



Universidade  
Estadual de Londrina

---

HECTOR HUGO FURINI

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES  
DE VIAS DE MORTE, SOBREVIDA E PROLIFERAÇÃO CELULAR  
COM RECIDIVA BIOQUÍMICA DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

---

Londrina  
2022



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---



HECTOR HUGO FURINI

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES  
DE VIAS DE MORTE, SOBREVIDA E PROLIFERAÇÃO CELULAR  
COM RECIDIVA BIOQUÍMICA DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

---

Londrina  
2022

HECTOR HUGO FURINI

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES  
DE VIAS DE MORTE, SOBREVIDA E PROLIFERAÇÃO CELULAR  
COM RECIDIVA BIOQUÍMICA DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

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

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

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberta Losi Guembarovski

Londrina  
2022

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

Furini, Hector Hugo.

Estudo da associação de polimorfismos em genes de vias de morte, sobrevivência e proliferação celular com recidiva bioquímica do câncer de próstata / Hector Hugo Furini. - Londrina, 2022.  
94 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.

Coorientador: Roberta Losi Guembarovski.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Biomarcadores Moleculares - Tese. 2. Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) - Tese. 3. Biologia Molecular - Tese. 4. Câncer de Próstata - Tese. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos. II. Guembarovski, Roberta Losi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

CDU 575.1

HECTOR HUGO FURINI

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES  
DE VIAS DE MORTE, SOBREVIVÊNCIA E PROLIFERAÇÃO CELULAR  
COM RECIDIVA BIOQUÍMICA DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

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

**Banca Examinadora**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilce Mara de Syllos Cólus  
Universidade Estadual de Londrina – Londrina/PR

Prof. Dr. Glauco Akelington Freire Vitiello  
AC Camargo Cancer Center – São Paulo/SP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Mara Serpeloni  
Universidade Estadual de Londrina – Londrina/PR

Londrina, 23 de fevereiro de 2022.

## *Dedicatória*

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado” – Gandalf; Senhor dos Anéis: A Sociedade do Anel. J.R.R. Tolkien.

À minha família, em especial meu pai e meu irmão, que me deram apoio incondicional ao longo da minha vida. Aos meus amigos que sempre me fizeram rir e tornam a vida mais leve.

## **AGRADECIMENTOS:**

### **APOIO FINANCEIRO:**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio à ciência e pela concessão da bolsa.

### **APOIO INSTITUCIONAL**

À Universidade Estadual de Londrina (UEL), por fornecer toda estrutura e corpo docente para minha graduação e pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGGBM), pela administração e docentes que mantêm o Programa.

Ao Hospital do Câncer de Londrina (HCL), por todo apoio na execução desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS:

À **Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus**, por ter me acolhido no laboratório, me orientado como seu aluno e por transmitir seu grande conhecimento. Muito obrigado pelos momentos de alegria e risadas, assim como pelos puxões de orelha.

À **Dra. Roberta Losi Guembarovski**, por ter me apresentado o laboratório nos primeiros anos da graduação, onde eu aprendi muito e realizei meu TCC e o meu projeto de dissertação.

À **Dra. Juliana Mara Serpeloni**, por ser tanto amiga quanto professora. Muito obrigado por tudo!

À **Dra. Andréa Name Colado Simão**, que se dispôs a me atender e a auxiliar na realização desse trabalho.

Ao **Dr. Paulo Emílio Fuganti**, por todo conhecimento passado e disponibilidade para ajudar.

Aos **docentes e à administração** do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Aos meus pais **Laercio e Eliane**, por tudo que me passaram e me ensinaram ao longo da vida. Embora você tenha partido cedo mãe, muito do que eu sou hoje eu aprendi com você. E ao meu pai, **Laercio**, que me ensinou a confiar nas minhas escolhas e me apoiou durante toda carreira acadêmica.

Ao meu irmão **Jean** que, apesar das brigas e desentendimentos, sempre tentou me entender e me apoiar da forma que fosse. Hoje eu sei que eu sempre posso contar com você, e por isso, eu sou extremamente grato irmão!

A minha madrinha **Vilma Maria Furini Delalibera** e meu padrinho **Ricardo Delalibera**, que me acolheram no primeiro ano da graduação e que sempre me deram todo apoio que eu precisava para trilhar meu caminho. E aos seus filhos, meus primos, **Gabriela** e **Bruno** muito obrigado por serem como irmãos para mim.

A **Ms. Monyse de Nóbrega** que foi quem me adotou no laboratório, me ensinando todos os procedimentos e técnicas em seu conhecimento e me auxiliou na realização desse trabalho.

À **Dra. Marilesia Ferreira de Souza, Ms. Milene Roldão de Souza e Ms. Beatriz Mattos**, que padronizaram e realizaram a técnica no laboratório antes de mim e permitiram a realização desse trabalho.

Ao **Kevin S. de Souza Q. Fukushima**, aluno de iniciação científica que me apoiou e auxiliou durante a realização desse projeto.

Aos demais integrantes do **LAMON**, meu muito obrigado pelo companheirismo.

Aos meus amigos de longa data: **Luis Mineo, Matheus Vrech, Pedro Garrido, Fabio Fabiani**. Desde as piadas e brincadeiras, até nos momentos mais difíceis dividindo frustrações e tristezas, vocês estavam lá. Sou extremamente grato de ter vocês na minha vida!

Aos amigos da faculdade, em especial **Gabriela Weiss** pelo companheirismo e amizade. E à **Melissa Beltrame**, minha companheira de apartamento, por me aturar no dia a dia durante a quarentena.

A todos meus amigos do **Discord** pelas conversas e risadas jogando.

A todos os homens que aceitaram participar deste trabalho.

À todas as pessoas que contribuíram diretamente ou indiretamente para realização deste trabalho.

FURINI, H.Hector. **Estudo da associação de polimorfismos em genes de vias de morte, sobrevivência e proliferação celular com recidiva bioquímica do câncer de próstata**. 2022. **94**. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Londrina (PR), 2022.

## RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é a segunda neoplasia que mais acomete homens no Brasil. Indivíduos são submetidos a triagem para essa doença, como a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) e o toque retal. Nos últimos anos tem se intensificado a pesquisa por novos biomarcadores com maior potencial prognóstico para o CaP. O objetivo deste estudo foi avaliar variantes genéticas e um painel genético combinado dessas variantes com a presença de recidiva bioquímica em pacientes submetidos a prostatectomia com, em média, 7 anos de seguimento. Este foi um estudo de coorte, no qual participaram 197 pacientes diagnosticados com CaP. Foram analisadas 13 variantes: rs2279115 (*BCL-2*), rs26677604 (*CASP3*), rs1052571 (*CASP9*), rs11781886 (*NKX3-1*), rs2735343 (*PTEN*), rs2494750 (*AKT1*), rs2699887 (*PI3KCA*), rs3195676 (*AMACR*), rs17302090 (*AR*), rs2536 (*mTOR*), rs1695 (*GSTP1*), rs2308321 (*MGMT*) e rs1544410 (*VDR*). As variantes foram combinadas em painéis pela sua função, sendo que quatro vias principais foram definidas: morte celular, sobrevivência celular, receptores de crescimento e metabolismo. A genotipagem dos pacientes foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (qPCR). Como resultados, o alelo raro (G) do rs2308321 (gene *MGMT*) foi associado ao maior risco de recidiva ( $p = 0,036$ ) quando comparado ao alelo A no modelo alélico. Essa variante ocorre em um éxon do gene, e tem potencial para afetar a funcionalidade da proteína no reparo do DNA. Dos painéis de variantes analisadas, contudo, não observamos associação com a recidiva. No presente estudo observamos que a variante do gene *MGMT* pode afetar a recidiva bioquímica de pacientes com CaP.

**Palavras-chave:** gene *MGMT*, seguimento, SNP, PSA, recorrência.

FURINI, H.Hector. **Study of association between polymorphisms in genes of death pathways, survival and cell proliferation with biochemical recurrence of prostate cancer**. 2022. **94**. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Londrina (PR), 2022.

### **ABSTRACT**

Prostate cancer (PCa) is the second most frequent neoplasm in men in Brazil. Subjects undergo screening for this disease, such as prostate-specific antigen (PSA) testing and digital rectal examination. In recent years, the search for new biomarkers with greater prognostic potential for PCa has intensified. The aim of this study was to evaluate genetic variants and a combined genetic panel of these variants with the presence of biochemical recurrence in patients undergoing prostatectomy, with an average of 7 years of follow-up. This was a cohort study, in which 197 patients diagnosed with PCa participated. Thirteen variants were analyzed: rs2279115 (*BCL-2*), rs26677604 (*CASP3*), rs1052571 (*CASP9*), rs11781886 (*NKX3-1*), rs2735343 (*PTEN*), rs2494750 (*AKT1*), rs2699887 (*PI3KCA*), rs3195676 (*AMACR*), rs17302090 (*AR*), rs2536 (*mTOR*), rs1695 (*GSTP1*), rs2308321 (*MGMT*), and rs1544410 (*VDR*). The variants were combined into panels by function, and four main panels were defined: cell death, cell survival, growth receptors, and metabolism. Genotyping of patients was performed by real-time PCR. As a result, the rare allele (G) of rs2308321 (*MGMT*) was associated with a higher risk of recurrence ( $p = 0.036$ ) when compared to the A allele on the allelic model. This *MGMT* variant occurs in an exon of the gene, it has the potential to affect the functionality of the protein in the DNA repair. However, we did not observe any significant relation of the panels of variants analyzed. In the present study, we observed that the variant of *MGMT* gene can affect the biochemical relapse of patients with PCa.

**Keywords:** *MGMT* gene, *follow-up*, SNP, PSA, recurrence.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Fundamentação Teórica:

**Figura 1** – Mortalidade estimada por CaP no mundo de 2018 a 2040

**Figura 2** – Progressão do CaP

**Figura 3** – Ocorrência do PSA na corrente sanguínea em processo normal e neoplásico da próstata

**Figura 4** – Relação entre zonas da próstata e incidência do câncer

**Figura 5** – Representação da biópsia por agulha guiada por ultrassonografia

**Figura 6** – Graus de diferenciação histológica das células da próstata

**Figura 7** – Agrupamentos das somas de Gleason

**Figura 8** – Sistema de estadiamento TNM no CaP

**Figura 9** – Genes investigados neste estudo, suas variantes e respectivas regiões cromossômicas

### Manuscrito:

**Figura 1** – Recidiva acumulativa de CaP ao longo dos anos de seguimento (em meses) para o modelo alélico do rs2308321 (*MGMT*).

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

**Quadro 1** – Principais formas de tratamento do CaP e seus efeitos adversos

**Quadro 2** – Estratificação de D'Amico

### **Manuscrito:**

**Tabela 1** – Dados sociais e clínicos dos pacientes com câncer de próstata coletados ao diagnóstico e sua relação com a recidiva bioquímica

**Tabela 2** – Fatores prognósticos clínicos e laboratoriais dos pacientes com câncer de próstata coletados ao diagnóstico e sua relação com a recidiva bioquímica

**Tabela 3** – Associação das variantes genéticas com a presença ou não de recidiva bioquímica.

**Tabela 4** – Análise da associação de painéis de variantes de genes relacionados a receptores, metabolismo celular, sobrevivência e morte celular com a presença ou não de recidiva bioquímica

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AKT1</b>	Serina/Treonina cinase 1
<b>AMACR</b>	Alfa-Metil Coenzima A Racemase
<b>AR</b>	Do inglês, <i>Androgen Receptor</i>
<b>CaP</b>	Câncer de próstata
<b>HCL</b>	Hospital do Câncer de Londrina
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>ISUP</b>	Do inglês, <i>International Society of Urological Pathology</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NCI</b>	Do inglês, <i>National Cancer Institute</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCa</b>	Do inglês, <i>Prostate Cancer</i>
<b>PI3K</b>	Do inglês, <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
<b>PIP2</b>	Do inglês, <i>Phosphatidylinositol (4,5) – Bisphosphate</i>
<b>PIP3</b>	Do inglês, <i>Phosphatidylinositol (3,4,5) – Trisphosphate</i>
<b>PSA</b>	Do inglês, <i>Prostate Specific Antigen</i>
<b>PTEN</b>	Do inglês, <i>Phosphatase and Tensin Homologue</i>
<b>SNP</b>	Do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>SVN</b>	Do inglês, <i>Single Variant Nucleotide</i>
<b>TNM</b>	Classificação de tumores malignos (Tumor, Linfonodos e Metástase)
<b>TR</b>	Toque Retal
<b>UICC</b>	Do inglês, <i>Union for International Cancer Control</i>
<b>VA</b>	Vigilância Ativa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>17</b>
2.1. DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DO CaP .....	19
2.2. TRATAMENTO DO CaP.....	26
2.3. SEGUIMENTO DO PACIENTE E RECORRÊNCIA DO CÂNCER .....	28
2.4. VARIANTES GENÉTICAS NO CaP .....	32
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>4. MANUSCRITO .....</b>	<b>42</b>
4.1. RESUMO.....	43
4.2. INTRODUÇÃO .....	44
4.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	45
4.4. RESULTADOS .....	48
4.5. DISCUSSÃO .....	60
4.6. CONCLUSÃO.....	65
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>6. APÊNDICES.....</b>	<b>80</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>94</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A determinação do prognóstico do paciente com CaP é crucial para a escolha de um tratamento que seja apropriado, reduzindo o risco de sobretratamento nos casos de melhor prognóstico e subtratamento naqueles com tumores mais agressivos (WANG et al., 2018a).

A busca por novas ferramentas de diagnóstico e prognóstico que permitam prever a resposta do paciente ao tratamento, a probabilidade de recorrência do tumor e sua sobrevida, impulsionaram a pesquisa por biomarcadores que sejam de fácil acesso para o monitoramento contínuo dos pacientes, não ofereçam riscos e sejam baratos (COZAR et al., 2018).

Dentre os marcadores pesquisados, os polimorfismos têm se mostrado promissoras em desempenhar o papel de biomarcadores. A fácil detecção por meio da genotipagem a partir de material genético de linfócitos do sangue periférico, o aumento da flexibilidade para aplicação em diferentes doenças e o baixo custo da técnica são fatores determinantes na escolha deste tipo de marcador (NAKAGAWA et al., 2012). Além disso, o estudo de variantes genéticas como os polimorfismos permite um maior entendimento do funcionamento de genes, sua regulação e seu papel na manutenção da homeostase celular.

Dessa forma, esse trabalho visou o estudo de polimorfismos em genes com relação já pré-estabelecida no processo de tumorigênese e sua atuação na ocorrência de recidiva do câncer de próstata em pacientes previamente tratados de maneira curativa. Entre os genes estudados encontram-se variantes de genes cujas proteínas atuam na morte celular, metabolismo de xenobióticos, receptores de crescimento e manutenção da sobrevida celular.

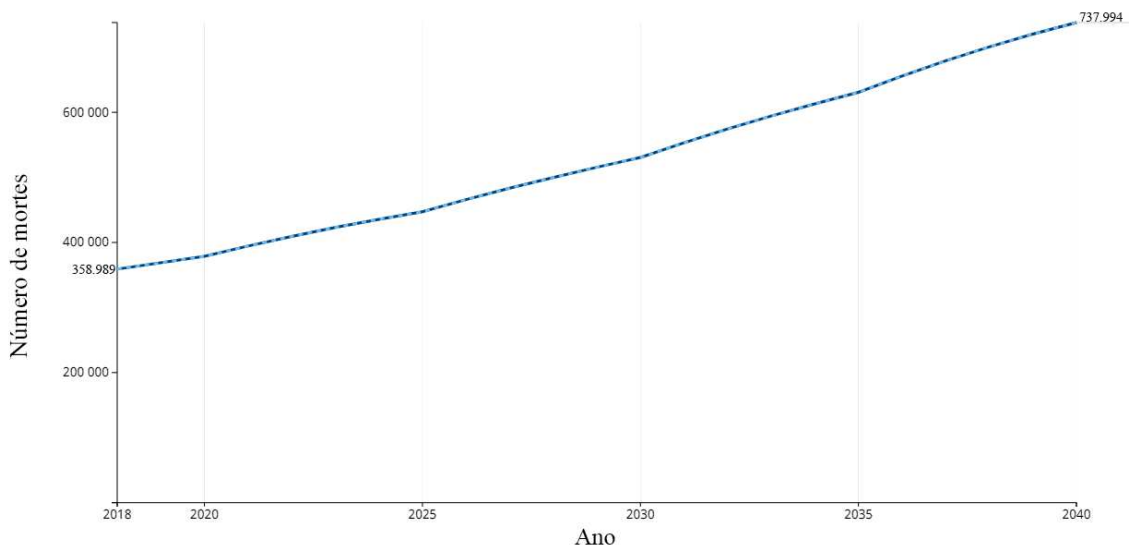
## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, contabilizado em cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018. É estimado que a mortalidade por câncer resulte em cerca de 16 milhões de mortes em 2040 (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2020). Durante as últimas décadas ocorreram grandes avanços nos estudos das neoplasias, entre eles destacam-se o desenvolvimento de novos tratamentos e exames mais precisos para diagnóstico precoce e determinação de prognóstico. Isto permitiu que ocorresse uma melhora na qualidade de vida de pacientes submetidos a procedimentos para o tratamento dessas doenças.

Dentre as neoplasias que acometem o homem, o câncer de próstata tem a segunda maior incidência no mundo, ficando atrás apenas do câncer de pulmão, desconsiderando-se o câncer de pele não melanoma. A *Global Cancer Statistics* estimou 1.356.176 novos casos de CaP no mundo todo para 2020, sendo que destes, 378.553 resultariam em óbito (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2020). Este mesmo instituto estima que a incidência desta neoplasia deve atingir 2.293.818 casos no mundo todo, e sua mortalidade duplique, atingindo 737.994 mortes por CaP no ano de 2040 (Figura 1). No Brasil, a mortalidade específica para o CaP foi de 18.161 mortes em 2020 e 41.368 mortes são estimadas para 2040 (GLOBOCAN, 2020).

Esse processo neoplásico acomete homens com idade avançada, sendo raro em homens com menos de 40 anos, e mais comum após os 55 anos de idade, onde sua incidência aumenta exponencialmente com os anos. Por ser caracterizado por crescimento lento e pouco sintomático, o diagnóstico pode ocorrer na sua fase tardia, dificultando o tratamento e reduzindo a sobrevida do paciente (MYDLO; GODEC, 2015; PERNAR et al., 2018).

**Figura 1:** Mortalidade estimada por câncer de próstata no mundo de 2018 a 2040



Fonte: Traduzido de *Global Cancer Statistics*, 2020

Com o aumento da expectativa de vida sua incidência tende a aumentar devido à relação da doença com o envelhecimento da população masculina (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2020b). Este aumento na incidência do CaP tende a ser maior nas regiões mais desenvolvidas do mundo, como América do Norte, Europa e Austrália. Isto, em parte, reflete o maior acesso à saúde e educação nestes países, resultado do maior número de indivíduos que buscam o serviço de saúde, diagnosticando sua doença mais rapidamente, e ao aumento pronunciado na expectativa de vida dos indivíduos (REBBECK, 2017). O cuidado médico e a contabilização de casos variam geograficamente, tornando difícil fazer inferências sobre a relação entre ancestralidade, etnia, posição geográfica, agressividade e risco do CaP baseando-se apenas em evidências epidemiológicas (REBBECK, 2017).

A idade, como citado, é um fator de risco para o CaP, visto que homens mais velhos têm maior chance de serem diagnosticados com tumores de alto risco, além de apresentarem uma sobrevida menor. O risco aumenta significativamente depois dos 50 anos para homens brancos que não têm histórico familiar de CaP; e também para homens negros acima de 40 anos ou, independente da cor da pele, para homens que têm parentes próximos com CaP. Como resultado disso, a idade também influencia na escolha do tratamento

(DANIYAL et al., 2014; PERNAR et al., 2018). A partir de resultado de estudo observacional de homens idosos com doença em estágio inicial, Ruchlin e Pellissier (2001) sugeriram como opção viável de tratamento, um manejo conservador. Stangelberger et al. (2008), em uma revisão da literatura, consideraram razoável suspender a terapia ativa em pacientes idosos com câncer de próstata bem ou moderadamente diferenciado, evitando, assim, os riscos associados e impacto na qualidade de vida dos pacientes.

O histórico familiar também é determinante para risco de desenvolvimento do tumor de próstata. Quanto mais próximo o parentesco com homens que desenvolveram CaP, maior o risco do indivíduo desenvolver esta neoplasia maligna. Homens com parentesco de primeiro grau com outro homem que desenvolveu CaP têm um risco 50% maior de desenvolver CaP em algum momento da vida (BARBER et al., 2018; REBBECK, 2017).

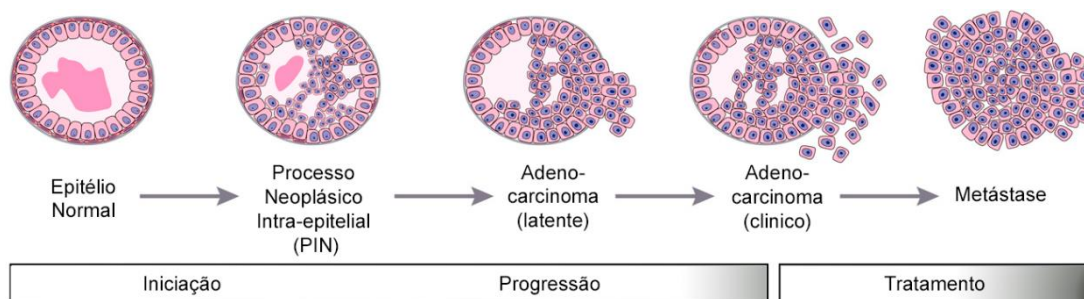
Quanto à ancestralidade, homens africanos apresentam maior mortalidade para CaP, enquanto homens asiáticos apresentam os menores índices de morte por esta neoplasia. O mesmo vale para incidência, onde homens negros são mais acometidos do que brancos, sendo os asiáticos os que apresentam menor incidência. Esta diferença não está apenas associada à suscetibilidade genética mas também a estilo de vida e fatores ambientais (PERDANA et al., 2016). Uma hipótese para a variação da doenças entre ancestralidades é que ela está relacionada com níveis hormonais, onde homens negros por apresentarem maiores níveis de testosterona que homens brancos e asiáticos têm maior chance de apresentarem a neoplasia (CUZICK et al., 2014). Outros fatores como exposição a doenças sexualmente transmissíveis, obesidade, tabagismo, etilismo, vasectomia, exposição ocupacional a agroquímicos e dieta parecem afetar de alguma forma o risco para o desenvolvimento de CaP (PERNAR et al., 2018).

## **2.1. DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DO CAP**

O processo de transformação maligna do tecido prostático possui diversos estágios, iniciando com um processo neoplásico intra-epitelial (PIN), seguido por crescimento para um CaP localizado, progressão para um adenocarcinoma de próstata avançado, culminando na invasão da cápsula prostática e consequente

metástase (Figura 2) (WANG et al., 2018b).

**Figura 2:** Progressão do câncer de próstata.



Fonte: Traduzido de (SHEN, ABATE-SHEN, 2010)

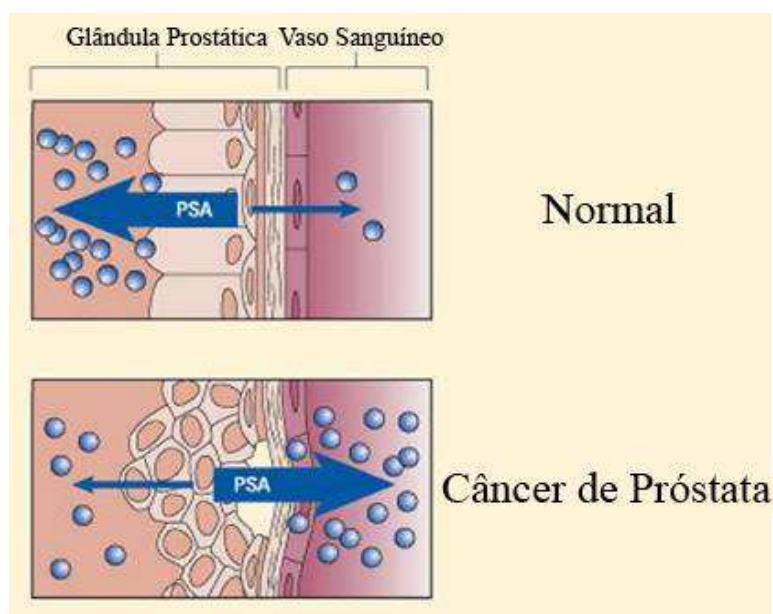
Geralmente durante as fases iniciais do processo patológico do CaP os pacientes podem não apresentar sintomas, ou apresentarem sintomas não severos, o que não os estimula à busca por serviço médico. Além disso, a resistência da população masculina em buscar o serviço de atendimento, combinada com a falta de conhecimento sobre a doença no Brasil, leva a um diagnóstico tardio quando a doença já se encontra em fase avançada e de difícil tratamento, acometendo geralmente pacientes mais idosos, que possuem outras comorbidades (MIGOWSKI; SILVA, 2010a).

A triagem populacional para o CaP é divergente no mundo todo, não existindo um consenso sobre quando deve ser realizada para detecção precoce do tumor, sendo aplicada na maioria dos casos por demanda espontânea do paciente ou pela idade avançada (HUGOSSON et al., 2010; MIGOWSKI; SILVA, 2010a; SANDBLOM et al., 2011; TOURINHO-BARBOSA; POMPEO; GLINA, 2016a). A triagem inicial é feita pela dosagem sérica do Antígeno Prostático Específico (PSA), uma proteína produzida por células normais e tumorais da próstata, usada como indicativo de anormalidades da próstata quando sua concentração no sangue encontra-se superior a 4 (quatro) ng/mL (PERNAR et al., 2018). O processo neoplásico prostático causa desorganização na estrutura do epitélio normal da próstata, facilitando a passagem do PSA produzido pelas células da próstata para a corrente sanguínea. Associado a isso, as células malignas da próstata podem apresentar maior produção de PSA (Figura 3).

Apesar de apresentar o melhor custo/benefício, o uso do exame de PSA

possui vieses, visto que atualmente sabe-se que, além da presença de células malignas, vários fatores, como processos infecciosos ou inflamatórios na próstata podem influenciar na variação deste antígeno, tornando-o um teste pouco específico para CaP (MARTIN et al., 2012a).

**Figura 3:** Ocorrência do antígeno prostático específico (PSA) na corrente sanguínea em processo normal e neoplásico de próstata humana



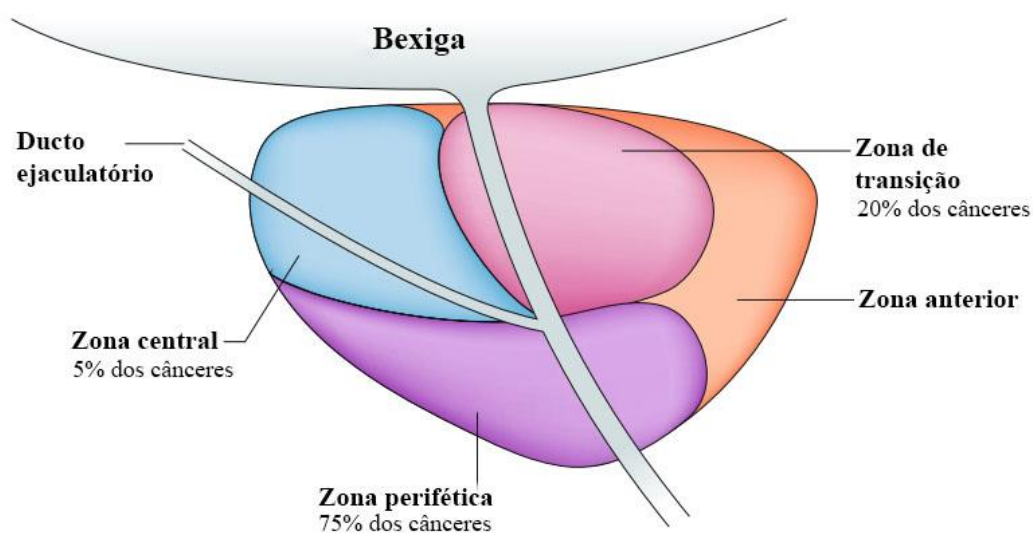
Fonte: Adaptado de (DONOHUE, 2021)

Quando adotado como exame diagnóstico, o teste do PSA levou a um aumento nas taxas de detecção de CaP. No entanto, muitos dos tumores diagnosticados eram indolentes e não agressivos, o que causou um excesso de tratamento de homens que não precisariam passar por esse processo, visto que seus tumores poderiam nunca evoluir. Nos 10 anos após a adoção do teste como diagnóstico, mais de 90% dos pacientes com CaP de baixo risco passaram por terapias radicais, como prostatectomia e radioterapia (GARISTO; KLOTZ, 2017a).

Como o PSA é considerado um teste de baixa especificidade quando utilizado isoladamente, muitas organizações de saúde recomendam, para o diagnóstico, a associação dele a outros testes, como o toque retal (TR). Nessa triagem, o médico apalpa a zona periférica da próstata (Figura 4), o que permite

a ele sentir quaisquer variações na superfície e textura do órgão que possam indicar proliferação celular maligna (WALSH et al., 2014a). Apesar dessa região ser a mais acometida por CaP, o teste não é capaz de detectar tumores presentes em outras áreas da próstata que não sejam a zona periférica (WALSH et al., 2014b). Além disso, diversas questões socio-culturais levam a uma certa resistência por parte da população masculina quanto à realização deste exame (TOURINHO-BARBOSA; POMPEO; GLINA, 2016b).

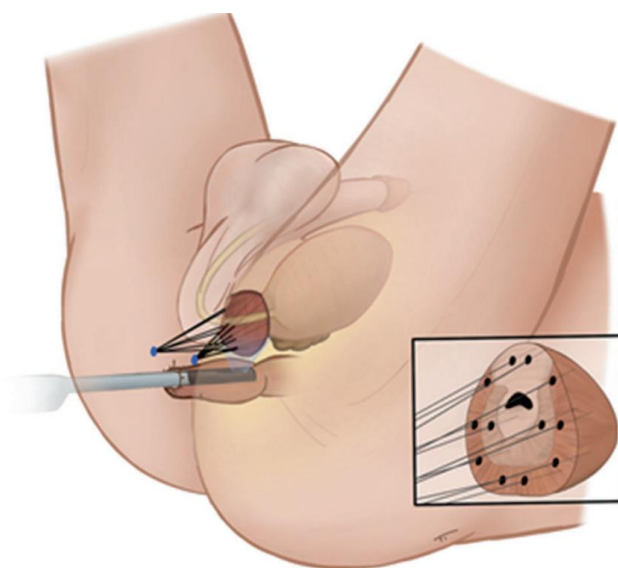
**Figura 4** – Relação entre zonas da próstata e incidência de câncer de próstata



Fonte: Traduzido de (SATHIANATHEN, KONETY, et al., 2018)

A confirmação da suspeita de CaP é efetivada por meio de biópsia com agulha guiada por ultrassonografia (Figura 5). A retirada de fragmentos de diversas zonas do tecido prostático possibilita a análise histopatológica das células por microscopia de luz, seguindo os critérios da *International Society of Urological Pathology* (ISUP), sendo o escore de Gleason o parâmetro desta análise que estabelece o diagnóstico final e o direcionamento do tratamento (GHAI; TOI, 2012).

**Figura 5** – Representação da biópsia por agulha guiada por ultrassonografia



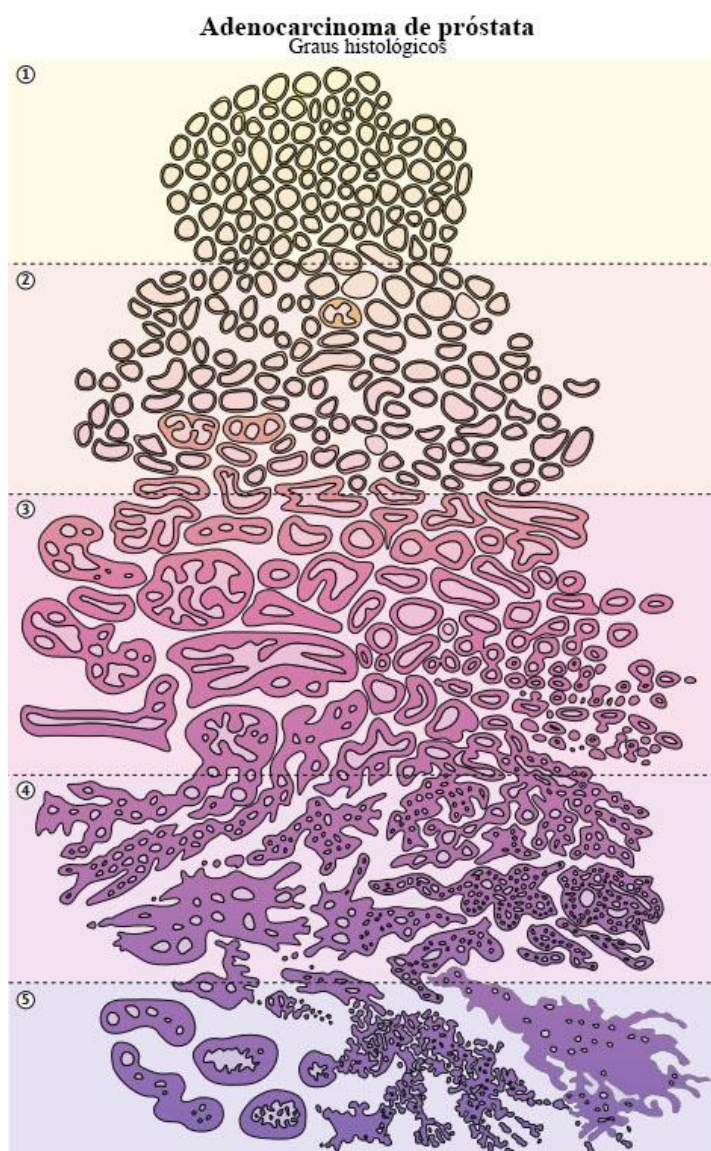
Na imagem podemos observar a sonda introduzida através do reto do paciente para a identificação da próstata e auxílio da coleta de fragmentos. A coleta é realizada com agulha onde células de diversas zonas, como indicado na imagem, são aspiradas. Fonte: (WETTERAUER et al., 2020)

O sistema de graduação de Gleason para o diagnóstico histopatológico por microscopia de luz, proposto originalmente por Donald Gleason e Mellinger em 1974, foi refinado ao longo dos anos, e continua sendo utilizado no diagnóstico até hoje para definir a agressividade dos tumores de próstata (WANG et al., 2018a).

A análise da arquitetura tecidual dos fragmentos obtidos na biópsia permite classificá-los em graus que variam de 1 a 5, sendo 1 para tecido mais diferenciado (melhor prognóstico) e 5 para tecido menos diferenciado (pior prognóstico) (Figura 6). A partir desses valores é calculado o escore de Gleason (GLEASON, 1992), que varia de 2 a 10 (VANACORE et al., 2017).

A classificação sofre uma variação dependendo do procedimento utilizado. Nas biópsias o escore é calculado pela adição da graduação mais prevalente (padrão primário) com a graduação de mais alto grau (padrão secundário). Em amostras de prostatectomia radical o escore é calculado pela adição do padrão mais prevalente com o segundo mais comum (EPSTEIN et al., 2015a).

**Figura 6** – Graus de diferenciação histológica do câncer de próstata

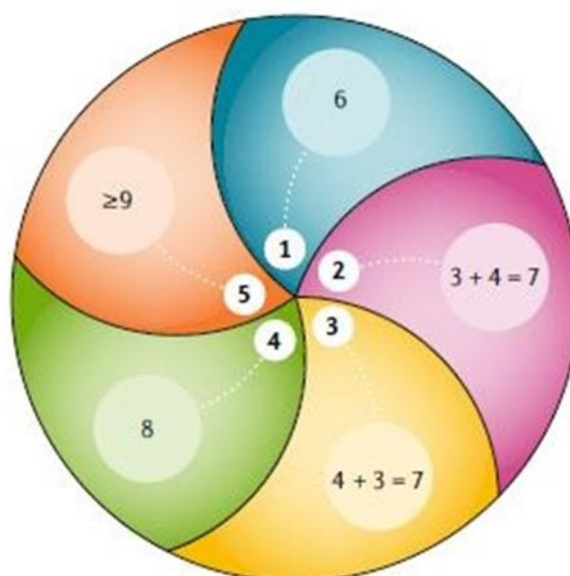


Os graus de diferenciação estão em ordem crescente, onde (1) indica tecido com arquitetura bem organizada e de bom prognóstico, e (5) indica tecido com arquitetura pouco organizada e de pior prognóstico. Fonte: Traduzido de (SATHIANATHEN, KONETY, et al., 2018)

O sistema de graduação utilizado nos dias atuais foi estabelecido pela *International Society of Urological Pathology* (ISUP) e adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (EPSTEIN et al., 2015b). Nesse sistema são considerados o *gleason score* (GS), ou seja, o resultado direto da soma dos graus de Gleason e o *gleason group* (GG), que agrupa os GS em diferentes

graus de Gleason. De acordo com essa classificação (Figura 7), os graus 1 e 2 são considerados alterações precoces, não representando tumores, e por isto foram retirados do cálculo do escore e da classificação. Dessa forma, o escore varia de no mínimo GS6 (3+3)=6 (GG1) até GS10 (5+5)=10 (GG5) (HUMPHREY et al., 2016; VAN LEENDERS et al., 2020). Um escore GG1 se refere a tumores de baixo grau, já tumores com escore GG2 e GG3 são classificados como intermediários, visto que podem resultar da soma (3+4) (GG2) ou (4+3) (GG3), sendo este último, o de pior prognóstico, pois a graduação predominante (4) é mais agressiva que a outra (3), apesar de ambos serem GS7 (VAN LEENDERS et al., 2020). Tumores GG4 e GG5 são classificados como de alto grau.

**Figura 7 – Agrupamentos das somas de Gleason**



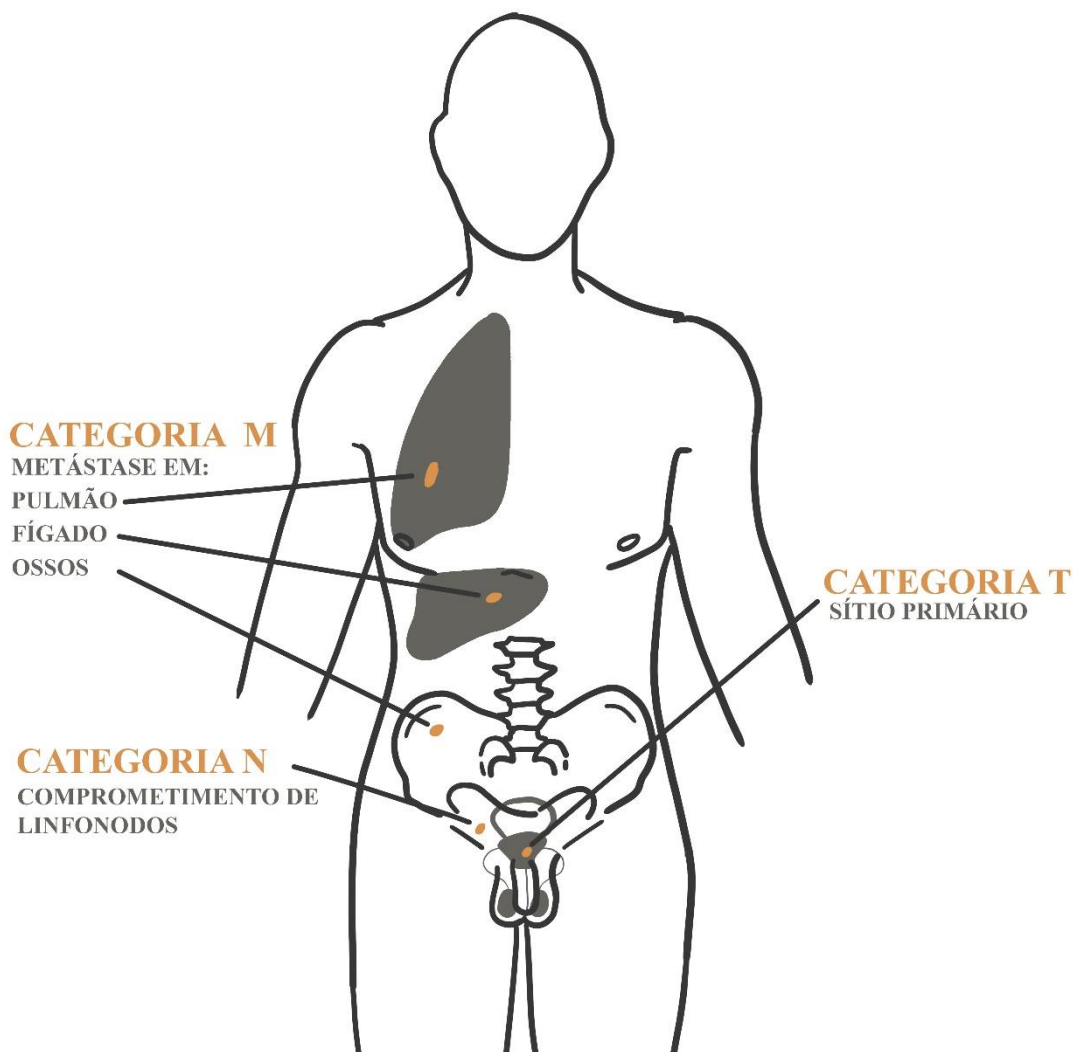
Tecidos com o padrão celular 3 são agrupados como GG1; tecidos com predominância padrão 3, mas com padrão secundário 4, são agrupados como GG2; tecidos em que padrão 4 domina e o padrão 3 é secundário, são agrupados como GG3; o tumor com escore de Gleason 8 é classificado como GG4; e padrão  $\geq 9$  é agrupado como GG5.

Fonte:(SATHIANATHEN, KONETY, et al., 2018)

Outro critério utilizado para avaliação de tratamento e da progressão do tumor é o sistema de estadiamento patológico estabelecido pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC, 2010). De acordo com este sistema, conhecido como estadiamento TNM (Figura 8), é possível avaliar o tumor localmente avançado com o auxílio de exames de imagem, levando-se em consideração características do tumor primário (T), variando de T0 a T4,

comprometimento dos linfonodos (N), variando de N0 (ausente) a N1 (presente), e a existência de metástase (M), que varia de M0 (ausente) a M1 (presente) (SHUKLA et al., 2015), onde Tx, Nx e Mx significam a não avaliação.

**Figura 8** – Sistema de estadiamento de tumor, linfonodos e metástase (TNM) no câncer de próstata



Fonte: O autor

## 2.2. TRATAMENTO DO CaP

Existem diversos protocolos utilizados no tratamento do CaP. Dependendo dos resultados dos exames diagnósticos e sintomas apresentados pelo paciente, o tratamento pode variar entre o uso de medicamentos, hormonioterapia e radioterapia, até procedimentos cirúrgicos como a

prostatectomia radical (retirada de toda próstata) e orquiectomia (retirada dos testículos) (Quadro 1) (SASSE et al., 2017a).

Quando o tumor encontra-se dentro da cápsula prostática, as formas de tratamento mais utilizadas são monitoramento ativo para progressão, radioterapia e prostatectomia radical. O monitoramento é recomendado para pacientes que possuem CaP diagnosticado como indolente, ou seja, que apresenta características indicativas de não progressão. Dessa forma o paciente pode passar por testes de triagem em intervalos de tempo recomendados pelo médico. A radioterapia e a prostatectomia radical são procedimentos utilizados caso o tumor seja mais agressivo ou esteja em um estágio inicial, porém, com progressão rápida (LITWIN; TAN, 2017a).

Os tratamentos variam bastante em caso de pacientes com tumor que está evadindo a cápsula prostática, aplicando-os de acordo com a expectativa de vida do paciente e com os *guidelines* da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN). Em geral é considerado o risco de metástase, e recomenda-se a hormonioterapia combinada com procedimentos cirúrgicos, como prostatectomia radical e orquiectomia, sendo esta última para casos mais graves, onde já foi constatada a metástase (LITWIN; TAN, 2017b). A hormonioterapia e orquiectomia se baseiam, respectivamente, no bloqueio hormonal e na redução da produção hormonal (SASSE et al., 2017b). A resposta do CaP aos hormônios foi observada primariamente por Huggins e Hodges em 1941, reportando que a castração levava à regressão do tumor de próstata em pacientes acometidos pela doença (WANG et al., 2018a). Logo a terapia de privação hormonal foi estabelecida visando a redução de hormônios, como a testosterona, que podem promover proliferação celular; seu bloqueio, portanto, tem como objetivo a redução da progressão tumoral (SASSE et al., 2017b). A resistência da neoplasia à terapia de privação hormonal pode resultar em tumores resistentes à castração (CRPC) (WANG et al., 2018a).

**Quadro 1** – Principais formas de tratamento do câncer de próstata e seus efeitos adversos

Tratamento	Ação	Efeitos Adversos
Prostatectomia	Remove o sítio primário juntamente com a próstata	Incontinência urinária, disfunção erétil e infertilidade
Quimioterapia	Tem como alvo células com rápida proliferação, incluindo células do tumor que metastizaram para os ossos	Perda de cabelo, fragilidade óssea, distúrbios do sistema nervoso como confusão, dor de cabeça e náuseas
Terapia Hormonal	Reduz o nível dos andrógenos responsáveis pelo crescimento do tumor de próstata	Disfunção erétil, ondas de calor e perda óssea
Radioterapia	Reduz o crescimento do tumor através do bombardeamento de radiação em um alvo específico	Disfunção erétil, diarreia, sangramento retal e desconforto para urinar e defecar
Tratamentos ósseos	Reduz perda óssea e fraturas, alivia a dor do câncer metastático em ossos	Cansaço, diarreia, náusea e fraqueza

Fonte: O autor

### 2.3. SEGUIMENTO DO PACIENTE E RECORRÊNCIA DO CÂNCER

Em tradução livre do inglês, *follow-up* é uma expressão que significa acompanhar ou fazer o acompanhamento. De acordo com o *Oxford Dictionary of English*, em um contexto médico a palavra significa “um exame profundo ou observação de um paciente para monitorar o resultado de um tratamento anterior” (OXFORD, 2019).

O principal objetivo do seguimento dos pacientes após o tratamento do CaP é a detecção precoce de uma recorrência do câncer, permitindo, dessa forma, que um tratamento mais rápido e eficaz seja aplicado, buscando a

melhora da sobrevida do paciente (D'UGO et al., 2013a). Outros objetivos incluem identificar o resultado do tratamento e as complicações relacionadas ao pós-tratamento e coletar dados sobre o histórico do câncer (NILSSON, 2017). Diretrizes internacionais recomendam o acompanhamento pós-operatório para a maioria dos cânceres, mesmo que o papel do acompanhamento na melhora de sobrevida não tenha sido completamente esclarecido para todos os tumores (AURELLO et al., 2017a).

Estima-se que cerca de 20 a 50% dos pacientes com CaP terão recidiva do CaP em até cinco anos após o primeiro tratamento. Assim, após o tratamento primário, esses são monitorados por meio de testes de triagem, como o PSA e TR. Elevações no PSA podem indicar o reaparecimento ou progressão do tumor (MCDONALD et al., 2015a). É esperado que o nível de PSA sérico caia rapidamente a valores indetectáveis após uma prostatectomia, e a partir disso seja rotineiramente avaliado de acordo com seu estadió e a expectativa de vida do paciente (LOBLAW et al., 2017a).

A recidiva do CaP pode ser tanto uma recorrência localizada ou uma metástase distante do sítio primário da doença (MAY et al., 2016a). Na suspeita de recidiva, testes diagnósticos podem ser utilizados para avaliar a localização e o estado da recorrência para que o tratamento possa ser planejado (LOBLAW et al., 2017b).

O critério mais utilizado na clínica para determinar a recorrência de CaP é chamado de recidiva bioquímica. Ela ocorre quando pacientes apresentam uma redução no nível do PSA após o tratamento, e depois de determinado período este valor de PSA volta a subir. O aumento de PSA  $>0,2$  ng/mL e um segundo aumento confirmatório  $>0,2$  ng/mL (ou um único aumento  $>0,4$  ng/mL) é sugestivo de recidiva bioquímica (COOKSON et al., 2007a). Apesar da prostatectomia ser realizada com intuito curativo, recidiva bioquímica ocorre em 20 a 40% dos homens após prostatectomia radical (FREEDLAND et al., 2005a). Infelizmente não existe um consenso sobre quais testes diagnósticos devem ser utilizados na ocorrência de uma recidiva bioquímica (LOBLAW et al., 2017b).

A recidiva bioquímica é associada com o aumento da chance de necessidade de um tratamento secundário, o que tem impacto direto na qualidade de vida do paciente (SWINDLE; KATTAN; SCARDINO, 2003). É interessante esclarecer que pacientes com recidiva bioquímica podem não

apresentar evidência clínica da recorrência do tumor nos exames que dispomos hoje. Porém, este é o critério utilizado para indicação da necessidade de pós-tratamento (VAN DEN BROECK et al., 2020).

Em estudos de fatores prognósticos clínicos, a recidiva bioquímica e o estadiamento do tumor (pós-tratamento) são os desfechos mais utilizados para análise. Outros como metástases e mortalidade específica não são muito utilizados, pois demandam um longo tempo de acompanhamento (MIGOWSKI; SILVA, 2010b).

As diferentes recomendações estabelecidas para o monitoramento de pacientes são baseadas na existência de poucas evidências científicas ou de nenhuma evidência devido à falta de estudos sobre esse assunto (D'UGO et al., 2013b). Devido a isto mais pesquisas sobre o seguimento de pacientes que tiveram câncer têm sido realizadas (AURELLO et al., 2017b; FREEDLAND et al., 2005b; LOBLAW et al., 2017b; MAY et al., 2016b; MCDONALD et al., 2015b). Em câncer colorretal e câncer de mama, estudos randomizados e de meta-análises demonstraram um aumento de sobrevida associado à detecção de recorrências por acompanhamento intensivo, quando comparados com pacientes que tiveram a recorrência identificada no estado sintomático (RENEHAN et al., 2002; SMITH et al., 1999).

De acordo com D'Amico *et al.* (1998), o risco de recorrência para o CaP após o tratamento inicial pode ser calculado por meio de três características histopatológicas e clínicas que o tumor apresenta ao diagnóstico: nível do PSA, escore de Gleason e estadiamento TNM. Cada um destes parâmetros gera uma pontuação que, quando somadas, resulta no risco de recidiva, um possível prognóstico para o paciente. Após cinco anos, a chance do tratamento inicial falhar é menor que 25% em pacientes com baixo risco, varia de 25 a 50% para os de risco intermediário e é maior que 50% para aqueles de alto risco (D'AMICO et al., 1998a). A estratificação de D'Amico pode ser exemplificada no Quadro 2.

**Quadro 2** – Estratificação de D’Amico para cálculo do risco pós-tratamento de recidiva bioquímica do câncer de próstata

	<b>Pontuação</b>
<b>PSA</b>	
<10 ng/mL	+1
10-20 ng/mL	+2
>20 ng/mL	+3
<b>Escore de Gleason</b>	
≤6	+1
7	+2
≥8	+3
<b>Estadiamento</b>	
T1-T2a	+1
T2b	+2
≥T2c	+3
<b>Resultado da soma</b>	
Risco baixo	3
Risco intermediário	4-6
Risco alto	≥7

Fonte: Adaptado de D’Amico *et al.*, (1998)

Atualmente, a partir do estudo de D’Amico, foram desenvolvidos diversos nomogramas sobre o risco de recidiva para CaP. Esses nomogramas são modelos matemáticos que usam algoritmos que incorporam diversas variáveis, como características patológicas ao diagnóstico, estágio clínico, nível de PSA, características do tratamento e do acompanhamento do paciente, que possibilitam calcular uma probabilidade prognóstica quanto ao risco de recorrência do tumor, auxiliando tanto o paciente quanto o médico na seleção de tratamento que ofereça a melhor perspectiva para o paciente (BROCKMAN *et al.*, 2015; GRACIELE P. SILVEIRA *et al.*, 2021).

Assim, estudos de acompanhamento auxiliam no estabelecimento de prognóstico e sobrevida de pacientes após o tratamento, podendo contribuir para a escolha terapêutica de acordo com o perfil do tumor, e com o desenvolvimento de testes de triagem e diagnóstico capazes de realizar a detecção precoce do câncer, possibilitando o tratamento antecipado e a melhora na sobrevida de

pacientes com CaP (AURELLO et al., 2017b; LOBLAW et al., 2017b).

#### **2.4. VARIANTES GENÉTICAS NO CAP**

O *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI) define biomarcador como uma molécula biológica identificada no sangue ou outros fluídos do corpo, que pode ser medida e avaliada por um ensaio, como um indicativo de algum processo patológico ou condição anormal (NCI, 2019). Diversos biomarcadores vêm sendo propostos para complementação dos testes de triagem e diagnóstico do CaP, dentre eles, a expressão e polimorfismos de alguns genes são promissores, não apenas como marcadores de prognóstico, mas também apresentam potencial para revelar possíveis alvos terapêuticos (HUANG et al., 2017). Dentre os polimorfismos, os SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphisms*) têm sido aplicados em pesquisas como possíveis marcadores prognósticos para colaborar na escolha e predição do resultado do tratamento (GUO et al., 2016; SUN et al., 2010; TANG et al., 2016; WANG et al., 2012).

Polimorfismos são definidos como mutações genéticas presentes em pelo menos 1% de uma determinada população, cuja frequência não é explicada por mutação recorrente. Se a frequência for menor que 1%, a alteração é considerada uma mutação rara (BALDING, 2006). Entre os diferentes tipos de polimorfismos, existe a classe INDEL (Inserção/Deleção), que resulta da inserção ou da deleção de um ou mais nucleotídeos no DNA (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016). A adição ou deleção de pares de bases dentro de uma sequência codificadora pode causar mudanças na matriz de leitura do gene e, conseqüentemente, alterar a expressão da proteína (PIERCE, 2016).

Um tipo de polimorfismo muito estudado são os SNPs. Estes representam uma variação no DNA onde apenas um nucleotídeo (A, T, C ou G) sofre uma troca na sequência gênica, podendo ou não alterar a funcionalidade do gene em que está inserido. Os SNPs são os polimorfismos mais comuns nos seres humanos; desta forma, apresentam-se como possíveis candidatos a marcadores genéticos. Podem associar-se a uma característica específica, sendo usados para estudos de suscetibilidade, diferenças nas respostas a tratamentos e prognóstico de doenças (GIBSON; MUSE, 2009).

Apesar de SNPs em regiões codificantes terem o potencial de alterar a

estrutura da proteína e sua função, alterações de nucleotídeos em regiões não codificantes também podem afetar mecanismos celulares importantes, como a regulação epigenética do gene, levando a maior ou menor expressão do gene ou a ligação de miRNAs que interferem na tradução do RNAm. Um exemplo é o rs2279115 do gene *BCL-2*, que será abordado mais detalhadamente à frente, onde a alteração do nucleotídeo ocorre em uma das regiões promotoras do gene. A alteração nessa região afeta a regulação dos promotores do gene causando alteração na sua expressão (NUCKEL et al., 2007a).

Nos parágrafos seguintes serão abordadas resumidamente as funções dos genes cujos SNPs foram objeto de estudo do presente trabalho. Os genes estudados estão inseridos dentro de vias celulares importantes no processo de tumorigênese, como morte celular, metabolismo de xenobióticos e manutenção da sobrevivência da célula. Esses polimorfismos foram selecionados para o estudo devido às suas relevâncias na literatura e por serem objeto de pesquisa no laboratório (LAMON).

Genes supressores de tumor (do inglês, *Tumor Suppressor Genes*, TSGs) são genes que regulam negativamente a proliferação tumoral, pois suas proteínas resultantes geralmente servem como inibidores da proliferação celular ou indutores de morte celular, evitando o desenvolvimento do câncer. Quando ocorre uma mutação nesses genes pode ocorrer perda total ou redução da função da sua proteína, dando lugar a um crescimento celular descontrolado (VELEZ; HOWARD, 2015).

O gene *PTEN* (do inglês, *Phosphatase and Tensin Homolog*), localizado no cromossomo 10 (10q23), é um supressor tumoral investigado no estudo do CaP, pois encontra-se inserido em uma das principais vias de sinalização que atuam na manutenção e sobrevivência das células. O SNP do gene *PTEN* (rs2735343) localiza-se em uma região não codificante e resulta na substituição de uma guanina por uma citosina. Esta modificação pode alterar a expressão da proteína devido a mudanças nos sítios de *splicing*, e interferir na regulação da proliferação celular, acarretando no desenvolvimento tumoral (JANG et al., 2013). Um estudo demonstrou que esse SNP aumentou a eficácia da radioterapia e a sobrevivência de pacientes com câncer de pulmão em portadores do alelo G em comparação com portadores do alelo C, sugerindo que este polimorfismo pode ser utilizado como um marcador para prognóstico e sobrevivência

de pacientes pós-tratamento (WANG et al., 2016a).

Nosso grupo de pesquisa investigou a associação de diferentes SNPs com suscetibilidade de pacientes desenvolverem CaP e também com parâmetros histopatológicos (NÓBREGA et al., 2020). Foi observada, para os portadores de variantes raras de determinados genes, associação com pior prognóstico, quando combinadas entre si. As combinações do genótipo CG do gene *PTEN* (rs2735343) com os genótipos GG do gene *AMACR* (rs3195676) e com os alelos G ou A do gene *AR* (rs17302090), por exemplo, foram associadas com presença de extensão extracapsular (NÓBREGA et al., 2020).

O gene *mTOR* (do inglês, *Mammalian Target of Rapamycin*), localizado no cromossomo 1 (1p36.22) codifica dois complexos distintos que atuam na sinalização celular, o mTORC1 e o mTORC2, sendo que ambos complexos estão presentes na via *PI3K/AKT*. A função do complexo mTORC1 tem caráter anabólico, promovendo síntese de lipídios, proteínas, nucleotídeos e bloqueando processos catabólicos. Dessa forma, ele auxilia na proliferação e crescimento celular, podendo ser associado à oncogênese (LAPLANTE; SABATINI, 2013; SHIMOBAYASHI; HALL, 2014). O SNP (rs2536) está localizado em uma região intrônica do gene *mTOR*, onde ocorre a troca de uma timina por uma citosina, que afeta diretamente o sítio de ligação de miRNAs que regulam a expressão do gene (ZINING et al., 2016). Tendo em vista seu papel na via *PI3K/AKT*, e podendo atuar como oncogene, é importante a investigação deste gene como um marcador prognóstico para CaP.

O gene *PI3KCA* (Fosfoinosítideo 3-quinase), localizado no cromossomo 3 (3q26.32), quando mutado atua como um oncogene (WANG et al., 2016b). A proteína PI3K age como um transdutor de sinal de fatores de crescimento, levando a maior sobrevida celular. O SNP rs2699887 do gene *PI3KCA* localiza-se na região 3' UTR (do inglês, *3' untranslated region*), onde há uma troca de guanina por adenina; essa alteração no gene pode interferir na sua expressão e influenciar na carcinogênese (LIN et al., 2015). Pacientes com câncer de pulmão com genótipo heterozigoto GA para este polimorfismo apresentaram maior taxa de sobrevida e melhor resposta ao tratamento de radio-quimioterapia (WANG et al., 2016b) a. No CaP o genótipo GG de *PI3KCA*, quando combinado com o alelo A do polimorfismo rs17302090 no gene *AR*, foi associado com proteção contra bilateridade do tumor (NÓBREGA et al., 2020). Assim, dependendo da presença

de determinadas variantes genéticas, este gene pode prover informações sobre o prognóstico de pacientes.

O gene *AKT1* (do inglês, *Alpha Serine/Threonine-Protein Kinase*), localizado no cromossomo 14 (14q32.33), é um proto-oncogene que atua na viabilidade e proliferação celular, tendo seu papel principal na inibição da apoptose, progressão da célula no ciclo celular e diferenciação celular. Este gene codifica a proteína AKT, que dentre outras funções atua no metabolismo da glicose, angiogênese e diversas vias celulares (HERS; VINCENT; TAVARÉ, 2011). O SNP rs24947500 do gene *AKT1* localiza-se na região 5' UTR (do inglês, *5' untranslated region*) e caracteriza-se pela troca de uma guanina por uma citosina. Um ensaio demonstrou que chineses portadores do genótipo GG para este SNP apresentaram maior mortalidade para CaP do que pacientes com os outros genótipos (KARYADI et al., 2015). Um estudo do nosso grupo de pesquisa com pacientes com CaP mostrou que a combinação do genótipo CC do gene *AKT1* (rs24947500) com GA do gene *AMACR* (rs3195676) ou com o alelo A do gene *AR* (rs17302090) foi associada com proteção para invasão de vesícula seminal e bilateridade do tumor (NÓBREGA et al., 2020). Dessa forma, a investigação desse gene como um marcador de prognóstico para CaP é interessante, dado o seu papel ainda não totalmente definido na agressividade do tumor.

A proteína AR (do inglês, *Androgen Receptor*) é um receptor de andrógenos que possui importante papel no crescimento e diferenciação da próstata normal, e está associada também ao desenvolvimento e progressão do CaP. A função deste receptor é regular a expressão de genes ligados à proliferação celular quando ativado por hormônios como testosterona e dihidrotestosterona (DHT) (LONERGAN; TINDALL, 2011). O gene *AR* localiza-se no cromossomo X (Xq11-12), e codifica o receptor de andrógenos. O SNP rs17302090 está presente na região promotora do gene, e parece levar a um pior prognóstico aos pacientes que fazem tratamento à base de hormônios (LINDSTROM et al., 2007). No entanto, o alelo prevalente (A) deste gene foi associado com proteção para agressividade do tumor e desenvolvimento de CaP de alto risco, sugerindo uma possível associação deste SNP com a resposta ao tratamento dos pacientes (NÓBREGA et al., 2020).

O gene *AMACR* (Alfa Metilacil CoA Racemase), localizado no

cromossomo 5 (5p13.2), é geralmente expresso em órgãos como rim, fígado, glândulas salivares, vesícula biliar e próstata. A AMACR é um enzima peroxissomal e mitocondrial envolvida na biossíntese e beta-oxidação de ácidos graxos provenientes da dieta (WRIGHT et al., 2011). O metabolismo de ácidos graxos representa um processo chave, capaz de alterar diversas vias e características celulares, incluindo sinalização da célula (LIU, 2006).

Na próstata, a análise da enzima AMACR é reconhecida como um marcador de tecido tumoral, pois foi estabelecido que esta proteína pode diferenciar casos benignos de malignos (MARTIN et al., 2012b). Contudo, até o presente momento não foi estudada qual a fase do desenvolvimento tumoral em que AMACR está envolvida e nem sua influência na sobrevida e resposta de pacientes ao tratamento. O SNP rs3195676 presente no éxon 1 deste gene caracteriza a mudança de uma guanina por uma adenina no códon 9, levando à substituição de uma valina por metionina na proteína. Um estudo envolvendo um grupo de coreanos portadores de CaP mostrou um aumento na suscetibilidade para pacientes portadores do alelo G (LEE et al., 2013). Os genótipos GA ou GA+AA do gene *AMACR*, tanto quando analisados individualmente quanto associados com outros genes, foram associados com proteção para invasão de vesícula seminal no CaP. Além disto, neste mesmo estudo, o genótipo GG foi relacionado com maior risco para ocorrência de extensão extracapsular (NÓBREGA et al., 2020).

A família das caspases é composta por proteases baseadas em cisteína, cujo papel fundamental é a transdução de sinais e apoptose. Essas enzimas podem ser ativadas de várias formas, respondendo a diversos estímulos por meio da formação de complexos para causar morte celular durante o processo de apoptose (HYMAN; YUAN, 2012). O genoma humano codifica 12 caspases diferentes, sendo as caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 e 12 denominadas de caspases iniciadoras, pois são responsáveis por responder a estímulos pró-apoptóticos e ativar as chamadas caspases executoras (3, 6 e 7) (LI; YUAN, 2008; LI; SHENG, 2012).

O gene *CASP3*, presente no cromossomo 4q34, codifica a enzima caspase 3 que participa ativamente no processo de apoptose. A *CASP3* é ativada pelas caspases iniciadoras 8, 9 e 10, tanto pela via intrínseca quanto extrínseca da apoptose (GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2012). Um estudo

clínico avaliou a capacidade de prever recidiva bioquímica após prostatectomia radical, onde concluiu-se que alterações na expressão de caspases contribuem para o comportamento mais agressivo do tumor de próstata, sugerindo que o estudo da caspase 3 pode ajudar a identificar pacientes com CaP mais agressivo (RODRÍGUEZ-BERRIGUETE et al., 2015).

O SNP rs4647603 está presente na região 5' UTR do gene *CASP3*, e resulta na troca de uma citosina por uma timina, alterando assim, a transcrição do gene e afetando a expressão do mesmo (CHEN et al., 2008). Mittal et al. (2012) avaliaram a associação deste SNP com o risco aumentado para CaP, constatando que este contribui para uma maior suscetibilidade para a doença. Até o presente momento não existem dados analisando a associação deste SNP com desfechos pós-tratamento de pacientes com CaP.

A caspase 9, codificada pelo gene *CASP9*, encontra-se no cromossomo 1 (1p36.21) e atua unicamente na via intrínseca da apoptose. Segundo a literatura, alterações na ativação ou na expressão desta enzima estão relacionadas com o desenvolvimento da doença, progressão do tumor, além de contribuir para resistência a tratamentos para certos tipos de cânceres, como ovário e leucemia (WÜRSTLE; LAUSSMANN; REHM, 2012). O SNP rs1052571 presente no gene *CASP9* resulta na troca de uma guanina por uma adenina, alterando a expressão deste gene. Um estudo desta variante encontrou associação entre o alelo prevalente G com menor progressão do tumor em pacientes com CaP (YILMAZ et al., 2017).

O gene *BCL-2* (do inglês, *B-cell lymphoma 2*) localiza-se no segmento cromossômico 18q21.3; é um proto-oncogene que codifica uma proteína presente na membrana externa das mitocôndrias, responsável por regular os processos de proliferação e apoptose (AKL et al., 2014). Sua principal função é a inibição da apoptose, prolongando a sobrevivência celular, de modo que as células permaneçam nas fases G0/G1 do ciclo celular (MARTIN et al., 2003). Uma superexpressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 contribui para formação e progressão de tumores, além da resistência a tratamentos. Tendo em vista essa relação do gene *BCL-2* com vários tipos de câncer, ele se tornou alvo de pesquisas sobre marcadores moleculares para o tratamento desta doença (HARAZONO; NAKAJIMA; RAZ, 2014).

O polimorfismo rs2279115 do gene *BCL-2* representa a troca de uma base

única, citosina por adenina, localizada na segunda região promotora (P2) do gene. Essa região tem papel inibitório sobre a primeira região promotora (P1), atuando como um elemento regulador negativo que reduz a expressão do gene. A alteração causada pelo SNP afeta a funcionalidade de P2 resultando no aumento da expressão de *BCL-2* (NUCKEL et al., 2007b). Moul *et al.* (1996) analisaram o uso da proteína BLC-2 como um marcador clínico em tumor primário de próstata e recorrência do câncer após prostatectomia radical, e concluíram que a superexpressão dessa proteína está associada negativamente com sobrevida dos pacientes, tornando-se um indicador de mau prognóstico (MOUL et al., 1996a).

O gene *NKX3-1* (do inglês, *NK3 Homeobox 1*) é um supressor tumoral regulador de andrógeno, localizado no cromossomo 8p21.2, e expresso predominantemente na próstata. Sua principal função é atuar como regulador do desenvolvimento embrionário, agindo por meio da interação com outros genes em um efeito cascata para formação de tecidos (KRISTIANSEN, 2012a). A perda da função desse gene está relacionada com a formação de carcinomas na próstata (ABATE-SHEN; SHEN; GELMANN, 2008), além de apresentar associação com tumores de alto grau, sugerindo que este possa ser um marcador prognóstico para o câncer (KRISTIANSEN, 2012b). O SNP rs11781886 apresenta alteração de uma citosina por uma timina na região 5' UTR, que causa a baixa expressão de *NKX3-1* (NCBI, 2019). Autores já relacionaram a atividade de *NKX3-1* com os genes *PTEN* e *AR* em processos de CaP (ANDERSON et al., 2012; KIM et al., 2002; SONG et al., 2009; TAN et al., 2012).

O gene *GSTP1* (do inglês, *Glutathione S-Transferase Pi 1*), localizado no cromossomo 11, codifica sua proteína que atua como uma enzima metabolizadora de fase II. Em um estudo *in vitro*, células de CaP com *GSTP1* inativo, quando expostas a condições de estresse crônico, mostraram-se mais vulneráveis a alterações genéticas (HENRIQUE; JERÓNIMO, 2004). O rs1695 do gene *GSTP1* representa a troca de uma adenina por uma guanina na sequência de DNA. Pacientes portadores do alelo A apresentaram risco duas vezes maior que portadores da variante GG de desenvolverem CaP. O risco era cinco vezes maior quando o alelo A estava em homozigose em comparação com GG (SANTRIC et al., 2020). Contudo, outro estudo mostrou que pacientes com

maior risco para CaP de alto grau, portadores do genótipo GG (rs1695), apresentaram maiores níveis de PSA e tumores mais agressivos do que portadores de GA e AA (OSKINA et al., 2014). Portanto, o papel desta alteração no desenvolvimento e progressão do CaP permanece obscuro e a elucidação da atuação deste gene no tumor de próstata pode auxiliar no estabelecimento do prognóstico do paciente.

O gene *MGMT* (do inglês, *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*) localizado no cromossomo 10, codifica uma proteína importante na participação em processos de regulação epigenética de diferentes genes e no reparo do DNA. Sua proteína tem a principal função de reparar danos no DNA, participando de diversas vias enzimáticas importantes na determinação da sobrevivência celular (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2019). Já foi relatado que baixos níveis de *MGMT* nas células tumorais foram relacionados ao maior sucesso de terapias anticâncer, principalmente quimioterápicas. Já o maior nível, da mesma forma, foi relacionado a maior resistência das células tumorais a terapia (SHARMA et al., 2009). O rs2308321 deste gene é caracterizado pela substituição de uma adenina por uma guanina na sequência do gene, modificando o códon original e causando uma mudança de isoleucina para valina na proteína. Um estudo demonstrou que a presença da alteração estava relacionada ao óbito específico por CaP (FITZGERALD et al., 2018). Dado seu papel, este SNP pode apresentar atuação na progressão do CaP e no prognóstico dos pacientes, por isto, sua relação com o CaP precisa ser mais bem estudada.

O gene *VDR* (do inglês, *Vitamin D3 Receptor*), localizado no cromossomo 12, codifica a proteína receptora de vitamina D3 nas células. Diferentes variantes genéticas têm sido estudadas associando o CaP a este gene (DAREMIPOURAN et al., 2019a). O SNP rs1544410 representa a substituição de uma citosina por uma timina em um íntron do gene. Um estudo de 2019 em homens africanos mostrou que portadores da alteração do gene *VDR* tinham níveis mais altos de PSA e alto grau de escore de Gleason (DAREMIPOURAN et al., 2019b). Todavia, uma meta-análise de estudos caso-controle incluindo estudos que analisaram o risco de desenvolvimento associado a este polimorfismo não observou associação entre rs1544410 e CaP (JINGWI et al., 2015a). Dada a relação desta variante com altos níveis de PSA e escore de Gleason (JINGWI et

al., 2015b), a atuação desta variante na progressão e recorrência do tumor ainda permanece desconhecida, justificando seu estudo.

Dessa forma, há indícios de que as variantes genéticas de nucleotídeo único apresentadas podem afetar a recidiva bioquímica do câncer de próstata, auxiliando ou inibindo a manutenção do tumor após o tratamento primário. Um estudo que visa investigar todas essas variantes em diferentes vias relevantes para o processo de tumorigênese é de grande relevância e pode fornecer uma previsão de risco para a ocorrência da recidiva bioquímica em pacientes com esta neoplasia maligna.

**Figura 9** – Genes investigados neste estudo, suas variantes e respectivas regiões

Gene	Variante	Região	
<i>CASP3</i>	rs4647603	5' UTR	<b>Via de Morte Celular</b>
<i>CASP9</i>	rs105271	3' UTR	
<i>BLC-2</i>	rs2279115	Região Promotora	
<i>NKX3-1</i>	rs11781886	5'UTR	
<i>MGMT</i>	rs2308321	Éxon	
<i>AKT1</i>	rs24947500	5' UTR	<b>Via de Sobrevida</b>
<i>PI3KCA</i>	rs2699887	3' UTR	
<i>mTOR</i>	rs2536	3' UTR	
<i>PTEN</i>	rs2735343	Íntron	
<i>VDR</i>	rs1544410	Íntron	<b>Receptores</b>
<i>AR</i>	rs17302090	Região Promotora	
<i>GSTP1</i>	rs1695	Éxon	<b>Metabolização</b>
<i>AMACR</i>	rs3195676	Éxon	

Fonte: O autor

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação de variantes genéticas em genes envolvidos em diferentes vias celulares e suas combinações, com a presença de recidiva bioquímica em pacientes submetidos a prostatectomia para tratamento de CaP.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

➤ Determinar as frequências alélicas e genotípicas das variantes genéticas dos genes *BCL-2* (rs2279115), *CASP3* (rs26677604), *CASP9* (rs1052571), *NKX3-1* (rs11781886), *PTEN* (rs2735343), *AKT1* (rs2494750), *PI3KCA* (rs2689887), *AMACR* (rs3195676), *AR* (rs17302090), *mTOR* (rs2536), *GSTP1* (rs1695), *MGMT* (rs2308321) e *VDR* (rs1544410) em pacientes com 5 anos ou mais de seguimento após prostatectomia radical.

➤ Agrupar os genes de acordo com suas respectivas vias de atuação ou por proximidade de função, e realizar análises isoladas e combinadas dos SNPs em relação à recidiva bioquímica.

➤ Comparar dados sociodemográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes de acordo com a presença ou não de recidiva bioquímica.

#### 4. MANUSCRITO

Estudo de associação de polimorfismos de nucleotídeo único relacionados com diferentes vias celulares com a recidiva bioquímica do câncer de próstata

Hector Hugo Furini<sup>1</sup>, Kevin Santiago de Souza Quenzo Fukushima<sup>1</sup>, Monyse de Nóbrega<sup>1</sup>, Marilesia Ferreira de Souza<sup>1</sup>, Milene Roldão Souza Rodrigues<sup>1</sup>, Beatriz Bocatte de Mattos<sup>1</sup>, Roberta Losi Guembarovski<sup>1</sup>, Paulo Emílio Fuganti<sup>2</sup>, Andrea Name Colado Simão<sup>3</sup>, Tamires Flauzino<sup>3</sup>, Ilce Mara de Syllos Cólus\*<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Mutagênese e Oncogenética, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

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

<sup>3</sup> Laboratório de Pesquisa em Imunologia Aplicada, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

\* Autor correspondente: Ilce Mara de Syllos Cólus

Tel: +55 43 3371-5149

Endereço de e-mail: [ilcecolus@gmail.com](mailto:ilcecolus@gmail.com)

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

#### 4.1. RESUMO

As vias de morte, sobrevivência, crescimento e metabolismo celular apresentam influência significativa na tumorigênese, proliferação e manutenção do câncer. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem alterar estas vias, afetarem a resposta ao tratamento primário e propiciar a remissão do tumor. A genotipagem destes polimorfismos pode, portanto, fornecer informações sobre o prognóstico dos pacientes, assim como seu risco de recidiva para o câncer tratado. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação de variantes genéticas de genes da via de morte celular (*CASP3*, *CASP9*, *NKX3-1*, *MGMT* e *BCL-2*), de sobrevivência (*PTEN*, *AKT1*, *PI3KCA* e *MTOR*), de metabolismo (*GSTP1* e *AMACR*) e receptores de andrógenos (*VDR* e *AR*), com o risco de recidiva bioquímica do câncer de próstata (CaP). Para tal, os pacientes (n=197) foram acompanhados por, em média 7 anos, pelos registros médicos e a ocorrência da recidiva bioquímica foi estabelecida a partir dos níveis séricos de PSA, onde aumentos sucessivos nas dosagens podem ser indicativos de recidiva. A genotipagem dos polimorfismos foi realizada através de *Quantitative Real-Time PCR* utilizando o sistema de sondas por hidrólise, primers adequados para cada SNP e seguindo as orientações do fabricante. Como resultado, o rs2308321 (*MGMT*) apresentou associação significativa com a recidiva bioquímica do CaP no modelo alélico, onde portadores do alelo raro G (p= 0,036) tiveram maior risco de recidiva bioquímica do que portadores do alelo A. Esse resultado demonstra o potencial desse polimorfismo como marcador e também que ele possui papel na ocorrência de recidiva do CaP. O rs2308321 ocorre em um éxon do gene, onde altera o códon de tradução, afetando a proteína final. Das demais combinações de variantes analisadas, não observamos associação significativa com a recidiva bioquímica do CaP.

## 4.2. INTRODUÇÃO

Desde o final do século XX, o PSA é o marcador de escolha mais utilizado para o acompanhamento de pacientes com remissão do tumor de próstata após o tratamento primário (ALY; WIKLUND; GRÖNBERG, 2011; D'AMICO et al., 1998b). Posteriormente, esse marcador começou a ser utilizado na estratificação de risco, mostrando resultados satisfatórios na identificação de pacientes com tumores mais agressivos (GARISTO; KLOTZ, 2017b). Contudo, a sua especificidade para diferenciar a agressividade do tumor é limitada, estimulando a busca por marcadores de prognóstico capazes de complementar a análise do PSA na estratificação de risco e auxiliar na tomada de decisões clínicas (MARTIN et al., 2012a).

Ally *et al.* (2011) afirmaram em seu artigo de revisão, que marcadores biológicos, especialmente as alterações genéticas associados com agressividade do tumor de próstata, são valiosas ferramentas na individualização do tratamento.

Diversas alterações em genes já foram relacionadas com a ocorrência de câncer de próstata (CaP) onde foram relacionadas a suscetibilidade ao tumor (NÓBREGA et al., 2020), prognóstico (COZAR et al., 2018) e recorrência (CUCCHIARA et al., 2018), modificando mecanismos de sobrevivência e morte, que fazem com que uma célula se torne instável geneticamente, muitas vezes perdendo sua função, e entrando em um estado de “imortalidade”, característico de células tumorais (NASSAR; BLANPAIN, 2016).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), vêm sendo estudados quanto à sua relação com o processo carcinogênico. Individualmente, o papel dos SNPs na predição da suscetibilidade para tumor maligno de próstata pode não ser grande. Contudo, a combinação de diversas variantes em um perfil genotípico de vias relacionadas pode apresentar resultados importantes quanto ao entendimento do estudo dos genes tanto quanto ao da neoplasia (ALY; WIKLUND; GRÖNBERG, 2011; COZAR et al., 2018; CUCCHIARA et al., 2018).

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel de SNPs em genes com atuação importante nas vias celulares associadas à recidiva do CaP, e propor SNPs individuais ou um painel de SNPs que possam ser relevantes para uso futuro na rotina clínica e auxiliem na pesquisa sobre os genes.

### 4.3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO, SEGUIMENTO DOS PACIENTES E DETERMINAÇÃO DA RECIDIVA BIOQUÍMICA

Este foi um estudo longitudinal de coorte, em que foram selecionados 197 homens da região de Londrina, sul do Brasil, diagnosticados com CaP e submetidos a prostatectomia radical no Hospital do Câncer de Londrina (HCL, Paraná, Brasil) durante o período de 2006 a 2015, para investigação de recorrência do tumor.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE19769913.0.0000.5231) (Anexo A). Todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) e responderam a um questionário autodeclarado modificado de Carrano e Natarajan (Apêndice B) (CARRANO; NATARAJAN, 1988). Dados sociais, clínicos e laboratoriais foram obtidos por consulta médica e questionário.

A ocorrência ou não de recorrência do tumor foi determinada por meio de consultas periódicas aos prontuários do HCL, tendo sido incluídos no estudo pacientes que recidivaram até 10 anos após a realização da prostatectomia, sendo a média de tempo de seguimento de aproximadamente sete anos.

O critério utilizado para a indicação da recorrência do tumor foi a recidiva bioquímica através do antígeno prostático específico (PSA), conforme indicado pelas diretrizes da EAU (*European Association of Urology*). Um aumento de 0,2 ng/mL e um segundo aumento confirmatório de 0,2 ng/mL (ou um único aumento de 0,4 ng/mL) nos níveis séricos de PSA em relação ao PSA nadir (nível de PSA mais baixo alcançado após o tratamento primário) foram considerados como recidiva bioquímica do CaP (COOKSON et al., 2007b; VAN DEN BROECK et al., 2020). O valor do PSA foi monitorado por meio da consulta aos prontuários médicos. O risco de recorrência de D'Amico para cada paciente foi estimado a partir dos valores de PSA, escore de Gleason e do estadiamento TNM ao diagnóstico (D'AMICO, WHITTINGTON, et al., 1998). Todos os pacientes passaram por um procedimento de prostatectomia radical com intuito curativo.

Dessa forma, foram considerados na análise estatística os pacientes cujas análises histopatológicas apresentaram margens cirúrgicas comprometidas ou não após o procedimento.

Os dados de recidiva bioquímica dos nossos pacientes foram comparados com o risco de recidiva proposto por D'Amico. Para isso, o risco de D'Amico foi categorizado, seguindo os dados já estabelecidos (D'AMICO et al., 1998b), criando uma somatória para cada parâmetro de análise, que resulta em um número que categoriza o risco de recidiva do paciente como baixo, intermediário ou alto

Todos os dados de seguimento dos pacientes coletados a partir dos prontuários médicos no HCL foram revisados e realizada a tabulação para realização da análise estatística.

#### **4.3.2 AMOSTRAGEM E ANÁLISE GENOTÍPICA**

Após confirmação do diagnóstico de CaP por análise histopatológica, o sangue dos pacientes foi coletado por punção intravenosa em tubos com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). As amostras foram centrifugadas e a camada intermediária de leucócitos (*buffy coat*) foi transferida para microtubos de 1,5mL, que foram armazenados a -20°C até a extração do material genético. A coleta de sangue intravenoso e a extração do material genético foi realizada por nosso grupo de pesquisa no período de 2006 a 2015 e o material genético foi armazenado a -80°C.

O DNA genômico foi extraído a partir da camada de leucócitos do sangue periférico, utilizando-se o kit de extração *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche®; Indianapolis, IN, USA) segundo as orientações do fornecedor e quantificado em Nanodrop 2000 UV-Vis *Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) nos comprimentos de onda 260/280nm para determinar a pureza do ácido nucleico; sendo consideradas puras as amostras com razão entre 1,8 e 2,0. Cada amostra foi codificada e as informações dos indivíduos permanecem em sigilo.

De cada paciente foram genotipados 13 SNPs, sendo cada um deles validado nos bancos de dados públicos (*Database of Single Nucleotide Polymorphisms/NCBI*, 2021). Os SNPs avaliados foram: rs2279115 (*BCL-2*), rs26677604 (*CASP3*), rs1052571 (*CASP9*), rs11781886 (*NKX3-1*), rs2735343

(*PTEN*), rs2494750 (*AKT1*), rs2699887(*PI3KCA*), rs3195676 (*AMACR*), rs17302090 (*AR*), rs2536 (*mTOR*), rs1695 (*GSTP1*), rs2308321(*MGMT*) e rs1544410 (*VDR*). A técnica utilizada para genotipagem foi *Real Time* qPCR com sondas TaqMan® (*Applied Biosystems*) através de sistema de hidrólise, *genotyping Master Mix* (*Applied Biosystems*; Foster City, CA, USA) e 5 ng/mL de DNA genômico, seguindo as recomendações do fabricante, e utilizando o termociclador *PrimeQ Real-Time TECHNE*®.

As genotipagens foram realizadas no laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina no período de 2009 a 2020. O material genético utilizado neste estudo foi previamente utilizado em estudos caso-controle realizados em nosso laboratório. (FERREIRA DE SOUZA; CÓLUS, 2013; SOUZA; CÓLUS, 2017; MATTOS; CÓLUS, 2019; NÓBREGA et al., 2020).

#### 4.3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar a associação dos fatores sociais com a recidiva bioquímica, os dados foram avaliados pelo teste de regressão de Cox e considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ . Sempre que foi avaliada a relação dos dados com a recidiva bioquímica, foram inseridos os dados de margem cirúrgica e tempo para ocorrência de recidiva para o ajuste do modelo estatístico.

Também foi avaliada a associação do escore de D'Amico (calculado a partir dos dados obtidos dos pacientes) com a ocorrência de recidiva bioquímica. Para isto, o risco foi avaliado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os resultados foram expressos em mediana e percentis (25%-75%) e foi considerado significativo quando  $p \leq 0,05$ .

Dados prognósticos coletados dos prontuários dos pacientes ao diagnóstico como o estadiamento do tumor, escore de Gleason, lateralidade do tumor, extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, perineural ou de linfonodo foram testados quanto a sua relação com a recidiva bioquímica. Para tal, utilizamos regressão de Cox por idade e tempo de seguimento, onde os resultados foram expostos como razão de risco com intervalo de confiança de 95%, e considerados estatisticamente significativos aqueles com  $p \leq 0,05$ .

Para determinar associações entre os genótipos e a recidiva bioquímica e entre as combinações dos genótipos de múltiplos SNPs com recidiva, foi realizada regressão de Cox, ajustado pela idade dos pacientes, ocorrência de comprometimento da margem cirúrgica, e também considerando-se o tempo para a ocorrência da recidiva durante o seguimento. Foi calculada a razão de risco (*Hazard Ratio*) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) e consideradas as diferenças estatisticamente significativas para  $p \leq 0,05$ . Para as combinações, utilizamos a combinação de variantes com maior frequência para cada painel como referência para a análise estatística. Combinações com frequência inferior a 1% foram desconsideradas das análises combinadas devido às suas raridades e decréscimo de poder estatístico (SOLE, GUINÓ, *et al.*, 2006). Todas estas análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SPSS versão 22.0 (IBM EUA).

#### 4.4. RESULTADOS

Os dados sociais e clínicos coletados dos pacientes e sua relação com a recidiva bioquímica estão apresentados na Tabela 1.

Os pacientes que compuseram a amostra desse estudo (n=197) apresentaram idade entre 47-84 anos com média de  $65 \pm 7$  anos ao diagnóstico. Destes, 92 apresentaram recidiva bioquímica após, no mínimo, um ano de seguimento pós-prostatectomia. A idade dos pacientes ( $p=0,162$ ) não foi associada com recidiva bioquímica na análise de regressão. Porém, o valor de PSA ao diagnóstico ( $p=0,022$ ) foi estatisticamente significativo em relação à recidiva bioquímica. Dos pacientes que apresentavam PSA maior que 10 (pior prognóstico) 60,47% apresentaram recidiva bioquímica nos anos de seguimento, enquanto dos pacientes que apresentavam PSA entre 4 e 10 (melhor prognóstico), apenas 35,64% apresentaram recidiva no mesmo seguimento.

A maior parte dos indivíduos da amostra (n = 165) se autodeclarou caucasiano. Não houve relação significativa entre a presença de recidiva bioquímica e os parâmetros alfabetização, tabagismo, etilismo, realização de vasectomia, parentes com histórico de tumor ou parentes que já tiveram tumor

de próstata, infecções sexualmente transmissíveis e diagnóstico de outros tumores malignos além do de próstata.

Tabela 1 – Dados sociais e clínicos dos pacientes com câncer de próstata coletados ao diagnóstico e sua relação com a recidiva bioquímica

Dados sociais e clínicos		Recidiva Bioquímica	
		n (Recidiva%)	p
Idade ao diagnóstico	≤64	87 (42,5%)	1
	≥65	110 (50,0%)	0,162
Ancestralidade	Caucasiano	165 (46,1%)	1
	Não caucasiano	32 (50,0%)	0,948
Alfabetização	Superior completo	29 (48,3%)	1
	2º Grau completo ou incompleto	125 (46,4%)	0,843
	Analfabeto	41 (43,9%)	0,901
Tabagismo	Não Fumante	151 (45,7%)	1
	Fumante	46 (50,0%)	0,796
Etilismo	Não etilista	103 (52,4%)	1
	Etilista	94 (40,4%)	0,660
Vasectomia	Não vasectomizado	191 (46,6%)	1
	Vasectomizado	4 (50,0%)	0,702
Parentes com câncer	Não	83 (49,4%)	1
	Sim	117 (43,6%)	0,955
Parentes com CaP	Não	72 (45,8%)	1
	Sim	39 (41,0%)	0,074
PSA ao diagnóstico	Menor que 4	9 (44,4%)	1
	De 4 a 10	101 (35,6%)	<b>0,022</b>
	Maior que 10	86 (60,5%)	0,728
ISTs	Não	174 (47,1%)	1
	Sim	22 (45,4%)	0,244
Outro tumor	Não	127 (50,2%)	1
	Sim	11 (48,9%)	0,844

Dados expressos como número absoluto (%). Regressão de Cox. Não foi possível avaliar os parâmetros para todos os pacientes. Antígeno Prostático Específico (PSA); Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs); Câncer de Próstata (CaP). Fonte: O Autor

Fatores de prognóstico para o câncer de próstata, como extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal e escore de Gleason da

prostatectomia apresentaram associação estatisticamente significativa com recidiva bioquímica. O escore de Gleason da biópsia apresentou uma tendência para associação com recidiva bioquímica do CaP (Tabela 2).

O estadiamento do tumor apresentou maior risco para recidiva ( $p=0,014$ ) quando os pacientes apresentavam estadiamento de pior prognóstico (pt3 e pt4). Já o comprometimento da margem cirúrgica foi associado a maior ocorrência de recidiva bioquímica (Tabela 2). Na Tabela 2 ainda estão expostos os demais resultados da análise de associação dos parâmetros prognósticos com a presença ou ausência de recidiva bioquímica nos pacientes.

Tabela 2 – Fatores prognósticos clínicos e laboratoriais dos pacientes com câncer de próstata coletados ao diagnóstico e sua relação com a recidiva bioquímica

Dados clínicos e laboratoriais		n (Recidiva%)	Razão de Risco (IC95%)	p
Gleason da biópsia	3 - 7 (3+4)	164 (43,9%)	Referência	1
	7 (4+3) - 10	32 (62,5%)	1,530 (0,858 - 2,728)	0,057
Gleason da prostatectomia	De 3 a 6	93 (43,0%)	Referência	1
	7	86 (46,5%)	1,575 (1,013 - 2,447)	<b>0,044</b>
	De 8 a 10	17 (70,6%)	2,126 (1,106 - 4,084)	<b>0,024</b>
Extensão Extracapsular	Não	106 (37,7%)	Referência	1
	Sim	73 (63,0%)	1,576 (1,026 - 2,422)	<b>0,038</b>
Invasão de vesícula	Não	165 (41,8%)	Referência	1
	Sim	24 (70,8%)	2,352 (1,358 - 4,074)	<b>0,002</b>
Invasão perineural	Não	161 (42,9%)	Referência	1
	Sim	27 (63,0%)	1,136 (0,665 - 1,938)	0,641
Margem cirúrgica livre	Não	36 (77,8%)	Referência	1
	Sim	179 (43,6%)	0,254 (0,168 - 0,384)	<b>&lt;0,001</b>
Estadiamento do tumor	Pt1-Pt2 e Pt2a	33 (33,3%)	Referência	1
	Pt2b e Pt2c	77 (31,2%)	1,682 (0,811 - 3,487)	0,162
	Pt3 e Pt4	78 (64,1%)	2,274 (1,179 - 4,385)	<b>0,014</b>

Regressão de Cox ajustada por idade dos pacientes. Dados expressos como número absoluto (%), razão de risco (IC95%) e valor de p. Fonte: O Autor.

O risco de recorrência de cada paciente foi estimado a partir dos parâmetros histopatológicos, conforme estabelecido por D'Amico et al. (1998), e foi associado com a presença de recidiva bioquímica em nossa amostra. Foi observada significância estatística entre nossos dados de recidiva com o risco de D'Amico ( $p = 0,004$ ). Pacientes sem recidiva apresentaram mediana de risco 5 (4-6), enquanto os pacientes com recidiva apresentaram mediana de risco de 6 (5-7), onde o maior número representa o maior risco para recorrência.

Na análise individual da associação dos SNPs com presença ou não de recidiva bioquímica, somente a variante do gene *MGMT* apresentou associação. A presença do alelo **G** indicou aumento no risco de recidiva bioquímica nesses pacientes no modelo alélico (Tabela 3). Contudo, nos demais modelos, a presença do alelo **G** não foi associada com recidiva.

Tabela 3 – Associação das variantes genéticas com a presença ou não de recidiva bioquímica

<b>Genes</b>	<b>Modelos</b>	<b>Contagem n (Recidiva %)</b>	<b>Razão de Risco (IC95%)</b>	<b>p</b>
<b>VDR</b> rs1544410	Modelo Alélico			
	C	271 (46,5%)	Referência	1
	T	123 (47,1%)	1,040 (0,762 – 1,419)	0,807
	Modelo Genotípico			
	CC	75 (46,7%)	Referência	1
	CT	122 (46,7%)	1,030 (0,675 - 1,569)	0,892
	Modelo Dominante			
	CC	75 (46,7%)	Referência	1
	CT+TT	122 (46,7%)	1,030 (0,675 - 1,569)	0,892
	<b>AR</b> rs1730209 0	Modelo Alélico		
G		73 (55,2%)	Referência	1
A		124 (47,6%)	1,135 (0,739 - 1,744)	0,563
<b>GSTP1</b> rs1695	Modelo Alélico			
	A	172 (46,5%)	Referência	1
	G	222 (46,8%)	0,983 (0,734 - 1,316)	0,906
	Modelo Genotípico			
	AA	98 (46,9%)	Referência	1
	AG	74 (45,9%)	0,971 (0,622 - 1,516)	0,898
	GG	25 (48,0%)	0,915 (0,480 - 1,744)	0,788
	Modelo Dominante			
	AA	98 (47,0%)	Referência	1
	AG+GG	99 (46,5%)	1,045 (0,692 - 1,579)	0,833
	Modelo Recessivo			
	AA+AG	172 (46,5%)	Referência	1
	GG	25 (48,0%)	0,927 (0,501 - 1,714)	0,809

<b>AMACR</b> rs3195676	Modelo Alélico			
	G	243 (48,6%)	Referência	1
	A	151 (43,7%)	0,935 (0,690 - 1,267)	0,664
	Modelo Genotípica			
	GG	79 (46,8%)	Referência	1
	GA	86 (51,2%)	1,177 (0,759 - 1,826)	0,466
	AA	32 (34,4%)	0,770 (0,389 - 1,522)	0,452
	Modelo Dominante			
	GG	79 (46,8%)	Referência	1
	GA+AA	118 (46,6%)	1,069 (0,702 - 1,628)	0,756
	Modelo Recessivo			
	GA+GG	165 (49,1%)	Referência	1
	AA	32 (34,4%)	1,705 (0,373 - 1,332)	0,282
	<b>PTEN</b> rs2735343	Modelo Alélico		
G		239 (44,0%)	Referência	1
C		155 (51,0%)	0,816 (0,608 - 1,095)	0,175
Modelo Genotípico				
GG		76 (43,4%)	Referência	1
GC		86 (45,3%)	0,816 (0,464 - 1,436)	0,481
CC		35 (57,1%)	0,724 (0,409 - 1,280)	0,267
Modelo Dominante				
CC		35 (57,1%)	Referência	1
GC+GG		162 (44,4%)	0,769 (0,459 - 1,289)	0,319
Modelo Recessivo				
GC+CC		121 (48,8%)	Referência	1
GG		76 (43,4%)	0,832 (0,543 - 1,276)	0,4
<b>AKT1</b> rs2494750		Modelo Alélico		
	C	347 (47,3%)	Referência	1
	G	47 (42,5%)	0,953 (0,598 - 1,521)	0,841
	Modelo Genotípico			
	CC	150 (47,3%)	Referência	1
	CG	47 (44,7%)	0,983 (0,601 - 1,607)	0,944
	Modelo Dominante			
	CC	150 (47,3%)	Referência	1
	CG+GG	47 (44,7%)	0,983 (0,601 - 1,607)	0,944
	<b>PI3KCA</b> rs2699887	Modelo Alélico		
G		307 (46,9%)	Referência	1

	A	87 (46,0%)	1,022 (0,717 - 1,457)	0,902
	Modelo Genotípico			
	GG	121 (47,1%)	Referência	1
	GA	67 (46,3%)	0,989 (0,635 - 1,540)	0,843
	AA	9 (44,4%)	1,401 (0,503 - 3,897)	0,519
	Modelo Dominante			
	GG	121 (47,1%)	Referência	1
	GA+AA	76 (46,0%)	1,023 (0,667 - 1,567)	0,918
	Modelo Recessivo			
	GA+GG	188 (46,8%)	Referência	1
	AA	9 (44,4%)	1,406 (0,513 - 3,858)	0,508
<b>MTOR</b> rs2536	Modelo Alélico			
	T	355 (46,5%)	Referência	1
	C	39 (48,7%)	0,974 (0,605 - 1,569)	0,915
	Modelo Genotípico			
	TT	175 (46,3%)	Referência	1
	TC	5 (60,0%)	1,233 (0,388 - 3,923)	0,722
	CC	17 (47,1%)	0,941 (0,454 - 1,951)	0,871
	Modelo Dominante			
	TT	175 (46,3%)	Referência	1
	TC+CC	22 (50,0%)	1,006 (0,534 - 1,895)	0,985
	Modelo Recessivo			
	TC+TT	180 (46,7%)	Referência	1
	CC	17 (47,1%)	0,935 (0,452 - 1,935)	0,856
<b>CASP-3</b> rs4647603	Modelo Alélico			
	C	341 (45,7%)	Referência	1
	T	53 (52,8%)	1,122 (0,746 - 1,690)	0,58
	Modelo Genotípico			
	CC	150 (44,0%)	Referência	1
	CT	44 (54,5%)	1,231 (0,759 - 1,994)	0,399
	TT	3 (66,7%)	1,456 (0,351 - 6,045)	0,605
	Modelo Dominante			
	CC	150 (44,0%)	Referência	1
	CT+TT	47 (55,3%)	1,245 (0,777 - 1,993)	0,362
	Modelo Recessivo			
	CT+CC	194 (46,4%)	Referência	1
	TT	3 (66,7%)	1,362 (0,331 - 5,607)	0,669

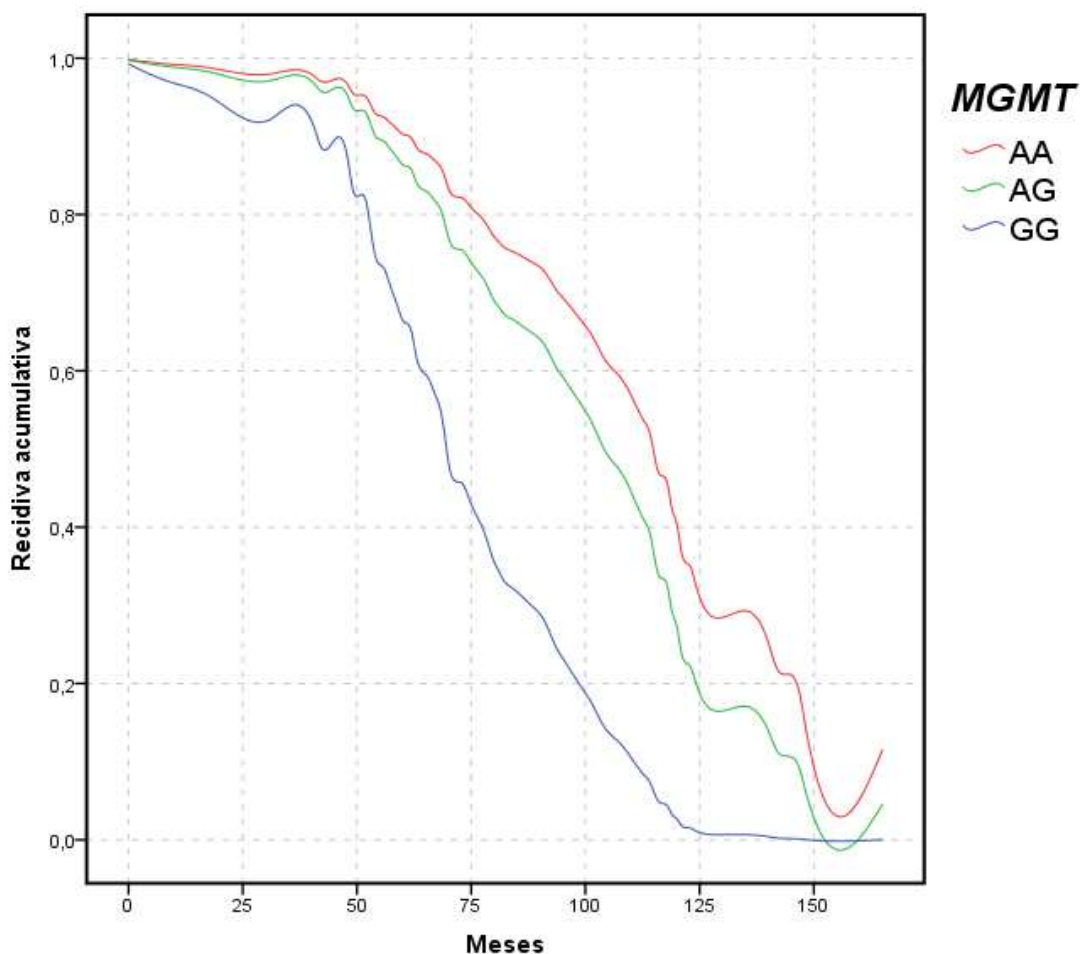
<b>CASP-9</b> rs1052571	Modelo Alélico			
	G	195 (43,1%)	Referência	1
	A	199 (50,2%)	1,159 (0,866 - 1,552)	0,32
	Modelo Genotípico			
	GG	47 (38,3%)	Referência	1
	GA	101 (47,5%)	1,203 (0,698 - 2,072)	0,506
	AA	49 (53,1%)	1,372 (0,748 - 2,517)	0,307
	Modelo Dominante			
	GG	47 (38,3%)	Referência	1
	GA+AA	150 (49,3%)	1,256 (0,748 - 2,109)	0,39
	Modelo Recessivo			
	GG+GA	148 (44,6%)	Referência	1
	AA	49 (53,1%)	1,202 (0,761 - 1.899)	0,43
<b>NKX3-1</b> rs1178188 6	Modelo Alélico			
	T	269 (46,1%)	Referência	1
	C	125 (48,0%)	1,038 (0,762 - 1,413)	0,815
	Modelo Genotípico			
	TT	96 (43,7%)	Referência	1
	TC	78 (51,3%)	1,195 (0,771 - 1,852)	0,425
	CC	23 (43,5%)	1,031 (0,517 - 2,059)	0,93
	Modelo Dominante			
	TT	96 (43,7%)	Referência	1
	TC+CC	101 (46,5%)	0,966 (0,641 - 1,455)	0,867
	Modelo Recessivo			
	TT+TC	174 (47,1%)	Referência	1
	CC	23 (43,5%)	0,952 (0,492 - 1,843)	0,885
<b>MGMT</b> rs2308321	Modelo Alélico			
	A	355 (45,3%)	Referência	1
	G	39 (59,0%)	1,601 (1,031 - 2,486)	<b>0,036</b>
	Modelo Genotípico			
	AA	164 (44,5%)	Referência	1
	AG	27 (55,6%)	1,446 (0,823 - 2,540)	0,200
	GG	6 (66,7%)	2,267 (0,821 - 6,258)	0,114
	Modelo Dominante			
	AA	164 (44,5%)	Referência	1
	AG+GG	33 (57,6%)	1,567 (0,939 - 2,615)	0,086
	Modelo Recessivo			

	AA+AG	191 (46,1%)	Referência	1
	GG	6 (66,7%)	2,144 (0,781 – 5,888)	0,139
<b>BCL-2</b> rs2279115	Modelo Alélico			
	C	210 (44,5%)	Referência	1
	A	184 (49,5%)	1,123 (0,840 - 1,501)	0,433
	Modelo Genotípico			
	CC	55 (38,2%)	Referência	1
	CA	101 (51,5%)	1,412 (0,851 - 2,345)	0,182
	AA	41 (46,3%)	1,273 (0,684 - 2,369)	0,447
	Modelo Dominante			
	CC	55 (38,2%)	Referência	1
	CA+AA	142 (50,0%)	1,372 (0,843 - 2,234)	0,203
Modelo Recessivo				
CC+CA	156 (46,8%)	Referência	1	
AA	41 (46,3%)	1,008 (0,608 - 1,670)	0,976	

Regressão de Cox ajustada por idade dos pacientes e o comprometimento da margem cirúrgica da prostatectomia. Dados expressos como número absoluto (%), razão de risco (IC95%) e valor de *p*. Fonte: O Autor.

A Figura 1 representa a relação da ocorrência de recidiva ao longo dos anos de seguimento, representando em semanas, para o rs2308321 (gene *MGMT*). O risco entre a ocorrência de recidiva no modelo alélico ( $p=0,036$ ) ao longo do seguimento está expresso em *Hazard Ratio* na Tabela 3. Podemos observar que, com aproximadamente 50 meses de seguimento, pacientes portadores do genótipo GG tem um aumento na ocorrência de recidiva, enquanto nossa população portadora do alelo A (genótipos AA e AG) mantém ocorrências de recidivas semelhantes.

Figura 1 – Recidiva acumulativa de CaP ao longo dos anos de seguimento (em meses) para o modelo genotípico do rs2308321 (gene *MGMT*)



Fonte: O autor.

A análise da combinação dos SNPs de acordo com a via de atuação das proteínas codificadas por seus genes, (i) receptores (*VDR* e *AR*), (ii) metabolismo celular (*GSTP1* e *AMACR*), (iii) sobrevivência celular (*PTEN*, *AKT1*, *PI3KCA* e *mTOR*) e (iv) morte celular (*CASP3*, *CASP9*, *NKX3-1*, *MGMT* e *BCL-2*) quanto a associação ou não com recidiva bioquímica está apresentada na Tabela 5.

O painel genético das combinações entre as variantes dos genes das três vias analisadas não apresentou associação estatisticamente significativa com a presença de recidiva bioquímica do CaP em nenhuma das combinações analisadas (Tabela 5).

Tabela 4 – Análise da associação de painéis de variantes de genes relacionados a receptores, metabolismo celular, sobrevivida e morte celular com a presença ou não de recidiva bioquímica

<b>Genes</b>	<b>Frequência (%)</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>p</b>
<b>VDR + AR</b>			
rs1544410 / rs17302090			
TC + A	41,1%	Referência	1
C + G	16,2%	0,72 (0,37 - 1,43)	0,35
T + A	21,8%	1,26 (0,75 - 2,12)	0,38
T + G	20,8%	1,15 (0,67 - 1,96)	0,61
<b>GSTP1 + AMACR</b>			
rs1695 / rs3195676			
AA + GG	43,9%	Referência	1
A + A	26,5%	0,71 (0,33 - 1,54)	0,39
G + G	19,03%	1,00 (0,42 - 2,40)	0,99
G + A	10,57%	2,41 (0,69 - 8,37)	0,17
<b>PTEN + AKT1 + PI3KCA + MTOR</b>			
rs2735343 / rs2494750 / rs2699887 / rs2536			
GG + CC + GG + TT	37,56%	Referência	1
C + C + G + T	25,98%	0,83 (0,37 - 1,85)	0,65
G + C + A + T	9,54%	0,41 (0,11 - 1,49)	0,18
C + C + A + T	6,94%	0,69 (0,20 - 2,40)	0,56
G + G + G + T	5,86%	0,25 (0,06 - 1,14)	0,07
G + C + G + C	4,95%	0,82 (0,23 - 2,90)	0,75
C + G + G + T	1,65%	4,69 (0,15 - 149,99)	0,38
C + C + G + C	1,37%	1,38 (0,12 - 15,73)	0,81
C + G + A + T	1,13%	0,08 (0,15 - 46,55)	0,44
<b>CASP3 + CASP9 + NKX3-1 + MGMT + BCL-2</b>			
rs26677604 / rs1052571 / rs11781886 / rs2308321 / rs2279115			
CC + GA + TT + AA + CC	17,67%	Referência	1
C + G + T + A + A	15,57%	1,07 (0,28 - 4,10)	0,92
C + A + T + A + A	13,36%	0,38 (0,06 - 2,29)	0,29
C + A + C + A + A	8,27%	0,33 (0,07 - 1,51)	0,16
C + A + C + A + C	3,71%	7,15 (0,23 - 225,64)	0,27
C + G + C + A + A	2,72%	0,17 (0,01 - 2,69)	0,21
T + G + T + A + C	1,83%	0,07 (0,01 - 2,76)	0,16

Regressão de Cox. Combinações com menos de 1% de frequência foram descartadas da análise. Fonte: O Autor.

#### 4.5. DISCUSSÃO

A instabilidade genômica gerada a partir do acúmulo de danos no material genético é a condição básica para a perda da homeostase e consequente crescimento desordenado das células (FINKEL; SERRANO; BLASCO, 2007), podendo ter como uma das consequências, o câncer. A instabilidade genômica é também uma marca registrada do envelhecimento (FINKEL; SERRANO; BLASCO, 2007) e este, por sua vez, é um dos principais fatores de risco para o câncer de próstata (BRAY et al., 2018), porque esta doença apresenta desenvolvimento lento e silencioso até sua fase avançada.

A média de idade dos pacientes do presente estudo foi de  $65\pm 7$  anos, corroborando dados da literatura que descrevem o CaP como uma doença característica de homens de idade avançada (PERDANA et al., 2016; REBBECK, 2017). Homens mais idosos têm maior risco de serem diagnosticados tardiamente com CaP avançado (O'CONNOR, 2015) e, portanto, apresentarem menor sobrevida dadas as dificuldades de tratamento decorrentes da idade (PERDANA et al., 2016). Isto reforça a relação entre a idade avançada e o pior prognóstico dos pacientes, apesar de que, no presente trabalho, a idade não foi associada à recidiva bioquímica do tumor.

A ancestralidade é um fator que foi relacionado ao risco para desenvolvimento de CaP em diversos estudos (MIGOWSKI; SILVA, 2010a; MURATA et al., 2018; NÓBREGA et al., 2020; PERDANA et al., 2016; REBBECK, 2017; SOUZA; CÓLUS, 2017b). Uma relação entre o pior prognóstico do CaP em homens brancos do que em homens negros e pardos foi observada por Migowski *et al.* (2010). Porém, três estudos em populações do Japão e Estados Unidos mostraram o oposto, com maior risco de desenvolvimento de CaP e pior prognóstico em homens negros (MURATA et al., 2018; PERDANA et al., 2016; REBBECK, 2017). Ao contrário das populações japonesa e americana, a estudada por Migowski *et al.* (2010) era proveniente da cidade do Rio de Janeiro (Brasil) e apresentava alta miscigenação. Em nossa amostra, também brasileira e altamente miscigenada, a ancestralidade não foi associada com recidiva bioquímica, sendo a frequência de homens que se

autodeclaravam não caucasianos muito baixa. A divergência com os dados de Migowski *et al.* (2010) pode ser explicada, em parte, pelas etnias de cada localidade. Na região de Londrina, sul do Brasil, onde foram coletadas nossas amostras, a alta taxa de miscigenação ocorreu principalmente entre imigrantes europeus e asiáticos, diferentemente da região do Rio de Janeiro, onde a frequência da origem africana é maior (IBGE, 2018).

O estudo de Migowski *et al.* (2010) ainda identificou que o menor nível de escolaridade estava relacionado com maior risco de recorrência e pior prognóstico do CaP, sendo que esses pacientes também tinham diagnóstico mais tardio. Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa também demonstrou que homens com escolaridade inferior tinham maior risco de desenvolverem CaP (NÓBREGA *et al.*, 2020). No entanto, no presente estudo esse parâmetro não foi associado com recidiva bioquímica. A escolaridade está diretamente relacionada com a maior busca regular por serviços de saúde e com a maior capacidade financeira dos pacientes.

O aumento da recorrência e mortalidade específica do CaP foi associado com consumo de tabaco e álcool (Perdana *et al.*, 2016); contudo, os autores destacaram que estes dados podem ter sofrido influência de múltiplos fatores externos desconhecidos. No presente estudo os hábitos etilistas e tabagistas não apresentaram relação com a ocorrência de recidiva bioquímica.

A presença de casos de câncer familiar é estabelecida como fator de risco em diversos tipos de cânceres, inclusive para o CaP. Pacientes com irmãos ou pais que já apresentaram CaP têm risco aumentado em cerca de 50% para o desenvolvimento desta neoplasia maligna (NÓBREGA, CILIÃO, *et al.*, 2020, REBBECK, 2017). É estimado que cerca de 25% dos casos de CaP familiar resultem de alterações do tipo SNP, que são herdadas pelos descendentes, predispondo os mesmos a um maior risco de desenvolverem essa patologia (ALY; WIKLUND; GRÖNBERG, 2011). No entanto, pouco se sabe sobre a influência da hereditariedade na recorrência de tumores de próstata. No nosso trabalho não observamos relação entre a presença de câncer geral ou CaP na família e a ocorrência de recidiva bioquímica. Isto poderia indicar que a herança familiar para CaP pode estar mais relacionada com o desenvolvimento da doença do que com sua recorrência.

O estudo de Murata *et al.* (2018) demonstrou a eficiência do PSA como um marcador de diagnóstico e prognóstico para o CaP, principalmente quando foi associado com outros parâmetros clínicos, como o escore de Gleason da biópsia e estadiamento TNM. O escore de Gleason e o toque retal em combinação com o PSA apresentaram importante poder prognóstico no estudo de Migowski *et al.* (2010), onde foram utilizados na estratificação de risco pré-tratamento. Esse parâmetro associado a outros fatores clínicos tem valor prognóstico já determinado e utilizado na prática clínica (VAN DEN BROECK *et al.*, 2020).

Conforme proposto por D'Amico *et al.* (1998), a utilização do PSA, escore de Gleason e o estadiamento TNM combinados tem grande valor prognóstico para o CaP. Nossos resultados significativos reiteram a capacidade prognóstica que a combinação dos marcadores PSA, escore de Gleason e TNM oferecem no CaP, já que foram capazes de indicar a ocorrência de recidiva bioquímica, corroborando dados de trabalhos de Murata *et al.* (2018) e Pound *et al.* (1999) e reforçando o valor desses parâmetros como bons marcadores de prognóstico para o CaP.

Moul *et al.* (1996) avaliaram amostras de tecidos obtidos de biópsia de pacientes com CaP e relacionaram a superexpressão da proteína BCL-2 no tecido prostático com maior recorrência do tumor e menor sobrevida para pacientes que apresentavam o genótipo homozigoto CC. Em outros estudos que avaliaram o mesmo SNP em pacientes com CaP os genótipos AA e CA foram relacionados com maior risco de recorrência e pior prognóstico (BACHMANN *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2015). Nosso trabalho não corroborou tais dados da literatura, uma vez que a presença da variante alélica no gene *BCL-2* não apresentou influência significativa na ocorrência de recidiva bioquímica neste estudo.

O reparo de DNA é um mecanismo fundamental para a manutenção da estabilidade genômica e resistência à carcinogênese (CHATTERJEE; WALKER, 2017; FINKEL; SERRANO; BLASCO, 2007). A proteína MGMT faz parte de importante mecanismo de reparo do DNA, funcionando tanto como uma transferase quanto como um acceptor de grupamentos alquila; ela é uma das poucas proteínas capazes de reparar danos causados por agentes alquilantes ao DNA (SHARMA *et al.*, 2009). A proteína age transferindo radicais  $CH_3$

removidos da O<sub>6</sub>-metilguanina para um sítio cisteína no seu interior; essa transferência restaura a base metilada para sua forma original, reparando possíveis erros de pareamento, porém impede que a MGMT volte à sua conformação original, tornando-a uma proteína de ação única (CORDEIRO et al., 2012). Um estudo anterior sugeriu que o gene *MGMT* tem múltiplos sítios polimórficos, e que alguns poderiam estar relacionados com a ocorrência de CaP (AGALLIU et al., 2010). Zhang et al. (2022), em um estudo de revisão, avaliaram a influência de diversos polimorfismos do gene *MGMT* no CaP e mostraram que em 11 dos estudos caso-controle revisados, o rs2308321 não foi associado à suscetibilidade ao CaP. Contudo, os autores destacaram a heterogeneidade entre os artigos revisados como um fator limitante aos resultados expostos (ZHANG et al., 2020). No presente estudo, quando o rs2308321 foi analisado no modelo alélico, observamos que a presença do alelo G aumentava significativamente o risco para recidiva dos pacientes com CaP, em comparação ao alelo A. A presença da variante G no éxon do gene afeta o códon e causa alteração do aminoácido na proteína final. Essa alteração tem o potencial de afetar a funcionalidade do gene como transferase e acceptor de grupamentos alquila, e por sua vez, permitir que maiores danos ao DNA se acumulem na célula.

Dessa forma, apesar dos dados da literatura não terem detectado associação do rs2308321 do gene *MGMT* com suscetibilidade ao CaP, em nosso estudo ele foi associado com aumento de risco para recidiva bioquímica do tumor após a intervenção cirúrgica, indicando que risco para recidiva do CaP provavelmente envolve expressão de genes e vias celulares distintas daquelas que atuam no desenvolvimento da doença. No entanto devemos ter cautela na análise desses dados, pois a frequência do alelo G em nossa amostra foi baixa (apenas 17,88% dos nossos pacientes eram portadores deste alelo), o que pode ter sido um distrator na análise estatística. Dessa forma, estudos posteriores com maior número amostral e que avaliem o papel dessa variante na recorrência do CaP são muito importantes, pois é necessário analisar uma maior frequência desse alelo na população para que os dados que obtivemos sejam confirmados.

Dentre as combinações de SNPs realizadas; receptores (rs1544410 *VDR*; rs17302090 *AR*), metabolismo (rs1695 *GSTP1*; rs3195676 *AMACR*), sobrevida (rs2735343 *PTEN*; rs2494750 *AKT1*; rs2699887 *PI3KCA*; rs2536 *mTOR*) e morte

celular (rs26677604 *CASP3*; rs1052571 *CASP9*; rs11781886 *NKX3-1*; rs2308321 *MGMT*; rs2279115 *BCL-2*) não foram observadas significâncias estatísticas em relação ao risco de ocorrência de recidiva bioquímica do CaP. As combinações analisadas no presente estudo são novas na literatura, visto que não existem estudos com recidiva bioquímica do CaP avaliando essas combinações.

#### 4.6. CONCLUSÃO

Nosso trabalho buscou a elucidação do papel de polimorfismos presentes em genes das principais vias relacionadas à tumorigênese e progressão do tumor na recidiva do câncer de próstata. Quando foi construído um painel de diversos polimorfismos, primeiro estudo dessas combinações com o acompanhamento do CaP, não observamos associações estatisticamente significativas. Porém, na análise individual dos SNPs, observamos que o alelo G do *MGMT* apresentou risco aumentado para recidiva bioquímica em relação aos portadores do alelo A.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho buscou propor um painel genético com maior potencial prognóstico para o CaP complementando dados de marcadores utilizados atualmente. Nós verificamos que a rs2308321 (*MGMT*) estava relacionada com a ocorrência de recidiva bioquímica em pacientes com CaP. Contudo, quando combinada em painéis com outras variantes por proximidade de função, a mesma variante não apresentou papel relevante no prognóstico. Para as demais variantes analisadas também não observamos potencial prognóstico, tanto na análise individual, quanto combinadas em painéis. A investigação de marcadores do câncer exige grande poder estatístico e amostral, o que deverá ser buscado em estudos futuros.

## 6. REFERÊNCIAS

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

AGALLIU, I. et al. Genetic variation in DNA repair genes and prostate cancer risk: Results from a population-based study. **Cancer Causes and Control**, v. 21, n. 2, p. 289–300, fev. 2010.

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

ALY, M.; WIKLUND, F.; GRÖNBERG, H. **Early detection of prostate cancer with emphasis on genetic markers** *Acta Oncologica* *Acta Oncol*, , jun. 2011.

ANDERSON, P. D. et al. Nkx3.1 and Myc crossregulate shared target genes in mouse and human prostate tumorigenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 5, p. 1907–1919, maio 2012.

AURELLO, P. et al. Follow-up after curative resection for gastric cancer: Is it time to tailor it? **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 19, p. 3379–3387, maio 2017a.

AURELLO, P. et al. Follow-up after curative resection for gastric cancer: Is it time to tailor it? **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 19, p. 3379–3387, maio 2017b.

BACHMANN, H. S. et al. Regulatory BCL2 promoter polymorphism (-938C>A) is associated with adverse outcome in patients with prostate carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 10, p. 2390–2399, 15 nov. 2011.

BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 10, p. 781–791, out. 2006.

BARBER, L. et al. Family history of breast or prostate cancer and prostate cancer risk. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 24, n. 23, p. 5910, 1 dez. 2018.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BROCKMAN, J. A. et al. Nomogram predicting prostate cancer-specific mortality for men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. **European Urology**, v. 67, n. 6, p. 1160–1167, 1 jun. 2015.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 204, n. 3, p. 379–406, 1 mar. 1988.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 58, n. 5, p. 235, 1 jun. 2017.

CHEN, K. et al. CASP3 Polymorphisms and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 19, p. 6343–6349, out. 2008.

COOKSON, M. S. et al. Variation in the Definition of Biochemical Recurrence in Patients Treated for Localized Prostate Cancer: The American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel Report and Recommendations for a Standard in the Re. **Journal of Urology**, v. 177, n. 2, p. 540–545, fev. 2007a.

COOKSON, M. S. et al. Variation in the Definition of Biochemical Recurrence in Patients Treated for Localized Prostate Cancer: The American Urological Association Prostate Guidelines for Localized Prostate Cancer Update Panel Report and Recommendations for a Standard in the Re. **Journal of Urology**, v. 177, n. 2, p. 540–545, fev. 2007b.

CORDEIRO, A. T. et al. Evaluation of the expression of the MGMT gene in normal and neoplastic tissue of patients with colorectal cancer. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 39, n. 1, p. 48–53, 2012.

COZAR, J. M. et al. **Genetic markers a landscape in prostate cancer** *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* *Mutat Res Rev Mutat Res*, , 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29555025/>>. Acesso em: 11 ago. 2021

CUCCHIARA, V. et al. **Genomic Markers in Prostate Cancer Decision Making** *European Urology* *Eur Urol*, , 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29129398/>>. Acesso em: 11 ago. 2021

CUZICK, J. et al. **Prevention and early detection of prostate cancer**The **Lancet Oncology**Lancet Publishing Group, , 1 out. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC4203149/>. Acesso em: 10 jun. 2021

D'AMICO, A. V. et al. Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. **JAMA**, v. 280, n. 11, p. 969, set. 1998a.

D'AMICO, A. V. et al. Biochemical Outcome After Radical Prostatectomy, External Beam Radiation Therapy, or Interstitial Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. **JAMA**, v. 280, n. 11, p. 969, set. 1998b.

DANIYAL, M. et al. **Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer****Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**Asian Pac J Cancer Prev, , 2014.

DAREMIPOURAN, M. R. et al. The association of a novel identified VDR SNP with prostate cancer in African American men. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 16, n. 4, p. 245–255, 2019a.

DAREMIPOURAN, M. R. et al. The association of a novel identified VDR SNP with prostate cancer in African American men. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 16, n. 4, p. 245–255, 2019b.

DONOHUE, J. **Urology information - Prostate Specific Antigen - John Donohue**. Disponível em: <<http://www.johndonohue.info/psa.html>>. Acesso em: 8 out. 2021.

D'UGO, D. et al. Follow-Up: The Evidence. **Digestive Surgery**, v. 30, n. 2, p. 159–168, 2013a.

D'UGO, D. et al. Follow-Up: The Evidence. **Digestive Surgery**, v. 30, n. 2, p. 159–168, 2013b.

EPSTEIN, J. I. et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, p. 1, out. 2015a.

EPSTEIN, J. I. et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, p. 1, out. 2015b.

FINKEL, T.; SERRANO, M.; BLASCO, M. A. **The common biology of cancer and ageing****Nature**Nature Publishing Group, , 16 ago. 2007.

FITZGERALD, L. M. et al. Germline variants in IL4, MGMT and AKT1 are associated with prostate cancer-specific mortality: An analysis of 12,082 prostate cancer cases. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 21, n. 2, p. 228–237, jun. 2018.

FREEDLAND, S. J. et al. Risk of Prostate Cancer–Specific Mortality Following Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. **JAMA**, v. 294, n. 4, p. 433, jul. 2005a.

FREEDLAND, S. J. et al. Risk of Prostate Cancer–Specific Mortality Following Biochemical Recurrence After Radical Prostatectomy. **JAMA**, v. 294, n. 4, p. 433, jul. 2005b.

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

GARISTO, J. D.; KLOTZ, L. Active Surveillance for Prostate Cancer: How to Do It Right. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 31, n. 5, p. 333–40, 345, 2017a.

GARISTO, J. D.; KLOTZ, L. Active Surveillance for Prostate Cancer: How to Do It Right. **Oncology (Williston Park, N.Y.)**, v. 31, n. 5, p. 333–40, 345, 2017b.

GHAJ, S.; TOI, A. Role of Transrectal Ultrasonography in Prostate Cancer. **Radiologic Clinics of North America**, v. 50, n. 6, p. 1061–1073, nov. 2012.

GIBSON, G.; MUSE, V. S. **A Primer of Genome Science**. 3<sup>a</sup> Edition ed. North Carolina: Sinauer Associates, Inc, 2009.

GLEASON, D. F. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. **Human pathology**, v. 23, n. 3, p. 273–9, mar. 1992.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **GLOBOCAN**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY. **GLOBOCAN**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>.

GRACIELE P. SILVEIRA et al. **Nomograma Fuzzy Câncer de Próstata - UNICAMP**. Disponível em: <<https://nfcp.ime.unicamp.br/home>>. Acesso em: 24 dez. 2021.

GUO, Q. et al. Genetic variations in the PI3K-PTEN-AKT-mTOR pathway are associated with distant metastasis in nasopharyngeal carcinoma patients

treated with intensity-modulated radiation therapy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 37576, dez. 2016.

HARAZONO, Y.; NAKAJIMA, K.; RAZ, A. Why anti-Bcl-2 clinical trials fail: a solution. **Cancer metastasis reviews**, v. 33, n. 1, p. 285–94, mar. 2014.

HENRIQUE, R.; JERÓNIMO, C. Molecular detection of prostate cancer: a role for GSTP1 hypermethylation. **European Urology**, v. 46, n. 5, p. 660–669, 1 nov. 2004.

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

HUANG, H. et al. Identification of prognostic markers of high grade prostate cancer through an integrated bioinformatics approach. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 143, n. 12, p. 2571–2579, dez. 2017.

HUGOSSON, J. et al. Mortality results from the Göteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 8, p. 725–732, ago. 2010.

HUMPHREY, P. A. et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. **European Urology**, v. 70, n. 1, p. 106–119, jul. 2016.

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

IBGE. **Estudos Sociodemográficos e Análises Espaciais referentes aos Municípios com a Existência de Comunidades Remanescentes de Quilombos**. [s.l.: s.n.].

JANG, Y. et al. Genetic polymorphisms of CCND1 and PTEN in progression of esophageal squamous carcinoma. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6685–6691, dez. 2013.

JINGWI, E. Y. et al. Vitamin D receptor genetic polymorphisms are associated with PSA level, gleason score and prostate cancer risk in african-american men. **Anticancer Research**, v. 35, n. 3, p. 1549–1558, mar. 2015a.

JINGWI, E. Y. et al. Vitamin D receptor genetic polymorphisms are associated with PSA level, gleason score and prostate cancer risk in african-american men. **Anticancer Research**, v. 35, n. 3, p. 1549–1558, mar. 2015b.

KARYADI, D. M. et al. Confirmation of genetic variants associated with lethal prostate cancer in a cohort of men from hereditary prostate cancer families. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2166–2171, maio 2015.

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

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

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

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 126, n. 8, p. 1713–1719, abr. 2013.

LEE, S.-J. et al. Genetic Variations of  $\alpha$ -Methylacyl-CoA Racemase Are Associated with Sporadic Prostate Cancer Risk in Ethnically Homogenous Koreans. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–11, 2013.

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

LI, Z.; SHENG, M. Caspases in synaptic plasticity. **Molecular Brain**, v. 5, p. 15, maio 2012.

LIN, L. et al. Roles of genetic variants in the PI3K/PTEN pathways in susceptibility to colorectal carcinoma and clinical outcomes treated with FOLFOX regimen. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 10, p. 13314–22, 2015.

LINDSTROM, S. et al. Inherited Variation in Hormone-Regulating Genes and Prostate Cancer Survival. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 17, p. 5156–5161, set. 2007.

LITWIN, M. S.; TAN, H.-J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. **JAMA**, v. 317, n. 24, p. 2532, jun. 2017a.

LITWIN, M. S.; TAN, H.-J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. **JAMA**, v. 317, n. 24, p. 2532, jun. 2017b.

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

LOBLAW, A. et al. Follow-up Care for Survivors of Prostate Cancer – Clinical Management: a Program in Evidence-Based Care Systematic Review and Clinical Practice Guideline. **Clinical Oncology**, v. 29, n. 11, p. 711–717, nov. 2017a.

LOBLAW, A. et al. Follow-up Care for Survivors of Prostate Cancer – Clinical Management: a Program in Evidence-Based Care Systematic Review and Clinical Practice Guideline. **Clinical Oncology**, v. 29, n. 11, p. 711–717, nov. 2017b.

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

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

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

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

MATTOS, B. B. DE; CÓLUS, I. M. DE. **Estudo de associação de polimorfismos nos genes PTEN e mTOR em pacientes com câncer de próstata e controles livres da doença**. Dissertação de Mestrado Acadêmico—Londrina/PR: Universidade Estadual de Londrina, 2019.

MAY, E. J. et al. Prostate cancer post-treatment follow-up and recurrence evaluation. **Abdominal Radiology**, v. 41, n. 5, p. 862–876, maio 2016a.

MAY, E. J. et al. Prostate cancer post-treatment follow-up and recurrence evaluation. **Abdominal Radiology**, v. 41, n. 5, p. 862–876, maio 2016b.

MCDONALD, J. S. et al. Evaluation of Posttreatment Follow-Up of Patients With Prostate Cancer Relative to the American College of Radiology's Appropriateness Criteria. **American Journal of Roentgenology**, v. 205, n. 5, p. 1008–1015, nov. 2015a.

MCDONALD, J. S. et al. Evaluation of Posttreatment Follow-Up of Patients With Prostate Cancer Relative to the American College of Radiology's Appropriateness Criteria. **American Journal of Roentgenology**, v. 205, n. 5, p. 1008–1015, nov. 2015b.

MIGOWSKI, A.; SILVA, G. A. E. Sobrevida e fatores prognósticos de pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 2, p. 344–352, abr. 2010a.

MIGOWSKI, A.; SILVA, G. A. E. Sobrevida e fatores prognósticos de pacientes com câncer de próstata clinicamente localizado. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 2, p. 344–352, abr. 2010b.

MOUL, J. W. et al. Protein expression of p53, bcl-2, and KI-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. **Surgery**, v. 120, n. 2, p. 159–66; discussion 166-7, ago. 1996a.

MOUL, J. W. et al. Protein expression of p53, bcl-2, and KI-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. **Surgery**, v. 120, n. 2, p. 159–66; discussion 166-7, ago. 1996b.

MURATA, Y. et al. Predictive factors of biochemical recurrence after radical prostatectomy for high-risk prostate cancer. **International Journal of Urology**, v. 25, n. 3, p. 284–289, 1 mar. 2018.

MYDLO, J. H.; GODEC, C. J. **Prostate Cancer: Science and Clinical Practice: Second Edition**. 2nd Editio ed. [s.l: s.n.].

NAKAGAWA, H. et al. **Prostate cancer genomics, biology, and risk assessment through genome-wide association studies** **Cancer Science** **Cancer Sci**, , abr. 2012.

NASSAR, D.; BLANPAIN, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 47–76, 23 maio 2016.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. In: [s.l: s.n.]. p. 1723–1723.

NILSSON, M. Postgastrectomy follow-up in the West: evidence base, guidelines, and daily practice. **Gastric Cancer**, v. 20, n. S1, p. 135–140, mar. 2017.

NÓBREGA, M. DE et al. Association of polymorphisms of pten, akt1, pi3k, ar, and amacr genes in patients with prostate cancer. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 3, p. 1–11, 1 jun. 2020.

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

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

NUSSBAUM, ROBERT.; MCINNES, R. R.; WILLARD, F. H. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 8ª Edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

O'CONNOR, M. J. **Targeting the DNA Damage Response in Cancer****Molecular Cell**Cell Press, , 19 nov. 2015.

OSKINA, N. A. et al. Associations between SNPs within antioxidant genes and the risk of prostate cancer in the Siberian region of Russia. **Pathology and Oncology Research**, v. 20, n. 3, p. 635–640, 2014.

OXFORD. **Oxford Dictionary of English**.

PENG, Y. et al. Polymorphisms of BCL2 and BAX Genes Associate with Outcomes in Advanced Non-small cell lung cancer Patients treated with platinum-based Chemotherapy. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 10 dez. 2015.

PERDANA, N. R. et al. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. **Acta medica Indonesiana**, v. 48, n. 3, p. 228–238, jul. 2016.

PERNAR, C. H. et al. **The Epidemiology of Prostate Cancer****Cold Spring Harbor perspectives in medicine**NLM (Medline), , 3 dez. 2018.

PIERCE, B. A. **Genética - Um Enfoque Conceitual**. 5ª Edição ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

POUND, C. R. et al. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. **JAMA**, v. 281, n. 17, p. 1591–7, maio 1999.

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

RENEHAN, A. G. et al. Impact on survival of intensive follow up after curative resection for colorectal cancer: systematic review and meta-analysis of randomised trials. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 324, n. 7341, p. 813, abr. 2002.

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

RUCHLIN, H. S.; PELLISSIER, J. M. An economic overview of prostate carcinoma. **Cancer**, v. 92, n. 11, p. 2796–2810, dez. 2001.

SANDBLOM, G. et al. Randomised prostate cancer screening trial: 20 Year follow-up. **BMJ**, v. 342, n. 7803, 23 abr. 2011.

SANTRIC, V. et al. GSTP1 RS1138272 polymorphism affects prostate cancer risk. **Medicina (Lithuania)**, v. 56, n. 3, mar. 2020.

SASSE, A. D. et al. First brazilian consensus of advanced prostate cancer: recommendations for clinical practice. **International Brazilian Journal of Urology : official journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 43, n. 3, p. 407, 2017a.

SASSE, A. D. et al. First brazilian consensus of advanced prostate cancer: recommendations for clinical practice. **International Brazilian Journal of Urology : official journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 43, n. 3, p. 407, 2017b.

SATHIANATHEN, N. J. et al. **Landmarks in prostate cancer** *Nature Reviews Urology* Nature Publishing Group, , out. 2018a.

SATHIANATHEN, N. J. et al. **Landmarks in prostate cancer** *Nature Reviews Urology* Nature Publishing Group, , out. 2018b.

SHARMA, S. et al. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. **Anticancer research**, v. 29, n. 10, p. 3759–3768, out. 2009.

SHEN, M. M.; ABATE-SHEN, C. **Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges** *Genes and Development* Genes Dev, , 15 set. 2010.

SHIMOBAYASHI, M.; HALL, M. N. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 3, p. 155–162, mar. 2014.

SHUKLA, M. E. et al. Evaluation of the Current Prostate Cancer Staging System Based on Cancer-Specific Mortality in the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. **Clinical Genitourinary Cancer**, v. 13, n. 1, p. 17–21, fev. 2015.

SMITH, T. J. et al. American Society of Clinical Oncology 1998 Update of Recommended Breast Cancer Surveillance Guidelines. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 3, p. 1080–1080, mar. 1999.

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

SOUZA, M. F. DE; CÓLUS, I. M. DE S. **Análise dos níveis de metilação e de polimorfismos genéticos dos genes GSTP1, MGMT, VDR e AR em pacientes com câncer de próstata**. Dissertação de Mestrado—Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2013.

SOUZA, M. R. DE; CÓLUS, I. M. DE S. **Análise de polimorfismo de nucleotídeo único nos genes CASP3, CASP9, BCL-2 e NKX3-1 em um estudo do tipo caso-controle na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico para câncer de próstata**. Dissertação de Mestrado—Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2017a.

SOUZA, M. R. DE; CÓLUS, I. M. DE S. **Análise de polimorfismo de nucleotídeo único nos genes CASP3, CASP9, BCL-2 e NKX3-1 em um estudo do tipo caso-controle na busca por marcadores de suscetibilidade e prognóstico para câncer de próstata**. [s.l.] Universidade Estadual de Londrina, 2017b.

STANGELBERGER, A.; WALDERT, M.; DJAVAN, B. Prostate cancer in elderly men. **Reviews in urology**, v. 10, n. 2, p. 111–119, 2008.

SUN, T. et al. Inherited variations in AR, ESR1, and ESR2 genes are not associated with prostate cancer aggressiveness or with efficacy of androgen deprivation therapy. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 19, n. 7, p. 1871–8, jul. 2010.

SWINDLE, P. W.; KATTAN, M. W.; SCARDINO, P. T. Markers and meaning of primary treatment failure. **The Urologic clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 377–401, maio 2003.

TAN, P. Y. et al. Integration of Regulatory Networks by NKX3-1 Promotes Androgen-Dependent Prostate Cancer Survival. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 2, p. 399–414, jan. 2012.

TANG, Y. et al. Genetic variants in PI3K/AKT pathway are associated with severe radiation pneumonitis in lung cancer patients treated with radiation therapy. **Cancer medicine**, v. 5, n. 1, p. 24–32, jan. 2016.

TOURINHO-BARBOSA, R. R.; POMPEO, A. C. L.; GLINA, S. Prostate cancer in Brazil and Latin America: epidemiology and screening. **International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 42, n. 6, p. 1081–1090, 2016a.

TOURINHO-BARBOSA, R. R.; POMPEO, A. C. L.; GLINA, S. Prostate cancer in Brazil and Latin America: epidemiology and screening. **International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology**, v. 42, n. 6, p. 1081–1090, 2016b.

VAN DEN BROECK, T. et al. Biochemical Recurrence in Prostate Cancer: The European Association of Urology Prostate Cancer Guidelines Panel Recommendations. **European Urology Focus**, v. 6, n. 2, p. 231–234, 15 mar. 2020.

VAN LEENDERS, G. J. L. H. et al. The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 44, n. 8, p. E87–E99, 1 ago. 2020.

VANACORE, D. et al. Micrnas in prostate cancer: an overview. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 50240, jul. 2017.

VELEZ, A. A.; HOWARD, M. Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 176, maio 2015.

WALSH, A. L. et al. Digital rectal examination in primary care is important for early detection of prostate cancer: a retrospective cohort analysis study. **The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners**, v. 64, n. 629, p. e783-7, dez. 2014a.

WALSH, A. L. et al. Digital rectal examination in primary care is important for early detection of prostate cancer: a retrospective cohort analysis study. **The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners**, v. 64, n. 629, p. e783-7, dez. 2014b.

WANG, C. et al. The study of the relation of DNA repair pathway genes SNPs and the sensitivity to radiotherapy and chemotherapy of NSCLC. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26526, set. 2016a.

WANG, C. et al. The study of the relation of DNA repair pathway genes SNPs and the sensitivity to radiotherapy and chemotherapy of NSCLC. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26526, set. 2016b.

WANG, G. et al. **Genetics and biology of prostate cancer** **Genes and Development** Cold Spring Harbor Laboratory Press, , set. 2018a.

WANG, G. et al. **Genetics and biology of prostate cancer** **Genes and Development** Cold Spring Harbor Laboratory Press, , set. 2018b.

WANG, L.-E. et al. Roles of genetic variants in the PI3K and RAS/RAF pathways in susceptibility to endometrial cancer and clinical outcomes. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 138, n. 3, p. 377–85, mar. 2012.

WETTERAUER, C. et al. Feasibility of freehand MRI/US cognitive fusion transperineal biopsy of the prostate in local anaesthesia as in-office procedure—experience with 400 patients. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 23, n. 3, p. 429–434, set. 2020.

WRIGHT, J. L. et al. AMACR polymorphisms, dietary intake of red meat and dairy and prostate cancer risk. **The Prostate**, v. 71, n. 5, p. 498–506, abr. 2011.

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

YILMAZ, S. G. et al. Effects of Caspase 9 Gene Polymorphism in Patients with Prostate Cancer. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 31, n. 2, p. 205–208, mar. 2017.

ZHANG, W. et al. The Role of O6-methylguanine-DNA Methyltransferase Polymorphisms in Prostate Cancer Susceptibility: a Meta-Analysis. **Pathology and Oncology Research**, v. 26, n. 2, p. 1201–1209, 1 abr. 2020.

ZINING, J. et al. Genetic polymorphisms of mTOR and cancer risk: a systematic review and updated meta-analysis. **Oncotarget**, v. 7, n. 35, p. 57464–57480, ago. 2016.

## **7. APÊNDICES**

### **APÊNDICE A**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES  
E CONTROLES

## **1. Pacientes**

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

Caso o senhor tenha que realizar prostatectomia (operação de retirada parcial ou total da próstata), solicitamos também sua permissão para que, depois de realizada a cirurgia e da amostra da sua próstata ter sido utilizada pelo laboratório do Hospital para diagnóstico, possamos coletar uma pequena amostra deste tecido que não foi utilizado pelo Hospital, mas que fica armazenado. Desta forma, a coleta do material para análise genética ocorrerá somente após a finalização do seu diagnóstico e não trará riscos adicionais ao seu tratamento.

Pedimos sua autorização para que moléculas (DNA, RNA ou proteínas) obtidas a partir da amostra de sangue e/ou tecido possam ser armazenadas para estudos futuros no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, quando será solicitada nova autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEL para a realização das pesquisas posteriores. O

material obtido ficará armazenado no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, sob responsabilidade dos pesquisadores responsáveis por esta pesquisa. Esclarecemos ainda que a autorização para manutenção destas amostras é por prazo indeterminado, podendo ser cancelada por aviso escrito à responsável pelo Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina.

Solicitamos também sua autorização para que possamos consultar seu prontuário médico (que fica no Hospital do Câncer de Londrina) e obter alguns dados clínicos. Solicitamos-lhe o preenchimento de um questionário sobre seu estilo de vida, histórico de exposição ocupacional, onde o senhor será identificado apenas por um código, preservando sua identidade. Este questionário ficará armazenado no laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina e somente poderão ter acesso a ele os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa.

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

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

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

Os pesquisadores responsáveis por este estudo Ilce Mara de Syllos Cólus e Marilesia Ferreira de Souza, poderão ser contatados pelos telefones 3371-4608, 3371-4191, 9648-1918 ou no endereço rodovia Celso Garcia Cid,

Pr 445, Km 380, Campus Universitário, Centro de Ciências Biológicas, Bloco 11, Laboratório de Mutagenese e Oncogenética. Sempre que solicitados, estarão à sua disposição para esclarecimento de quaisquer questões relacionadas a esta pesquisa. O senhor também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone 3371-2490 ou pelo endereço Rua Robert Koch, 60 – Vila Operária ou pelo e-mail: cep268@uel.br.

Agradecemos-lhe a valiosa colaboração.

---

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

Assinatura do pesquisador responsável

---

Marilesia Ferreira de Souza

Coletor / Entrevistador

## 2. Consentimento pós informado para pacientes

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

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

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

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

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

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

### 3. Controles

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

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

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

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

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

preservando sua identidade. Este questionário ficará armazenado no laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina e somente poderão ter acesso a ele os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa.

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

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

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

No caso de autorizado, o senhor deverá assinar este Termo de Consentimento. Agradecemos-lhe a valiosa colaboração.

---

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

---

Marilesia Ferreira de Souza

Assinatura do pesquisador responsável

Coletor / Entrevistador

#### 4. Consentimento pós-informado para controles

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

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

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

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

Assinatura: \_

---

**APÊNDICE B**  
QUESTIONÁRIO PESSOAL



Código nº \_\_\_\_\_

**HISTÓRICO PESSOAL**

1- Registro hospitalar: \_\_\_\_\_

2- Sexo: ( ) masculino ( ) feminino

3- Qual a cor da sua pele?

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

4- Idade: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

5- Local de nascimento: Paraná ? ( ) SIM ( ) NÃO

Se NÃO: Que região brasileira ? Norte ( ) Sul ( ) Nordeste ( ) Centro-Oeste ( )  
Sudeste ( )

6- Sua moradia é na zona rural ou urbana? ( ) Rural ( ) Urbana

7- Quanto tempo vive neste local? \_\_\_\_\_anos \_\_\_\_\_meses

8- Qual o seu grau de instrução?

( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto ( ) 1º grau completo ( ) 2º grau  
incompleto

( ) 2º grau completo ( ) técnico ( ) profissional ( ) superior

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

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

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

Derivados de petróleo ( )sim ( )não

(querosene, gasolina, solventes,...)

Tintas/ corantes ( )sim ( )não

Indústrias têxteis ou tecelagem ( ) sim ( ) não

Praguicidas / Herbicidas ( )sim ( )não

Radiação ( )sim ( )não

Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...) ( )sim ( )não

Processamento de madeira ( )sim ( )não

Papel ou celulose ( )sim ( )não

Mineração ( )sim ( ) não

Fábrica de sapatos ou curtume ( )sim ( )não

Metalúrgica ( )sim ( )não

Usina de açúcar ou álcool ( )sim ( ) não

Plástico ou borracha         sim         não  
Outras substâncias químicas         sim         não

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

a)  sim    b)  não

### Histórico Tabagista

11- Você fuma atualmente?         SIM         NÃO

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

de meio a 1 maço

mais de um maço

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

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

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

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

a)  SIM    b)  NÃO

### Histórico de Etilismo

16- Você consome bebidas alcoólicas?     SIM     NÃO

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

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

18- Quanto você costuma beber por semana?

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

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

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

20- Quanto você costumava beber por semana?

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

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

SIM     NÃO

### Histórico de Saúde

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

SIM     NÃO     não sabe

Se SIM

Hormônio

Antiinflamatório

Analgésicos

Antipertensivos

Anabolizantes

Outros

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

SIM                       NÃO               não sabe

24 – Você já foi submetido a cirurgia nos testículos?

SIM     NÃO

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

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

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

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

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

Pai     Mãe     Irmão     Filho     Tio     Primo     Outro

28- Qual foi a localização do tumor?

( ) Próstata      ( ) Mama      ( ) Bexiga      ( ) Outro (qual?)

---

29 – Você já teve alguma doença sexualmente transmissível?

( ) SIM      ( ) NÃO

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

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

30- Você segue uma dieta vegetariana? ( ) SIM      ( ) NÃO

31- Você come carne? ( ) SIM      ( ) NÃO

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

Dias/Semana

---

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

**Histórico genético**

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

## 8. ANEXOS

## ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina.



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

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

Prezado(a) Senhor(a):


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

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

Situação do Projeto: **Aprovado**

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

Londrina, 27 de setembro de 2013.



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

