente de hormônio para a forma independente (Schoenberg *et al.*, 1994; Alvarado *et al.*, 2005).

Em vista do exposto, podemos sugerir que portadores de variantes alélicas nos genes *PSA* e *AR* podem apresentar risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias de próstata. Atualmente os estadiamentos patológicos e clínicos continuam sendo os parâmetros mais poderosos para a previsão de comportamento tumoral. Na prática clínica, porém, ainda observa-se que as taxas de incidência, e principalmente de mortalidade para o câncer de próstata, continuam elevadas. Nesse sentido, o presente estudo visa indicar genótipos de risco

para o desenvolvimento desta neoplasia através da comparação das frequências genótípicas individuais ou combinadas do gene antígeno prostático específico (*PSA*) e do gene do receptor de andrógeno (*AR*) em pacientes brasileiros com carcinomas prostáticos em um estudo de associação do tipo caso-controle. Espera-se que o uso desses marcadores moleculares somados com informações histopatológicas e clínicas, forneça subsídios para uma melhor conduta terapêutica dos pacientes com câncer de próstata.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de Amostras

O estudo foi realizado com amostras de leucócitos de sangue periférico de 177 pacientes do Hospital do Câncer de Londrina (ICL) e de clínicas urológicas de Londrina (PR-Brasil). O critério de inclusão foi confirmação histopatológica de carcinoma de próstata e níveis séricos de PSA na primeira consulta superiores a 2,5 ng/mL e/ou nódulos no exame de toque digital retal. Todos os pacientes participantes foram submetidos à prostatectomia radical e amostras tumorais provenientes de 60 pacientes foram embebidas em formol tamponado, incluídas em parafina e processadas para análise anatomopatológica. Após a análise histológica e identificação do tecido tumoral, este foi macrodissecado e colocado em tubos de microcentrífuga para posterior extração de DNA. Foram excluídos deste trabalho pacientes submetidos à radioterapia ou quimioterapia prévia a cirurgia.

Indivíduos-controles, sem histórico familiar de câncer de próstata, que possuíam PSA menor do que 2ng/mL e não eram portadores de nenhuma neoplasia maligna foram pareados aos pacientes na proporção 1:1 quanto à idade (± 5 anos), grupo étnico (euro-descendentes, asiáticos e afro-descendentes) e hábitos (tabagismo e etilismo).

O trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética das instituições participantes. Todos os pacientes e seus controles receberam um código e foram incluídos no estudo apenas após a assinatura do Termo de Consentimento Informado e após responderem a um Questionário sobre seu estilo de vida baseado em Carraro e Natarajan (1988).

Extração de DNA de leucócitos de sangue periférico e tumoral

O DNA de leucócitos de sangue periférico foi extraído por "Salting out" (Miller *et al.*, 1988). Cortes de 5 a 8 um contendo regiões tumorais foram utilizados para extração de DNA pelo método do fenol-clorofórmio.

As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, Labtrade) ou em fluorímetro Qubit™ (Invitrogen), usando-se o kit Quant-iT™ dsDNA e mantidas a - 20°C até a sua utilização.

Genotipagem dos genes *PSA* e *AR*

Os diferentes genótipos de *PSA* (*AA*, *AG* e *GG*) foram analisados pela técnica de *PCR-RFLP*, usando a enzima de restrição *Nhe I*, segundo o protocolo de Xu *et al.* (2002), modificado em nosso laboratório. Os produtos de clivagem foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com brometo de etídio (10mg/mL). As condições de reação e os *primers* utilizados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições de reação de PCR e clivagem.

Genes	Seqüência de primers	Condições da reação	Enzima
<i>PSA</i>	F: 5' TTG TAT GAA GAA TCG GGG ATC GT 3'	94°C 10'	<i>NheI</i> – 37°C
	R: 5' TCC CCC AGG AGC CCT ATA AAA 3'	94°C 60''	16 horas
		59°C 60''	35x 1,5 U
		72°C 40''	
		72°C 10'	
<i>AR</i>	F: 5' TCC AGA ATC TGT TCC AGA GCG TGC 3'	94°C 10'	
	R: 5' GCT GTG AAG GTT GCT GTT CCT CAT 3'	95°C 30''	
		65°C 60''	35x
		72°C 5'	
		72°C 7'	

Para a avaliação da repetição CAG do gene *AR* foram utilizados DNAs extraídos de amostras de leucócitos de sangue periférico e tumorais. A detecção do microssatélite [CAG] n presente no exon 1 do gene *AR* foi realizada por amplificação pela PCR utilizando os iniciadores descritos por Bharaj *et al.* (1999) (Tabela 1). O primer *forward* foi marcado com o fluoróforo FAM para a posterior análise automatizada, utilizada para determinar o tamanho exato dos alelos em pares de bases. As amostras foram genotipadas no seqüenciador automático de DNA ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Perkin-Elmer).

Os dados do gel fluorescente coletados durante a eletroforese foram analisados utilizando-se o *software GeneScan Analysis* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer). Cada pico fluorescente foi quantificado pelo seu tamanho (em pares de bases). Os resultados foram exportados ao *Software Genotyper* (Applied Biosystem) para análises adicionais, onde foi feito um cálculo para se determinar o número de repetições dos microssatélites analisados (Bharaj *et al.*, 1999).

O tamanho das repetições polimórficas (CAG) n do gene *AR* foi determinado pela subtração de 222pb (seqüência não variável) do tamanho do fragmento amplificado e posterior divisão deste valor por 3 (Bharaj *et al.*, 1999). Considerando-se as diferenças étnicas na freqüência do polimorfismo (CAG) n do gene *AR* e a miscigenação da população brasileira, foram utilizados os dados de Ribeiro *et al.* (2002) para definir alelos curtos e longos.

Parâmetros histopatológicos

Os parâmetros histopatológicos e clínicos e risco de recorrência (níveis de PSA, grau de Gleason, estadiamento do tumor, extensão extracapsular, comprometimento de vesículas, invasão perineural e bilateralidade) de 170 pacientes foram compilados, analisados e comparados com as análises dos polimorfismos genéticos. O sistema para o estadiamento do tumor (TNM) utilizado foi o proposto pela *American Joint Committee on Cancer/International Union Against Cancer* (AJCC/UICC-2009).

Análise Estatística

Empregando-se o programa estatístico DPP Braille Biomedical (<http://www.braille.com.br>) e o programa BIOESTAT Versão 2008, uma estimativa do risco relativo (OR) com 95% de intervalo de confiança (IC) de cada genotipo do gene *PSA* foi obtida pela comparação do número de indivíduos com genótipos raros, prevalentes e heterozigotos do grupo de pacientes com o do grupo controle.

Para o gene *AR*, a proporção de CAGs curtas e CAGs longas no grupo de pacientes e no grupo controle foram comparadas. O número de indivíduos obtidos para cada um dos três genótipos estudados para o gene *PSA* e para os tamanhos variáveis de comprimento CAG foram avaliados frente aos parâmetros histopatológicos empregando-se os testes ANOVA e Qui-quadrado (BIOESTAT Versão 2008), todos ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS

A maioria dos pacientes (76,9%) se encontrava na faixa etária de 60 a 79 anos, sendo que as médias de idade do grupo dos pacientes ($65,72 \pm 7,46$) e dos controles ($63,46 \pm 8,59$ anos) não diferiram estatisticamente entre si ($t=6,5$; $p>0,35$). Nos dois grupos 48 indivíduos (27%) eram fumantes e 63 (36%) consumiam bebidas alcoólicas. Além disso, 160 (90,4%) eram euro-descendentes, enquanto 17 (9,6%) eram afro-descendentes.

A tabela 2 apresenta as características clínicas e histopatológicas de 170 pacientes, pois alguns foram descartados devido à ausência de informações ($n = 5$) ou porque apresentavam valores de PSA maiores que 500 ng/mL ($n = 2$).

A Tabela 3 mostra as frequências genótípicas dos genes *PSA* e *AR* para, respectivamente, 177 e 160 pacientes controles. A frequência do genótipo de risco (*G/G*) para o gene *PSA* foi de 27,1% nos pacientes e 17,5% nos controles. Nesta análise, o genótipo *G/G* foi considerado de risco; sendo assim, ele foi isolado e utilizado como valor de referência no cálculo da razão de risco (OR).

Tabela 2 – Distribuição dos pacientes estudados em relação a características histopatológicas

Parâmetros	Categorias	N	%
Risco de Recorrência	Baixo	18	10,6
	Moderado	85	50
	Alto	67	39,4
Estadiamento	pT2No e pT2aNo	36	21,2
	pT2bNo e pT2cNo	68	40
	pT3aNo à pT4No/1	66	38,8
Escore de Gleason	4-6	86	50,6
	7	66	38,8
	8-10	18	10,6
PSA Inicial (ng/mL)	3 a 10	103	60,6
	10,1 a 20	54	31,8
	> 20	13	7,6
Extensão Extracapsular	Presente	67	39,4
	Ausente	103	60,6
Invasão Perineural	Presente	38	22,4
	Ausente	132	77,6
Bilateralidade	Sim	92	54,1
	Não	78	45,9
Comprometimento vesicular	Presente	18	10,6
	Ausente	152	89,4
Invasão de Linfonodos	Presente	3	1,8
	Ausente	167	98,2

pT2 e 2a: tumor limitado à próstata comprometendo até metade de 1 lobo

pT2b e c: tumor limitado à próstata comprometendo mais da metade de 1 lobo e ambos os lados

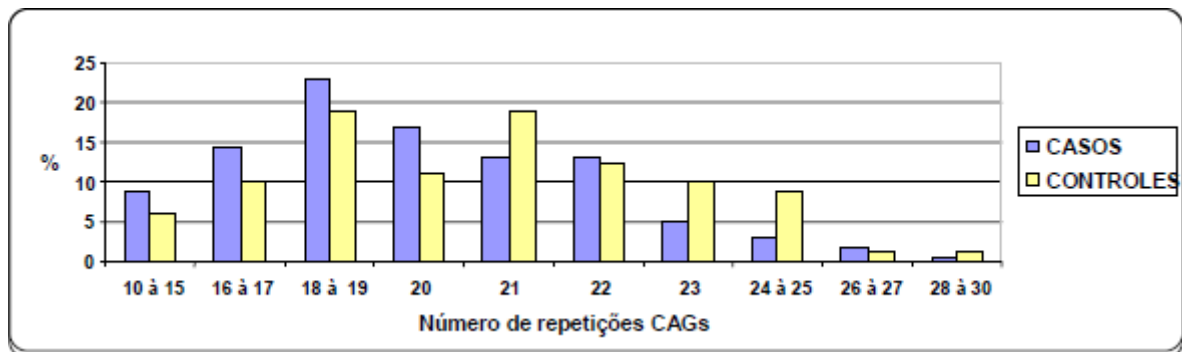
pT3 à pT4: Tumor se estende além da cápsula prostática

Tabela 3 – Freqüências genotípicas do gene *PSA* e *AR* e análise combinada.

Genótipo		Freqüências genotípicas				OR (IC 95%)
		Pacientes		Controles		
		N	%	N	%	
<i>PSA</i>	<i>G/G</i>	48	27,1	31	17,5	Referência
	<i>G/A</i>	83	46,9	81	45,8	1,51 (0,88-2,61)
	<i>A/A</i>	46	26	65	36,7	2,19 (1,21-3,94)*
	<i>A/A</i> e <i>G/A</i>	129	72,9	146	82,5	1,75 (1,05-2,92)*
<i>AR</i>	<i>CAG curta</i>	101	63,1	76	47,5	1,89 (1,21-2,96)*
	<i>CAG longa</i>	59	36,9	84	52,5	p = 0,007
	<i>X±SD</i>	19,5±2,8725		20,27±3,055		t = 2,323* p = 0,0208
RISCO						
Análise	<i>CAG curta e G/G</i>	31	19,4	17	10,6	
Combinada PSA e AR	NÃO RISCO					2,02 (1,07-3,82)*
	<i>CAG longa ou G/A ou A/A</i>	129	80,6	143	89,4	p=0,0418

X±SD: Média ± Desvio Padrão * = p< 0,05

A genotipagem do microssatélite CAG do gene *AR* foi realizada em 160 pacientes e em 160 controles. Trinta e sete pacientes (23,2%) apresentou alelos curtos com 18 a 19 repetições CAG, enquanto a maioria dos controles 30 (19%) apresentou 21 repetições CAG (Figura 1).

**Figura 1** – Distribuição das repetições CAG em pacientes e controles.

A frequência dos alelos curtos (CAG < 20 repetições) foi significativamente maior no grupo dos pacientes (63,1%) do que nos controles (47,5%) (OR=1,89 IC95% 1,21-2,96). A média de repetições CAG no grupo dos pacientes foi de $19,5 \pm 2,87$ e dos controles foi $20,27 \pm 3,06$, sendo significativamente diferentes ($t = 2,3$; $p = 0,0208$). Os resultados da Tabela 3 demonstram que indivíduos portadores dos alelos de risco do gene *PSA* (*G/G*) e *AR* (repetições CAG curta) apresentam risco cerca de 2 vezes maior para o desenvolvimento de câncer de próstata (OR=2,02 IC95% 1,07-3,82).

Os diferentes genótipos de *PSA* e *AR* foram analisados em relação aos parâmetros histológicos e clínicos e observou-se que ambos os genes não influenciam os níveis de PSA sanguíneo (Tabela 4); a presença ou ausência de extensão extracapsular ($p=0,88$ para *PSA* e $p=0,66$ para *AR*); a invasão perineural ($p=0,36$ para *PSA* e $p=0,19$ para *AR*); o comprometimento de vesícula ($p=0,82$ para *PSA* e $p=0,93$ para *AR*); a bilateralidade ($p=0,87$ para *PSA* e $p=0,61$ para *AR*); os graus de estadiamento ($p=0,65$ para *PSA* e $p=0,31$ para *AR*) e o risco de recorrência ($p=0,30$ para *PSA* e $p=0,62$ para *AR*).

Tabela 4 – Valores médios de PSA sanguíneo em relação aos genótipos de *PSA* e *AR*

Gene	Genótipo	Nº de Indivíduos	X±SD	ANOVA	Níveis de PSA (ng/mL)			X ²
					3 a 10	10,1 a 20	>20	
<i>PSA</i>	<i>G/G</i>	48	10,98 ± 8,374	F=0,2917	29	14	5	
	<i>G/A</i>	78	10,16 ± 6,513	p=0,7516	47	29	4	2,56
	<i>A/A</i>	44	11,12 ± 8,788		27	11	4	p=0,63
<i>AR</i>	<i>CAG curto</i>	107	10,53±7,153	F=0,0467	62	37	8	0,43
	<i>CAG longo</i>	63	10,79±7,77	p=0,8238	41	17	5	p=0,51

X±SD: Média ± Desvio Padrão $p < 0,05$

A análise estatística indicou que o genótipo *G/G* do gene *PSA* parece estar relacionado com escores de Gleason mais altos e, conseqüentemente, com estadiamentos mais agressivos da doença. O mesmo não foi obtido para o gene *AR*. Quando se analisou os genótipos em pacientes com escore de Gleason 7 com gradações diferenciadas (4+3 = pior prognóstico e 3+4 = melhor prognóstico), os resultados mostram que repetições CAG curtas parecem estar relacionados com escores de Gleason de pior prognóstico (4+3). O risco de apresentar escore 7 (4+3) é cerca de 8 vezes maior em indivíduos com CAG curtas. Porém, o intervalo de confiança amplo deste resultado deve ser considerado (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise dos genótipos de *PSA* e *AR* nos pacientes com diferentes escores de Gleason.

Gene	Genótipo	Gleason	Gleason	OR (IC95%)	Gleason 7	Gleason 7	OR (IC95%)*
		≥7	<7		(4+3)	(3+4)	
AR	<i>CAG curta</i>	54	53	1,27 (0,68-2,38)	11	30	8,8 (1,06-73,05)*
	<i>CAG longa</i>	28	35	p=0,54	1	24	p=0,045
PSA	<i>G/G</i>	31	17	2,54 (1,27-5,07)*	3	22	0,48 (0,12-2,0)
	<i>G/A e A/A</i>	51	71	p=0,0122	9	32	p=0,49

O DNA tumoral de 60 indivíduos foi analisado quanto ao número de repetições CAG e comparado com o DNA sanguíneo a fim de se verificar a ocorrência ou não de instabilidade de microssatélites nesses tumores (Figura 2). Quadros de instabilidade tumoral foram encontrados em 23 das 60 amostras (38,3%). As instabilidades ocorreram tanto no sentido de encurtamento (21,6%) como de alongamento (16,6%) das repetições, quando comparado com o DNA sanguíneo.

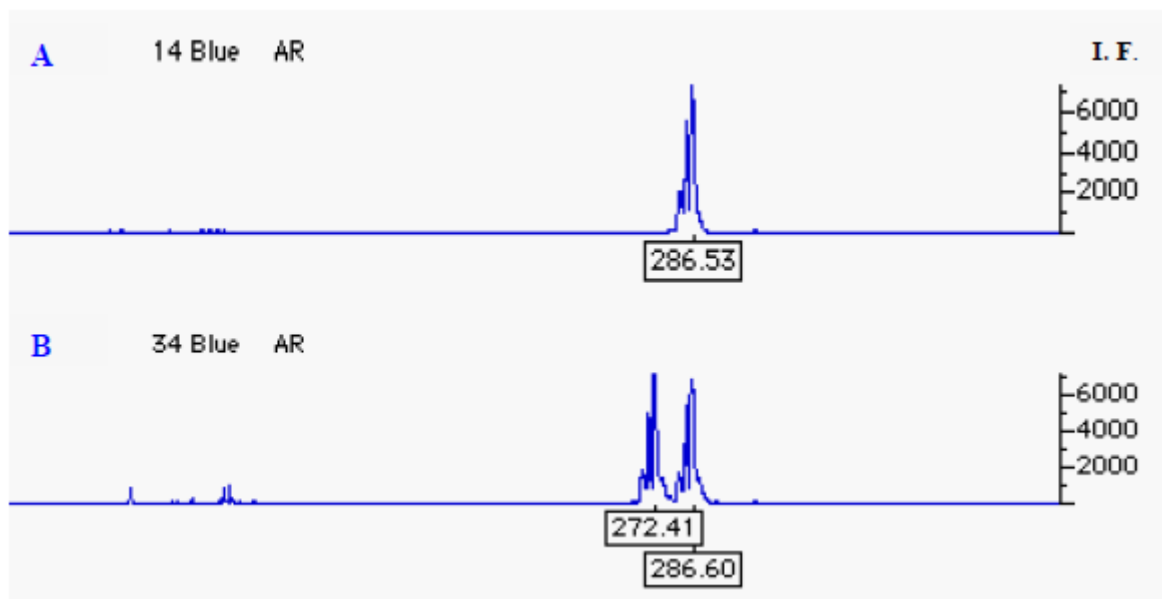


Figura 2 – Análise das repetições CAG do sangue (A) e tumor (B) de um mesmo indivíduo, indicando encurtamento da repetição.

DISCUSSÃO

Os tumores de próstata variam desde formas indolentes, de evolução lenta, até formas extremamente agressivas, de desenvolvimento rápido, mostrando-se bastante heterogêneos e

muitas vezes imprevisíveis. A exposição contínua a andrógenos, metabólitos de andrógenos e outros fatores fisiológicos, pode desempenhar um papel na suscetibilidade dos homens ao desenvolvimento do câncer de próstata (Coughlin e Hall, 2002). Nesse sentido, o estudo de genes participantes da via dos andrógenos, como por exemplo, os genes *AR* e *PSA*, são de grande importância na etiologia desta neoplasia.

Alguns autores têm sugerido a realização da dosagem de PSA em todos os homens abaixo de 40 anos, a fim de identificar indivíduos em estágio inicial (Han *et al.*, 2004; Catalona *et al.*, 2005). Porém, este procedimento pode identificar indivíduos que mesmo com dosagens de PSA altas, nunca desenvolverão o câncer de próstata. Segundo Cramer *et al.* (2003), os níveis expressos da glicoproteína PSA podem estar relacionados à presença de polimorfismos na região promotora do gene.

Há muitos resultados conflitantes na literatura em relação à variante alélica G-158 do gene *PSA*, e suscetibilidade aumentada ao desenvolvimento da doença (Salinas *et al.*, 2005; Clements *et al.*, 2006; Severi *et al.*, 2006; Sieh *et al.*, 2006; Jesser *et al.*, 2008). No presente estudo observou-se que o genótipo *G/G* está associado com um risco maior de câncer de próstata (Tabela 3). Nossos dados corroboram os de Binnie *et al.* (2005) que encontraram associação entre o mesmo genótipo em homens jovens ($p=0,012$). Xue *et al.* (2000) e Chiang *et al.* (2004) encontraram resultados semelhantes estudando, respectivamente, populações caucasóides (OR=2,9 IC95% 1,24-6,78) e asiáticos (OR=2,27 IC95% 1,23-4,22). Segundo Lai *et al.* (2007), os alelos *A* e *G* têm diferentes afinidades ao *AR*. O alelo *A* parece ser mais responsivo aos andrógenos, além de se ligar ao *AR* com o dobro de afinidade. Especula-se que o maior poder de ligação do alelo *A* ocorre devido à substituição do nucleotídeo guanina por adenina, o que estabilizaria melhor o *AR* e seus co-reguladores. Não havendo a substituição, acredita-se que ocorra uma ligação menos estável do alelo *G*, que poderia mascarar os níveis sanguíneos de PSA e dificultar o diagnóstico precoce da doença.

Dado que os andrógenos são essenciais para o crescimento normal da glândula prostática, vias de sinalização aberrantes do *AR* têm um papel crítico no início e progressão do câncer de próstata (Sadar, 1999). Neste trabalho, a média de CAGs dos pacientes foi mais baixa ($19,5 \pm 2,8725$) que nos controles ($20,27 \pm 3,055$) (Tabela 3). O estudo de associação para verificar se o comprimento das repetições estaria relacionado com risco diferencial de desenvolvimento da doença demonstrou que CAGs curtas aumentaram o risco em 1,89 vezes (IC95% 1,21-2,96; $p=0,007$) (Tabela 3). Experimentos de transfecção demonstraram que o comprimento da repetição CAG é inversa e linearmente correlacionado com a atividade de transativação do *AR*. Assim, um número menor de repetições estaria relacionado a um alto risco de desenvolvimento do câncer de próstata (Santos *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004). Nossos dados, portanto, corroboram os diversos estudos que têm relatado que o polimorfismo CAG está associado com o risco de câncer de próstata (Xue *et al.*, 2000; Platz *et al.*, 2005; Hsing e Chokkalingam, 2006; Sieh *et al.*, 2006).

Sieh *et al.* (2006) sugeriram que alelos *G* e *A* do gene *PSA* têm relevante importância apenas em combinação com outras variantes, como por exemplo, os diferentes alelos do gene *AR*. Deste modo, os genótipos considerados de risco para os genes *PSA* (*G/G*) e *AR* (alelos curtos) foram comparados entre pacientes e controles (Tabela 3). Os resultados demonstraram que indivíduos portadores de tais genótipos apresentaram risco 2 vezes maior para o desenvolvimento de câncer de próstata (OR=2,02 IC95% 1,07-3,82). Esses dados corroboram os resultados de Sieh *et al.* (2006) e Xue *et al.* (2000) que encontraram, respectivamente, um risco de 4 e 5 vezes maior em portadores de repetições CAG curtas de *AR*, associados com o genótipo (*G/G*) de *PSA*.

Os diferentes genótipos de *PSA* e *AR* foram analisados quanto aos parâmetros histológicos e clínicos e parecem não influenciar nos níveis de PSA sanguíneo (Tabela 4), presença ou ausência de extensão extracapsular, invasão perineural, comprometimento de vesícula, bilateralidade, graus de estadiamento e risco de recorrência. Nossos dados estão de acordo com Xu *et al.* (2002) e Lai *et al.* (2007) que também não encontraram variação nos níveis sanguíneos de PSA quando comparados com os diferentes alelos do gene *PSA*. Os dados da literatura são contrastantes, pois alguns autores encontraram altos níveis de PSA na presença do alelo *A* (Xue *et al.*, 2001), enquanto outros encontraram maiores níveis na presença do alelo *G* (Schatzl *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008).

Atualmente o estadiamento patológico é o mais poderoso parâmetro de previsão de comportamento tumoral e do resultado do tratamento. D'Amico *et al.* (1998) sugeriram um modelo para estratificar indivíduos com câncer de próstata em pacientes de baixo risco, risco intermediário e alto risco de recorrência bioquímica após a cirurgia. Baseadas nessa estratificação, várias análises multivariadas têm mostrado que escore Gleason e estadiamento TNM são os fatores mais importantes no prognóstico baseado em sobrevida livre de recidiva bioquímica (Hamdy, 2001; Chatelard, 2002). Neste trabalho os genótipos de *PSA* e *AR* também não influenciaram estádios TNM e risco de recorrência.

Alguns autores sugerem que repetições CAC curtas podem estar envolvidas não somente com o aumento do risco de desenvolver câncer de próstata, mas também com potencial mais agressivo da doença (Giovannucci *et al.*, 1997; Nelson *et al.*, 1999). Stanford *et al.* (1997) encontraram associação com escores de Gleason de 8 a 10. No entanto, Gsur *et al.* (2002) não encontraram nenhuma relação entre CAGs curtas e diferentes escores de Gleason ou graus da doença. Os resultados do presente estudo mostram que o genótipo de risco *G/G* parece estar relacionado com escores de Gleason mais altos e, conseqüentemente, com estadiamentos mais agressivos da doença (Tabela 5). O mesmo resultado foi obtido pelo grupo de Gsur *et al.* (2002), que numa análise de 190 pacientes austríacos com câncer de próstata encontraram uma OR de 2,29 (IC95% 1,06- 4,94). Alguns autores também tem associado a presença do alelo *G/G* de *PSA* com tumores em estágios avançados e alto volume tumoral (Chiang *et al.*, 2004).

Normalmente na prática clínica, os pacientes com escores de Gleason de 4 a 6 são submetidos à prostatectomia radical, enquanto que os pacientes com escores de Gleason muito

elevados (8 a 10) são submetidos a outros tipos de tratamento. Os indivíduos com escores de Gleason 7 são os principais alvos de discussão em relação à escolha do melhor tratamento. A fim de identificar se CAGs curtas de *AR* ou genótipo *G/G* de *PSA* poderiam estar relacionados com escores de Gleason 7 e serem utilizados como marcadores coadjuvantes na prática clínica, foram analisados pacientes com escore de Gleason 7 e graduações diferenciadas, sendo considerados (4+3) de pior prognóstico e (3+4) de melhor prognóstico. Os resultados mostraram que repetições CAG curtas estavam relacionadas com escores de Gleason de pior prognóstico (4+3). O risco de apresentar escore 7 (4+3) foi quase 9 vezes maior em indivíduos com CAGs curtas. No entanto, o intervalo de confiança deste resultado deve ser considerado (IC 95% 1,06-73,05) em função da estratificação da amostra, onde apenas 66 indivíduos que apresentavam escore 7 foram avaliados (Tabela 5).

Neste estudo, o DNA tumoral de 60 indivíduos foi analisado quanto ao número de repetições CAG no gene *AR* e comparado com o DNA de leucócitos de sangue periférico, a fim de se verificar a ocorrência ou não de instabilidade de microssatélites. Poucos trabalhos têm estudado tal evento em carcinoma de próstata (Schoenberg *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 2008). Tsujimoto *et al.* (2004) encontraram um encurtamento das repetições CAGs em 26% de 34 amostras estudadas. No presente trabalho, 23 das 60 amostras (38,3%) apresentaram ganhos e perdas de repetições CAGs. Alvarado *et al.* (2005) estudaram as repetições CAGs em 72 amostras de tecidos tumorais, benignos e adjacentes ao tumor e observaram um alto grau de mosaicismosomático. Demonstraram ainda, que células provenientes de regiões tumorais apresentavam um grau bem mais elevado de heterogeneidade quando comparadas com as de tecidos benignos e adjacentes, além de possuírem CAGs mais curtas. No presente estudo, as instabilidades ocorreram no tecido tumoral tanto no sentido de encurtamento (21,6%) como de alongamento (16,6%) das repetições, entretanto, não estavam correlacionadas com estágios mais agressivos da doença.

Este estudo demonstrou que um menor número de repetições CAG no gene *AR* e o genótipo *G/G* do gene *PSA* estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver câncer de próstata, além de estarem envolvidos com parâmetros histopatológicos mais agressivos, como escores de Gleason altos. Além disso, observou-se uma alta taxa de mosaicismosomático nos tumores, o que sugere que alterações nas repetições CAGs do gene *AR* pode ser um evento genético importante para esta neoplasia

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e Fundação Araucária de Apoio a Pesquisa pelo suporte financeiro.

Ao Hospital do Câncer de Londrina (ICL), Irmandade Santa Casa de Londrina e CISMENPAR pelas amostras de pacientes e controles.

REFERÊNCIAS

- AJCC/UICC- American Joint Committee on Cancer/ International Union Against Cancer, 2009.
- Alvarado C, Beitel LK, Sircar K, Aprikian A, Trifiro M, Gottlieb B. Somatic mosaicism and cancer: a micro-genetic examination into the role of the androgen receptor gene in prostate cancer. *Cancer Res.* 65(18):8514-8, 2005.
- Bharaj BS, Vassilikos EJ, Diamandis EP. Rapid and accurate determination of (cag)_n repeats in the androgen receptor gene using polymerase chain reaction and automated fragment analysis. *Clin biochem.* 32 (5):327-32, 1999.
- Binnie MC, Alexander FE, Heald C, Habib FK. Polymorphic forms of prostate specific antigen and their interaction with androgen receptor trinucleotide repeats in prostate cancer. *Prostate.* 63(4):309-15, 2005.
- Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Stekettee K, Berrevoets CA, Trapman J. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69(1-6):307-13, 1999.
- Catalona WJ, Loeb S. The PSA era is not over for prostate cancer. *Eur Urol.* 48(4):541-5. 2005
- Carrano AV, Natarajana AT. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research.* 204:379-406, 1988.
- Chatelard PP. Standards, options and recommendations for the management of prostate cancer: therapeutic decision criteria. *Bull Cancer.* 89(6):619-34, 2002.
- Chiang CH, Chen KK, Chang LS, Hong CJ The impact of polymorphism on prostate specific antigen gene on the risk, tumor volume and pathological stage of prostate cancer. *J Urol.* 171(4):1529-32, 2004.
- Clements JA, Lai J, Kedda MA, Hinze K, Smith RL, Yaxley J, Spurdle AB, Morris CP, Harris J. PSA/KLK3 ARE1 promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility *Carcinogenesis.* 28(5):1032-9, 2006.
- Coughlin SS & Hall IJ. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Annals Epidemiology.* 12(3):182-96, 2002.
- Cramer SD, Chang BL, Rao A, Hawkins GA, Zheng SL, Wade WN, Cooke RT, Thomas LN, Bleecker ER, Catalona WJ, Sterling DA, Meyers DA, Ohar J, Xu J. Association between genetic polymorphisms in the prostate-specific antigen gene promoter and serum prostate-specific antigen levels. *J Natl Cancer Inst.* 95(14):1044-53, 2003.
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Fondurulia J, Chen MH, Tomaszewski JE, *et al.* The combination of preoperative prostate specific antigen and postoperative pathological findings to predict prostate specific antigen outcome in clinically localized prostate cancer. *J Urol.* 160(6 Pt 1):2096-101, 1998.

- Ferreira CG e Rocha JC. *Oncologia Molecular*. Editora Atheneu. 1ª Edição Pg 395-396, 2004.
- Fournier G, Valeri A, Mangin P, Cussenot O. Prostate cancer. Epidemiology. Risk factors. Pathology. *Ann Urol (Paris)*. 38(5):187-206, 2004.
- Friedenreich CM. Physical activity and cancer prevention: from observational to intervention research. *Cancer epidemiol biomarkers prev*.10: 287-301, 2001.
- Giovanucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A *et al*. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 94:3320-3, 1997.
- Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human Pathology*. 23:273-279, 1992.
- Gsur A, Preyer A, Haidinger G, Zidek T, Madersbacher S, Schatzl G, Marberger M, Vutuc C, Micksche M. Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 23 (10):1647-1651, 2002.
- Hamdy FC. Prognostic and predictive factors in prostate cancer. *Cancer Treat Rev*. 27(3):143-51, 2001.
- Han M, Gann PH, Catalona WJ. Prostate-specific antigen and screening for prostate cancer. *Med Clin North Am*. 88(2):245-65, 2004.
- Hsing AW e Chokkalingam AP. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci*. 11:1388-413, 2006.
- INCA, 2008 (disponível em <http://www.inca.gov.br> - último acesso 05/12/2008).
- Jesser C, Mucci L, Farmer D, Moon C, Li H, Gaziano JM, Stampfer M, Ma J, Kantoff P. Effects of G/A polymorphism, rs266882, in the androgen response element 1 of the PSA gene on prostate cancer risk, survival and circulating PSA levels. *Br J Cancer*. 99(10):1743-7, 2008.
- Kinoshita M, Nakamura J, Kusaka H, Hadama T, Bago K, Kitajima M, Baba S. Automated and simultaneous identification of microsatellite instability by fluorescence-based polymerase chain reaction (PCR) in four loci. *Clin Chim Acta*. 279(1-2):15-23, 1999.
- Lai J, Kedda MA, Hinze K, Smith RL, Yaxley J, Spurdle AB, Morris CP, Harris J, Clements JA. PSA/KLK3 ARE1 promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 28(5):1032-9, 2007.
- Lefort A e Almeida CJ. *Câncer de Próstata. A importância das campanhas de prevenção*. Monografia. Belo Horizonte-MG, 2004.
- Levine DA e Boyd J. The androgen receptor and genetic susceptibility to ovarian cancer: results from a case series. *Cancer Res*. 61(3):908-11, 2001.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215, 1988.

- Nelson CC, Hendy SC, Shukin RJ, Cheng H, Bruchovsky N, Koop BF, Rennie PS. Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol Endocrinol.* 13(12):2090-107, 1999.
- Platz EA, Rimm EB, Willett WC, Kantoff PW, Giovannucci E. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. *J Natl Cancer Inst.* 92:2009-2017, 2000.
- Ribeiro ML, Santos A, Carvalho-Salles AB, Hackel C. Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Braz J Med Biol Res.* 35(2):205-13, 2002.
- Rodríguez G, Bilbao C, Ramírez R, Falcón O, León L, Chirino R, Falcón O Jr, Díaz BP, Rivero JF, Perucho M, Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC. Alleles with short CAG and GGN repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer. *Int J Cancer.* 118(6):1420-5, 2006.
- Sadar MD, Hussain M, Bruchovsky N. Prostate cancer: molecular biology of early progression to androgen independence. *Endocr Relat Cancer.* 6(4):487-502, 1999.
- Salinas CA, Austin MA, Ostrander EO, Stanford JL. Polymorphisms in the androgen receptor and the prostate-specific antigen genes and prostate cancer risk. *Prostate.* 65(1):58-65, 2005.
- Santos ML, Sarkis AS, Nishimoto IN, Nagai MA. Androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer from a Brazilian population. *Cancer Detection Prev.* 27:321-6, 2003.
- Santos RM, Jesus CM, Trindade Filho JC, Trindade JC, Camargo JL, Rainho CA, Rogatto SR. PSA and androgen-related gene (AR, CYP17, and CYP19) polymorphisms and the risk of adenocarcinoma at prostate biopsy. *DNA Cell Biol.* 27(9):497-503, 2008.
- Schatzl G, Marberger M, Remzi M, Grosser P, Unterlechner J, Haidinger G, Zidek T, Preyer M, Micksche M, Gsur A. Polymorphism in ARE-I region of prostate-specific antigen gene associated with low serum testosterone level and high-grade prostate cancer. *Urology.* 65(6):1141-5, 2005.
- Schoenberg MP, Hakimi JM, Wang S, Bova GS, Epstein JI, Fischbeck KH, Isaacs WB, Walsh PC, Barrack ER. Microsatellite mutation (CAG24-->18) in the androgen receptor gene in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 14;198(1):74-80, 1994.
- Seven G, Hayes VM, Neufing P, Padilla EJ, Tilley WD, Eggleton SA, Morns HA, English DR, Southey MC, Hopper JL, Sutherland RL, Boyle P, Giles GG. Variants in the prostate-specific antigen (PSA) gene and prostate cancer risk, survival, and circulating PSA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(6):1142-7, 2006.
- Sieh W, Edwards KL, Fitzpatrick AL, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Monks SA, Kronmal RA, Eaton DL. Genetic Susceptibility to Prostate Cancer: Prostate-specific Antigen and its Interaction with the Androgen Receptor. *Cancer Causes Control.* 17(2):187-97, 2006.
- Stanford JL, Just JJ, Gibbs M *et al.* Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res.* 57:1194, 1997.

Tsujimoto Y, Takakuwa T, Takayama H, Nishimura K, Okuyama A, Aozasa K, Nonomura N. In situ shortening of CAG repeat length within the androgen receptor gene in prostatic cancer and its possible precursors. *Prostate*. 58(3):283-90, 2004.

Wang Q, Udayakumar TS, Vasaitis TS, Brodie AM, Fondell JD. Mechanistic relationship between androgen receptor polyglutamine tract truncation and androgen-dependent transcriptional hyperactivity in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 279(17):17319-28, 2004.

Wu MH, Chou YC, Yu CP, Yang T, You SL, Chen CJ, Sun CA. Androgen receptor gene CAG repeats, estrogen exposure status, and breast cancer susceptibility. *Eur J Cancer Prev*. 17(4):317-22, 2008.

Xu J, Isaac SD, Wiley KE, Meyers DA, Smith JF, Carpten JD, Trend JM. Prostate cancer linkage to HPC1: effect of year of diagnosis. *J Urol. Suppl*. 163:65, 2002.

Xue W, Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA, Ingles SA. Susceptibility to prostate cancer: interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci. *Cancer Res*. 60(4): 839-41, 2000.

Xue W, Coetzee GA, Ross RK, Irvine R, Kolonel L, Henderson BE, Ingles SAA. Genetic determinants of serum prostate-specific antigen levels in healthy men from a multiethnic cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10(6):575-9, 2001.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo de variantes genéticas polimórficas em pacientes com carcinomas prostáticos é uma área bastante promissora na descoberta de marcadores moleculares que possam auxiliar a terapêutica dos pacientes. Neste trabalho, foi realizado um estudo de associação do tipo caso-controle, onde as frequências genotípicas individuais ou combinadas dos genes do reparo de DNA *XRCCI* e *APEXI*; do gene antígeno prostático específico (*PSA*) e do gene do receptor de andrógeno (*AR*) foram comparadas em pacientes com câncer de próstata e seus controles. Os resultados demonstraram que as variantes dos genes *APEXI* e *PSA*, assim como os alelos CAG curtos do gene *AR* estão associados com um maior risco de desenvolver câncer de próstata. Os diferentes genótipos obtidos foram correlacionados com resultados anatomopatológico da peça cirúrgica e os resultados demonstraram que os genótipos G/G do gene *PSA* e as CAGs curtas do gene *AR* estão relacionadas com escores de Gleason maiores que 7 e de pior prognóstico. Possíveis variações de microsatélite do gene *AR* foram analisadas em tecidos tumorais e sanguíneos de 60 pacientes. Os resultados demonstraram que 40 % das amostras apresentaram quadros de instabilidade de microsatélites. Esses resultados demonstram que variações nos genes *APEXI*, *PSA* e *AR* estão relacionados a um maior risco de desenvolver câncer de próstata e as variantes de *PSA* e *AR* ainda se correlacionam com escores mais agressivos da doença. Tais dados sugerem que os três genes (*APEXI*, *PSA* e *AR*) são fortes candidatos a marcadores de suscetibilidade e de prognóstico (*PSA* e *AR*) para este carcinoma.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarado C, Beitel LK, Sircar K, Aprikian A, Trifiro M, Gottlieb B. Somatic mosaicism and cancer: a micro-genetic examination into the role of the androgen receptor gene in prostate cancer. *Cancer Res.* 65(18):8514-8, 2005.
- Abdel-Rahman SZ e El-Zein RA. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobaccospecific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.* 159(1):63-71, 2000.
- Agnez-Lima LF, Medeiros SRB, Maggi BS e Quaresma GAS. Base excision repair in sugarcane. *Genet Mol Biol.* 24:1-4, 2001.
- Bachega W. Câncer de próstata. Folhetos do Hospital do câncer AC Camargo, 2005.
- Bharaj BS, Vassilikos EJ, Diamandis EP Rapid and accurate determination of (cag)_n repeats in the androgen receptor gene using polymerase chain reaction and automated fragment analysis. *Clin biochem.* 32 (5):327-32, 1999.
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J.* 11: 68-76, 1997.
- Bostwick DG, Qian J, Schlesinger MD. Contemporary pathology of prostate cancer. *Urol Clin North Am.* 30:181-297, 2003.
- Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketee K, Berrevoets CA, Trapman J. Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 69(1-6):307-13, 1999.
- Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HF. Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet.* 44(2):264-9, 1989.
- Cadet J, Bourdat AG, D'Ham C, Duarte V, Gasparutto D, Romieu A, Ravanat JL. Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res.* 462: 121-128, 2000.
- Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly(ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick- sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.* 24: 4387-4394, 1996.
- Calvete AC, Srougi M, Nesrallah LJ, Dall'oglio MF, Ortiz V. Avaliação da extensão da neoplasia em câncer da próstata: valor do PSA, da porcentagem de fragmentos positivos e da escala de Gleason. *Prev Assoc Med Bras* 49(3): 250-254, 2003.
- Catalona WJ, Loeb S. The PSA era is not over for prostate cancer. *Eur Urol.* 48(4):541-5, 2005.
- Carrano AV, Natarajana AT. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research.* 204: 379-406, 1988.

Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL. Role of diet in prostate cancer development and progression. *Journal of clinical oncology*. 23: 8152-60, 2005.

Chatelard PP. Standards, options and recommendations for the management of prostate cancer: therapeutic decision criteria. *Bull Cancer*. 89(6):619-34, 2002.

Chen L, Ambrosone CB, Lee J, Sellers TA, Pow-sang J, Park JY, Popanda O. Association between polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and APE1, and the risk of prostate cancer in white and black Americans. *The Journal of urology*. 175: 108-112, 2006.

Chiang CH, Chen KK, Chang LS, Hong CJ. The impact of polymorphism on prostate specific antigen gene on the risk, tumor volume and pathological stage of prostate cancer. *J Urol*. 171(4):1529-32, 2004.

Chiang FY, Wu CW, Hsiao PJ, Kuo WR, Lee KW, Lin JC, Liao YC, Juo SH. Association between polymorphisms in DNA base excision repair genes XRCC1, APE1, and ADPRT and differentiated thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res*. 14(18): 5919-24, 2008.

Clements JA, Lai J, Kedda MA, Hinze K, Smith RL, Yaxley J, Spurdle AB, Morris CP, Harris J. PSA/KLK3 ARE1 promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 28(5):1032-9, 2006.

Cleutjens KB, Van Der Korput HA, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW, Trapman J. An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol Endocrinol*. 11(2):148-61, 1997.

CoBEU (Comitê Brasileiro de Estudos em Uro-Oncologia)
www.cobeu.com.br/CoBEU%205doc - último acesso 03/01/2009.

Cohen JH, kristal AR, Stanford JL. Fruit and vegetable intake and prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 92: 61-8, 2000.

Conforti-froes NDT, Louro ID, Lima JO. Câncer de Próstata. Em: *Genética Molecular do Câncer*. Louro ID, Llerena JJC, Melo MSV, Ashton-Proollo P, Conforti-Froes NDT Editora MSG, pg. 223-231, 2002.

Cookson MS, Sogani PC, Russo P, Herr H, Dalbagni G, Reuter VE *et al*. Pathological staging and biochemical recurrence after neoadjuvant androgen deprivation therapy in combination with radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer: results of a phase II study. *Br J Urol*. 79: 432-438, 1997.

Correa-cerro L, Wöhr G, Haussler J, Berthon P, Drelon E, Magin P *et al*. (CAG)_nCAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with prostate cancer in a French-German population. *Eur J Hum Genet*. 7(3):357-62, 1999.

Coughlin SS & Hall IJ. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Annals Epidemiology*. 12(3):182-96, 2002.

Cramer SD, Chang BL, Rao A, Hawkins GA, Zheng SL, Wade WN, Cooke RT, Thomas LN, Bleecker ER, Catalona WJ, Sterling DA, Meyers DA, Ohar J, Xu J. Association between

- genetic polymorphisms in the prostate-specific antigen gene promoter and serum prostate-specific antigen levels. *J Natl Cancer Inst.* 95(14):1044-53, 2003.
- Cunningham RP. DNA glycosylases. *Mut Res* 383 (3):189-196, 1997.
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Fondurulia J, Chen MH, Tomaszewski JE, *et al.* The combination of preoperative prostate specific antigen and postoperative pathological findings to predict prostate specific antigen outcome in clinically localized prostate cancer. *J Urol.* 160(6):2096-101, 1998.
- De Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanisms of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13(7):768-85, 1999.
- Demarzo AM, Nelson WG, Isaacs WB, Epstein JI.. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *The Lancet.* 361: 955-963, 2000.
- Deschoolmeester V, Baay M, Wuyts W, Van Marck E, Van Damme N, Vermeulen P, Lukaszuk K, Lardon F, Vermorken JB. Detection of microsatellite instability in colorectal cancer using an alternative multiplex assay of quasi-monomorphic mononucleotide markers. *J Mol Diagn.* 10(2):154-9, 2008.
- Diamandis EP & Yosefu H. Nonprostatic sources of prostate-specific antigen. *Urol Clin North Am.* 24(2): 275-282, 1997.
- Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER. Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. *Prostate.* 58(1):23-32, 2004.
- Doetsch PW e Cunningham RP. The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Mutat Res.* 236(2-3):173-201, 1990.
- Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/cancer/tipos/prostata.html>, último acesso 05/12/2008.
- Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/results_single/sect_01_table.01.pdf, último acesso 05/12/2008.
- Dong Q, Patel M, Scott K, Graham G, Russell P, Sved P. Oncogenic action of phospholipase A(2) in prostate cancer. *Cancer Letters.* 240:9-16, 2006.
- Dutt N, Bates AW, Baithun SI. Secondary neoplasms of the male genital tract with different patterns of involvement in adults and children. *Histopathology.* 37:323- 331, 2000.
- Eisen JA e Hanawalt PC. A phylogenetic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat. Res.* 435:171-213, 1999.
- Fagundes LA, Fagundes MA, Mariano M, Brito CS, Fagundes HM. Câncer de próstata: novos caminhos para a cura. Porto Alegre: AGFE Editora; 2002.
- Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 1(1):34-45, 2001.
- Ferreira CG e Rocha JC. *Oncologia Molecular.* Editora Atheneu. 1ª Edição Pg 395-396, 2004.

- Foissac A, Crouau-Roy B, Fauré S, Thomsen M, Cambonthomsen A. Microsatellites in the HLA region: an overview. *Tissue Antigens*. 49:197-214, 1997.
- Friedenreich CM. Physical activity and cancer prevention: from observational to intervention research. *Cancer epidemiol biomarkers prev*.10:287-301, 2001.
- Gattás N. Terapia gênica: O urologista de olho no futuro. *Urologia on line*, vol II, 5a edição, São Paulo, 1998.
- Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human Pathology*. 23:273-279, 1992.
- Giovanucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A *et al*. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci*. 94:3320-3, 1997.
- Gray's, Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM. *Anatomia para estudantes*. Editora Elsevier, 39ª Ed. Pg 409-410, 2005.
- Gsur A, Preyer A, Haidinger G, Zidek T, Madersbacher S, Schatzl G, Marberger M, Vutuc C, Micksche M. Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 23 (10):1647-1651, 2002.
- Hamdy FC. Prognostic and predictive factors in prostate cancer. *Cancer Treat Rev*. 27(3):143-51, 2001.
- Han M, Gann PH, Catalona WJ. Prostate-specific antigen and screening for prostate cancer. *Med Clin North Am*. 88(2):245-65, 2004.
- Han J, Hankinson SE, Devivo I, Spiegelman D, Tamimi RM, Mohrenweiser HW, Colditz GA, Hunter DJ. A prospective study of XRCC1 haplotypes and their interaction with plasma carotenoids on breast cancer risk. *Cancer Research*. 63, 8536-8541, 2003.
- Handelsman DJ. Androgen action and pharmacologic uses. Em: De Groot LJ, Jameson JL, editora: *Endocrinology*. Philadelphia, Saunders, pg. 232-42, 2001.
- Hankey BF, Feuer EJ, Cleeg KX, Hayes LB, Legler JM, Prorok PC, Ries LA, Merrill LM,
- Kaplan RS. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer - Part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Center Institute*. 91: 1017-1024, 1999.
- Heinlein CA e Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev*. 23(2):175-200, 2002.
- Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*. 22(6): 917-922, 2001.
- Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 162(10):925-42, 2005.

INCA, 2008 (disponível em <http://www.inca.gov.br> - último acesso 05/12/2008)

International Union Against Cancer (UICC): TNM, Classification of Malignant Tumours, 6th ed. New York, Wiley-Lis. pg.184-187, 2002.

Jiao L, Bondy ML, Hassan MM, Wolff RA, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D. Selected polymorphisms of DNA repair genes and risk of pancreatic cancer. *Cancer Detection and Prevention*. 30:284-291, 2006.

Kasahara M, Osawa K, Yoshida K, Miyaishi A, Osawa Y, Inoue N, Tsutou A, Tabuchi Y, Tanaka K, Yamamoto M, Shimada E, Takahashi J Association of MUTYH Gln324His and APEX1 Asp148Glu with colorectal cancer and smoking in a Japanese population. *J Exp Clin Cancer Res*. 30:27:49, 2008.

Kashi K e King DJ. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends in Genetics*. 22:253-259, 2006.

Keller ET, Ershler WB, Chang C. The androgen receptor: a mediator of diverse responses. *Front Biosci*. 1:d59-71, 1996

Kelley MR, Cheng L, Foster R, Tritt R, Jiang J, Broshears J, Koch M. Clin Cancer Res. Elevated and altered expression of the multifunctional DNA base excision repair and redox enzyme Ape1/ref-1 in prostate cancer. 7(4):824-30, 2001.

Kloor M, Becker C, Benner A, Woerner SM, Gebert J, Ferrone S, Von Knebel D. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Research*. 65(14):6418-24, 2005.

Krokan HE, Standal R, Slupphang G. DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J*. 325: 1-16, 1997.

Krwawicz J, Arczewska KD, Speina E, Maciejewska A, Grzesiuk E. Bacterial DNA repair genes and their eukaryotic homologues: 1. Mutations in genes involved in base excision repair (BER) and DNA-end processors and their implication in mutagenesis and human disease. *Acta Biochim Pol*. 54(3):413-34, 2007.

Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schar P, Barnes DE, Lindahl T. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein. *EMBO J*. 15:6662-6670, 1996.

La Spada AR e Clark AW. Inherited neurodegenerative disorders caused by CAG/polyglutamine tract expansions: symposium introduction. *Brain Pathol*. 7(3):877-80, 1997.

Lai J, Kedda MA, Hinze K, Smith RL, Yaxley J, Spurdle AB, Morris CP, Harris J, Clements JA. PSA/KLK3 ARE1 promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility. *Carcinogenesis*. 28(5):1032-9, 2007.

Lamerdin J, Montgomery M, Stilwagen S, Scheidecker L, Tebbs R, Brookman K, Thompson L, Carrano A. Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics*. 25:547-554, 1995.

- Lefort A e Almeida CJ. Câncer de Próstata. A importância das campanhas de prevenção. Monografia. Belo Horizonte-MG, 2004.
- Levine DA e Boyd J. The androgen receptor and genetic susceptibility to ovarian cancer: results from a case series. *Cancer Res.* 61(3):908-11, 2001.
- Litman HJ, Bhasin S, Link CL, Araujo AB, McKinlay JB. Serum androgen levels in black, Hispanic, and white men. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(11):4326-34, 2006.
- Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA. XRCC1 Polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Research.* 59: 2557-2561, 1999.
- McPhaul MJ. Molecular defects of the androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.*69(1-6):315-22, 1999.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 83(6):835-839, 1995.
- Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S, Celentano E, Krogh V, Munnia A, Tumino R, Polidoro S, Piazza A, Vieneis P. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, 32 smoking and P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis.* 22(9): 1437-1445, 2001.
- McNeal, J.E. Normal histology of the prostate. *Am J Surg Pathol.* 12:619-33, 1988.
- Mead LJ, Jenkins MA, Young J, Royce SG, Smith L, St John DJ, Macrae F, Giles GG, Hopper JL, Southey MC. Microsatellite instability markers for identifying early-onset colorectal cancers caused by germ-line mutations in DNA mismatch repair genes. *Clin Cancer Res.* 13(10):2865-9, 2007.
- Meilke AW e Smith JA. Epidemiology of prostate cancer. *Urol Clin North Am* 17:709, 1990.
- Memisoglu A e Samson L. Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.* 451: 39-51, 2000.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acids Research.* 16: 1215, 1988.
- Mitra AK, Singh N, Singh A, Garg VK, Agarwal A, Sharma M, Chaturvedi R Rath SK. Association of polymorphisms in base excision repair genes with the risk of breast cancer: a case-control study in North Indian women. *Oncol Res.* 17(3): 127-35, 2008.
- Mostofi FK, Davis CJ Jr, Sesterhenn IA. Pathology of carcinoma of the prostate. *Cancer (suppl.).* 70: 235-53, 1992.
- Moritz R, Srougi M, Ortiz V, Leite KRM, Nesrallah L, Dall'oglio M, Sant'anna. AC. Desdiferenciação do câncer da próstata após terapia antiandrogênica. *Rev Assoc Med Bras.* 51(2): 117-20, 2005.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information - último acesso 22/03/2009)

NCCN (National Comprehensive Cancer Network) - Clinical Practice Guidelines in Oncology, 2009.

Nelson CC, Hendy SC, Shukin RJ, Cheng H, Bruchofsky N, Koop BF, Rennie PS. Determinants of DNA sequence specificity of the androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors: evidence for differential steroid receptor response elements. *Mol Endocrinol.* 13(12):2090-107, 1999.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira ML. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology.* 29(2):294-307, 2006.

Olshan AF, Watson MA, Weissler MC, Bell DA. XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Letters.* 178: 181-186, 2002.

Paludo FR e Haas P. Ocorrência de óbitos por câncer de próstata no Brasil e no estado de Santa Catarina. *Newslab.* 50:151-166, 2002.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB. Cancer incidence in five continents. *IARC Sci Publ.* 155(8):1-781, 2002.

Platz EA, Rimm EB, Willett WC, Kantoff PW, Giovannucci E. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. *J Natl Cancer Inst.* 92:2009-2017, 2000.

Platz EA, Leitzmann MF, Rifai N, Kantoff PW, Chen YC, Stampfer MJ, Willett WC, Giovannucci E. Sex steroid hormones and the androgen receptor gene CAG repeat and subsequent risk of prostate cancer in the prostate-specific antigen era. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(5):1262-9, 2005.

Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson E & French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocrine Reviews.* 16: 271-321, 1995.

Rao KS. Mechanisms of Disease: DNA repair defects and neurological disease. *Nature Clinical Practice Neurology.* 3:162-172, 2007.

Ribeiro ML, Santos A, Carvalho-Salles AB, Hackel C. Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Braz J Med Biol Res.* 35(2):205-13, 2002.

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlander N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR, Clegg L, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005*, National Cancer Institute, 2008.

Ritchey JD, Huang WY, Chokkalingam AP, *et al.* Genetic variants of DNA repair genes and prostate cancer: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14:1703-9, 2005.

Robbins, Stanley L. *Patologia Estrutural e Funcional*. Editora Guanabara Koogan, Rj, 6ª Edição. pg. 920-923, 2000.

Rodríguez G, Bilbao C, Ramírez R, Falcón O, León L, Chirino R, Falcón O Jr, Díaz BP, Rivero JF, Perucho M, Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC. Alleles with short CAG and GGN

repeats in the androgen receptor gene are associated with benign endometrial cancer. *Int J Cancer*. 118(6):1420-5, 2006.

Ruyck K, Szaumkessel M, Rudder I, Dehoorne A, Vral A, Claes K, Velghe A, Meerbeeck JV, Thierens H Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutation Research*. 631: 101-110, 2007.

Rybicki BA, Conti DV, Moreira A, Cicek M, Casey G, Witte JS. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*.13(1):23-9, 2004.

Ruijter E, Kaa CVD, Miller G. Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocrine Reviews* 20:22, 1999.

Sadar MD, Hussain M, Bruchovsky N. Prostate cancer: molecular biology of early progression to androgen independence. *Endocr Relat Cancer*. 6(4):487-502, 1999.

Salinas CA, Austin MA, Ostrander EO, Stanford JL. Polymorphisms in the androgen receptor and the prostate-specific antigen genes and prostate cancer risk. *Prostate*. 65(1):58-65, 2005.

Santos ML, Sarkis AS, Nishimoto IN, Nagai MA. Androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer from a Brazilian population. *Cancer Detection Prev*. 27:321-6, 2003.

Santos RM, Jesus CM, Trindade Filho JC, Trindade JC, Camargo JL, Rainho CA, Rogatto SR. PSA and androgen-related gene (AR, CYP17, and CYP19) polymorphisms and the risk of adenocarcinoma at prostate biopsy. *DNA Cell Biol*. 27(9):497-503, 2008.

Sartor O, Zheng Q, Eastham JA. Androgen receptor gene CAG repeat length varies in a race-specific fashion in men without prostate cancer. *Urology*. 53:378-80, 1999.

Schoenberg MP, Hakimi JM, Wang S, Bova GS, Epstein JI, Fischbeck KH, Isaacs WB, Walsh PC, Barrack ER. Microsatellite mutation (CAG24-->18) in the androgen receptor gene in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 198(1):74-80, 1994.

Secchi T, Balme B, Thomas L, Viornery P, Moulin G. Folliculites en touffes du cuir chevelu. *Ann Dermatol Vénéréol*. 121: 479-481, 1994.

Seeberg E, Luna L, Morland I, Eide L, Johnsen B, Larsen E, Alseth I, Dantzer F, Baynton K, Aamodt R, Kristiansen KI, Rognes T, Klungland A, Bjorås M. Base removers and strand scissors: different strategies employed in base excision and strand incision at modified base residues in DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.65:135-42, 2000.

Severi G, Hayes VM, Neufing P, Padilla EJ, Tilley WD, Eggleton SA, Morris HA, English DR, Southey MC, Hopper JL, Sutherland RL, Boyle P, Giles GG. Variants in the prostate-specific antigen (PSA) gene and prostate cancer risk, survival, and circulating PSA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 15(6):1142-7, 2006.

Sieh W, Edwards KL, Fitzpatrick AL, Srinouanprachanh SL, Farin FM, Monks SA, Kronmal RA, Eaton DL. Genetic Susceptibility to Prostate Cancer: Prostate-specific Antigen and its Interaction with the Androgen Receptor. *Cancer Causes Control*. 17(2):187-97, 2006.

- Sisodia SS. Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? *Cell*. 95(1):1-4, 1998.
- Smaletz O. Quimioterapia no Câncer de Próstata Androgênio-Independente: Mudança de Paradigma. *Prática Hospitalar* Ano VI, 38, 2004.
- Söreide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg*. 93(4):395-406, 2006.
- Spitz Mr, Wei Q, Dong Q *et al*. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 12:689-98, 2003.
- Srougi M e Simon SD. Câncer de próstata: câncer urológico. Editora Platina, SP, 2ª ed., pg.281-359, 1996.
- Srougi M, Ortiz V, Arruda H. PSA em uma tribo indígena isolada na Amazônia -Parkatejê. *Brazilian Journal of Urology*. 27:199-199, 2001.
- Stanford JL, Just JJ, Gibbs M *et al*. Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res* 57:1194, 1997.
- Strachan T, Read AP. *Genética Molecular Humana*. 2a ed., Editora Artmed, São Paulo, 576 pgs, 2002.
- Toles CA. Black men are dying from prostate cancer. *ABNF J*. 19(3):92-5, 2008.
- Tsujimoto Y, Takakuwa T, Takayama H, Nishimura K, Okuyama A, Aozasa K, Nonomura N. In situ shortening of CAG repeat length within the androgen receptor gene in prostatic cancer and its possible precursors. *Prostate*. 58(3):283-90, 2004.
- Van Gils CH, Bostick RM, Stern MC, Taylor JA. Differences in base excision repair capacity may modulate the effect of dietary antioxidant intake on prostate cancer risk: an example of polymorphisms in the XRCC1 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 11:1279-84, 2002.
- Verhage BA, Baffoe-Bonnie AB, Baglietto L, Smith DS, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, Catalona WJ, Kiemeny LA. Autosomal dominant inheritance of prostate cancer: a confirmatory study. *Urology*. 57(1):97-101, 2001.
- Vodicka P, Kumar R, Stetina R, Sanyal S, Soucek P, Haufroid V, Dusinska M, Kuricova M, Zamecnikova M, Musak L, Buchancova J, Norppa H, Hirvonen A, Vodickova L, Naccarati A, Matousu Z, Hemminki K. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis*. 25(5):757-763, 2004.
- Yang J, Quian LX, Wu HF, Xu ZQ, Sui YG, Wang XR, Zhang W. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 1A1 and 2E1 genes, smoking, drinking and prostate cancer susceptibility: a case-control study in a Han nationality population in Southern China. *International Journal of Urology*. 13:773-780, 2006.
- Young RH, Srigley JR, Amin MB, Ulbright TM, Cubilla AL. Tumors of the prostate gland, seminal vesicles, male urethra and penis. *Atlas of Tumor Patology, Armed Forces Institute of Patology, Third Series, Fascicle 28, Washington DC, 2000.*

- Yu H, Diamands P, Levesque M, Asa SL, Monne M, Croce CM. Expression of the prostate-specific antigen gene by primary ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 55:1603-1606, 1995.
- Yu Z, Chen J, Ford B, Brackley M, Glickman B. Human DNA repairs systems: an overview. *Environ Mol Mutagen*. 33:3-20, 1999.
- Xu J, Isaac SD, Wiley KE, Meyers DA, Smith JF, Carpten JD, Trend JM. Prostate cancer linkage to HPC1: effect of year of diagnosis. *J Urol Suppl*. 163:65, 2002.
- Xue W, Irvine RA, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA, Ingles SA. Susceptibility to prostate cancer: interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci. *Cancer Res*. 60(4): 839-41, 2000.
- Xue W, Coetzee GA, Ross RK, Irvine R, Kolonel L, Henderson BE, Ingles SAA. Genetic determinants of serum prostate-specific antigen levels in healthy men from a multiethnic cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 10(6): 575-9, 2001.
- Walsh PC. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer: a multi-institutional update. *J Urol*. 158(4):1618-9, 1997.
- Wang Q, Udayakumar TS, Vasaitis TS, Brodie AM, Fondell JD. Mechanistic relationship between androgen receptor polyglutamine tract truncation and androgen-dependent transcriptional hyperactivity in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 279(17):17319-28, 2004.
- Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John ME, Stamey AT, Paffenbarger. Serum Levels of Prostate specific antigen among in Japanese-American and native Japanese men. *Jpn J Cancer Res*. 82:483-5, 1991.
- Wu MH, Chou YC, Yu CP, Yang T, You SL, Chen CJ, Sun CA. Androgen receptor gene CAG repeats, estrogen exposure status, and breast cancer susceptibility. *Eur J Cancer Prev*. 17(4):317-22, 2008.
- Xi T, Jones IM, Mohrenweiser HW. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. *Genomics*. 83: 970, 2004.
- Xu Z, Hua L, Qian L , Yang J , Wang X , Zhang W, Wu H. Relationship between XRCC1 polymorphisms and susceptibility to prostate cancer in men from Han, Southern China. *China Asian Journal of Andrology*. 9(3):331-338, 2007.

ANEXOS

ANEXO A

Estadiamento patológico de acordo com o sistema TNM segundo a AJCC/UICC (2009)

Tumor Primário (T)

- TX - Tumor primário não pode ser avaliado
 T0 - Não há evidência de tumor primário
 T1 - Tumor é um achado histológico incidental, não é palpável ao toque retal ou visualizado por técnicas de imagenologia
 T1a - tumor em 5% ou menos do tecido ressecado
 T1b - tumor em mais de 5% do tecido ressecado
 T1c - tumor identificado em biópsia por agulha (PSA elevado, porém tumor não palpável ao toque e não visualizado em ultra-sonografia)
 T2 - Tumor limitado à próstata
 T2a - tumor compromete até metade de 1 lobo, ou menos
 T2b - tumor compromete mais da metade de 1 lobo, porém não ambos os lobos
 T2c - tumor compromete ambos os lobos
 T3 - Tumor se estende além da cápsula prostática
 T3a - extensão extra-capsular (unilateral ou bilateral)
 T3b - tumor invade vesícula(s) seminal(is)
 T4 - Tumor está fixo ou invade estruturas adjacentes outras que não a vesícula seminal: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores ou parede pélvica

Linfonodos Regionais (N)

- NX - Linfonodos regionais não podem ser avaliados
 N0 - Ausência de metástases em linfonodos regionais
 N1 - Metástase (s) em linfonodo(s) regional (ais)
 N1 (mi) micrometástases de até 0,2cm

Metástases à Distância (M)

- MX - Presença de metástases à distância não pode ser avaliada
 M0 - Ausência de metástases à distância
 M1 - Metástases à distância
 M1a - linfonodo(s) não-regional(ais)
 M1b - osso(s)
 M1c - outra (s) localização (ões)
-

Observação: As categorias p_i, p_N e p_M correspondem às categorias T, N e M. Não há, entretanto, a categoria p_{ll} íplia, p_{llb} ou p_{ilei} porque o tecido amostrado é insuficiente para determinar a maior categoria p_i.

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Como o câncer de próstata é o segundo tipo mais freqüente de câncer entre os homens, diversas pesquisas têm sido realizadas para conhecer melhor a doença e, desta forma, oferecer novas possibilidades de diagnóstico precoce e tratamento. Como não se sabe exatamente quais são as causas desse tumor, os Departamentos de Biologia Geral, de Patologia e Análises Clínicas e o Serviço de Urologia do Departamento de Clínica Cirúrgica, todos pertencentes à Universidade Estadual de Londrina, juntamente com o Setor de Urologia do Hospital do Câncer de Londrina desenvolvem uma pesquisa para obter maior conhecimento sobre o câncer da próstata.

Esta pesquisa faz parte de um projeto sob o título de "Marcadores Moleculares em Câncer de Próstata", que busca encontrar novas formas de diagnóstico para este câncer. O objetivo deste trabalho é estudar 200 pacientes com câncer de próstata, todos pacientes do Hospital do Câncer de Londrina (ICL), e 200 indivíduos livres desta doença, provenientes do CISMENPAR e da Santa Casa de Londrina. Os pacientes participantes deste trabalho que farão parte do grupo com câncer serão aqueles com PSA superior a 2,5 ng/mL e/ou presença de nódulos no exame de toque retal e confirmação histopatológica de carcinoma próstata. Os pacientes livres da doença e que apresentarem níveis do hormônio PSA normais, serão considerados indivíduos-controles, e farão parte de um banco de indivíduos saudáveis.

Nós, Ilce Mara de Syllos Cólus (orientadora), Iara Sant'Ana Rodrigues e Hellen Kuasne, ambas alunas do Programa de Mestrado em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, o selecionamos para nossa pesquisa e solicitamos sua colaboração no nosso projeto de pesquisa.

Sendo assim, solicitamos o seu consentimento para incluí-lo em nossa pesquisa. Caso aceite participar, você deverá assinar este Termo de Consentimento e responder a um questionário com perguntas relacionadas a hábitos diários. Também serão coletadas amostras de 10 mL do seu sangue por punção venosa (picada na veia) com seringas e agulhas descartáveis e estéreis e nos casos de indivíduos com câncer, serão coletadas também amostras tumorais emblocadas em parafina. A obtenção da amostra sangüínea não implicará em riscos adicionais à sua saúde e o seu desconforto será o procedimento de rotina (picada), já que este material será utilizada para o estudo. A inclusão dos resultados da pesquisa em publicação científica será feita de forma a preservar o seu anonimato.

Concordando com o uso desta amostra de sangue do modo descrito acima, é necessário esclarecer que sua participação é voluntária e não lhe trará nenhum gasto e você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados desta pesquisa. Entretanto, você e seu médico terão direito de acesso a todos os resultados obtidos na pesquisa. Esclarecemos que não havendo concordância com a coleta, esta decisão não influenciará de modo algum, no seu tratamento. Gostaríamos também de esclarecer que caso não deseje participar, tem a liberdade de fazê-lo, tanto no início como no decorrer do trabalho, sem nenhum prejuízo para sua pessoa.

A partir do sangue do senhor, será feita uma extração de DNA. O DNA é uma molécula que contém todas as informações do seu organismo e pode ser utilizada em estudos de predisposição a doenças. Pretendemos comparar o DNA extraído da amostra de indivíduos saudáveis com o DNA obtido do sangue de pacientes com câncer de próstata. As diferenças podem nos ajudar a esclarecer alguns fenômenos que acontecem no início do câncer. O DNA do senhor será estocado e fará parte de um Banco de DNA, que ficará seguro no Laboratório de Mutagênese da Universidade Estadual de Londrina. O material biológico recolhido do senhor será utilizado nesta pesquisa e também poderá ser útil em outros trabalhos relacionados ao câncer. Asseguramos-lhe manter sigilo, fazendo uso da sua participação para a avaliação científica e possível publicação deste trabalho, dentro dos princípios éticos que devem ter a pesquisa e nossa profissão.

No caso de autorização, você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado conosco. Em caso de dúvida pode esclarecer com as próprias pesquisadoras: Ilce Mara de Syllos Cólus, Iara Sant'Ana Rodrigues e Hellen Kuasne, pelo telefone 3371.4608.

Agradecemos-lhe a valiosa colaboração.

Assinatura do pesquisador

Declaro que fui informado sobre a pesquisa e concordo participar

DATA: _____

Nome _____

Assinatura

ANEXO C

QUESTIONÁRIO PESSOAL

Por favor, leia as questões seguintes cuidadosamente e responda-as da forma mais completa e precisa possível. A informação que você der não será associada a seu nome em nenhum documento público, e será conhecida somente dos principais pesquisadores deste estudo. As informações que você der podem ter influencia direta na interpretação de nossos resultados, portanto, pedimos que coopere gentilmente, fornecendo informações corretas. Obrigado pelo interesse.

1- Nome: _____

último

primeiro

do meio

2- A ser preenchido pelo pesquisador:

Código: _____

Data: / /

Esta folha deve ser destacada do restante do questionário e preenchida pelo pesquisador. Somente o código será usado como identificação para as páginas subsequentes. Se for necessário espaço adicional para complementar a sua resposta, por favor escreva no verso da página e identifique a parte restante da questão com seu respectivo número.

Código n° _____

HISTÓRIA PESSOAL

1 - Registro hospitalar: _____

2- Sexo: () masculino

3- Qual a cor da sua pele?

Negro () Branco() Amarelo () Outros ()

4- Idade: a) 35 -50 anos. b) mais que 50 anos.

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 () 1° grau incompleto () 1° grau completo () 2° grau incompleto () 2° 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 (querosene, gasolina, solventes,...)	()sim	()não
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

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

() SIM () NÃO

Histórico de Saúde

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

() SIM () NÃO () não sabe Se SIM

() Hormônio

() Antiinflamatório

() Analgésicos

() Antipertensivos

() Anabolizantes

() Outros

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

() SIM () NÃO () não sabe

23- Você já foi submetido a cirurgia nos testículos?

() SIM () NÃO

Qual? _____

24- Você foi tratado anteriormente de algum tipo de câncer ? () SIM () NÃO

Qual? _____

25- Você tem antecedentes de câncer na sua família? () SIM () NÃO

26- Em casos de câncer na família, qual era o vínculo de parentesco?

() Pai () Mãe () Irmão () Filho () Tio () Primo () Outro

27- Qual foi a localização do tumor?

() Próstata () Mama () Outro (qual?) _____

28 Você já teve alguma doença sexualmente transmissível?

() SIM () NÃO

Se SIM, qual? _____

Histórico alimentar: (refira-se somente a hábitos freqüentes)

29- Você se alimenta apenas de vegetais? () SIM () NÃO

30- Você come carne? () SIM () NÃO

31- Se SIM, com que freqüência você come estes alimentos:

Dias/Semana

	1-2	3-4	5-6	Diariamente
Carne de gado	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()
Frango	()	()	()	()
Porco	()	()	()	()
Outros	()	()	()	()

Histórico genético

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

Incluir informações das amostras do tumor (localização, laudo histo-patológico):
