



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BEATRIZ BOCATTE DE MATTOS

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS  
GENES *PTEN* E *mTOR* EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
PRÓSTATA E CONTROLES LIVRES DA DOENÇA**

---

Londrina  
2019



**Universidade Estadual de Londrina**



**Instituto Agronômico do Paraná**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

---

BEATRIZ BOCATTE DE MATTOS

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS  
GENES *PTEN* E *mTOR* EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
PRÓSTATA E CONTROLES LIVRES DA DOENÇA**

BEATRIZ BOCATTE DE MATTOS

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS  
GENES *PTEN* E *mTOR* EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
PRÓSTATA E CONTROLES LIVRES DA DOENÇA**

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

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

Londrina  
2019

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

Mattos, Beatriz Bocatte.

Estudo de associação de polimorfismos nos genes *PTEN* e *mTOR* em pacientes com câncer de próstata e controles livres da doença / Beatriz Bocatte Mattos. - Londrina, 2019.

91 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, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Polimorfismos - Tese. 2. Câncer de Próstata - Tese. 3. Estudo caso-controle - Tese. 4. Parâmetros histopatológicos - Tese. I. de Syllos Cólus, Ilce Mara. II. Losi-Guembarovski, Roberta. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. IV. Título.

BEATRIZ BOCATTE DE MATTOS

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES *PTEN*  
E *mTOR* EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA E  
CONTROLES LIVRES DA DOENÇA**

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 – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Mariana Bizarro dos Reis  
Hospital de Câncer de Barretos – Fundação

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Bruna Karina Banin Hirata  
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL

Londrina, 22 de março de 2019.

## *Dedicatória*

Aos meus pais, que me apoiaram, sempre me motivando, acreditando e fazendo de tudo por mim.

Em especial à minha mãe Nilcéia, que acompanhou de perto todas as minhas batalhas, tristezas e alegrias durante esse período de mestrado. E a Deus que fez com que eu nunca perdesse a fé.

## **AGRADECIMENTOS**

### **APOIO FINANCEIRO**

- Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Convênio 185/2014
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

### **APOIOS INSTITUCIONAIS**

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

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer imensamente e dedicar essa conquista aos meus pais, Paulo César de Mattos e Nilcéia Terezinha Bocatte, que não mediram esforços para a realização dos meus sonhos e pelo apoio incondicional. Tudo é para vocês e por vocês, minha eterna gratidão! Amo vocês para sempre.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Ilce Mara de Syllos Cólus que permitiu que eu trabalhasse em seu laboratório e fizesse parte da sua equipe, desde a iniciação científica. Obrigada pelas broncas, conselhos e cervejinhas pós expediente. Foi uma honra tê-la como “chefa” e sou extremamente grata pela oportunidade.

À minha co-orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Roberta Losi-Guembarovski, por toda ajuda, dicas, conselhos e paciência que teve comigo e pela ótima professora que foi para mim, durante o mestrado, sou muita grata a você.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório: Maiara Paiva, Higor Lopes e Diego Ribeiro, obrigada por toda ajuda, conselhos e momentos de descontração que tivemos. Em especial a Mariana Stinglin e Monyse de Nóbrega, por todo apoio, carinho, conversas e motivação que me deram ao longo desses dois anos, vocês são incríveis meninas, levarei vocês no meu coração, muito, muito obrigada por tudo!

Aos meninos da iniciação científica que ao longo desse período me ajudaram com meus experimentos e pelas descontrações no lab: Larissa Oliveira, Gabriela Weiss, Hector Furini, obrigada!

Aos meus amigos de graduação e da vida que me apoiaram, me motivaram e sempre me chamavam para uma saíndinha para descontrair: Gislaine Camargo, Hellen Ferroni, Bruna Alves, Vitor Alfran, Amanda Figueiredo, Lenora Radis, Heloisa Bergoc e Giovanna Bergoc. Amo vocês, cambada! Em especial a Laís Medina, Caroline Santos, Kenny Gutemberg e Jessica Ferreira, vocês eram os que mais sabiam do que estava acontecendo, de todos os problemas, alegrias e frustrações que passei nesses dois anos, aguentaram uma barra pesada! Serei eternamente grata por todo amor, carinho e paciência que tiveram comigo, vocês têm um lugar especial no meu coração, amo vocês demais!

À minha querida psicóloga Thayse Schery que foi fundamental nesse fim de mestrado, uma profissional exemplar, que me acolheu e entendeu em todas as “minhas surtadas”, obrigada por toda dedicação, carinho e respeito. Não sei o que seria de mim sem você, muuuuito obrigada!

Á Silvia Helena Sofia, coordenadora do Programa de Pós-Graduação e professora, pela disponibilidade em resolver os problemas que eventualmente surgiam. Nunca vou esquecer quando colocou para eu ouvir a música que tem o meu nome e o quanto ficou surpresa por não ter a ouvido antes. Obrigada!

Aos membros da banca examinadora pelo tempo disponibilizado na correção deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório: Melissa e Dário por toda ajuda que dispuseram.

A todos os homens que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa, sem vocês isso não seria possível, obrigada!

E especialmente a Deus.

Muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

*Marthin Luther King*

MATTOS, B. Beatriz. **Estudo de associação de polimorfismos nos genes *PTEN* e *mTOR* em pacientes com câncer de próstata e controles livres da doença.** 2019. 91 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo. Os tumores de próstata (CaP) são doenças multifocais, ou seja, pode haver um tumor prevalente e um ou mais pequenos tumores na mesma região da glândula prostática, havendo diferenças histológicas e biológicas entre estes. Este fato tem exigido a busca por marcadores de suscetibilidade mais específicos para a doença. Dentro deste contexto, o presente estudo teve como objetivo a análise de variantes polimórficas nos genes *PTEN* (rs3830675 e rs2735343) e *mTOR* (rs2536) como possíveis marcadores de suscetibilidade e prognóstico para CaP. Este estudo foi do tipo caso-controle, onde foram estudados 554 indivíduos, sendo 277 livres de CaP (controles) e 277 pacientes diagnosticados com a doença, confirmada por análise histopatológica, e pareados com os controles com nível de PSA menor que 2ng/mL na proporção 1:1 em relação à idade, hábitos tabagista e etilista. As genotipagens do polimorfismo rs3830675 do gene *PTEN* foram realizadas por PCR convencional, seguida de análise do comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP). Para os genes *mTOR* rs2536 e *PTEN* rs2735343 as genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real utilizando sonda de hidrólise. A associação entre a ocorrência de CaP com as variantes polimórficas foi calculada por *Odds Ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95%, obtida por regressão logística multivariada dos dados. Nenhuma associação significativa foi observada entre o rs3830675 do gene *PTEN* com suscetibilidade ao CaP e com nenhum dos parâmetros clínico (PSA) e histopatológicos, bem como quando este mesmo polimorfismo foi analisado em associação com o rs2536 do gene *mTOR*. Portadores do genótipo CC do gene *mTOR* apresentaram maior suscetibilidade ao CaP ( $p=0,010$ ), proteção ao para o aparecimento de bilateralidade tumoral ( $p=0,026$ ) e proteção para níveis de PSA mais altos ( $p=0,037$ ). Foram analisados os haplótipos dos dois polimorfismos do gene *PTEN* e observou-se que não havia desequilíbrio de ligação entre os mesmos. Quando inferidos seus haplótipos, apenas o haplótipo INS/G (com inserção para o rs3830675 e alelo G do rs2735343) apresentou efeito protetor para o aparecimento de CaP ( $p=0,022$ ). O haplótipo WT/C foi de suscetibilidade para invasão de vesícula seminal ( $p=0,015$ ) e invasão de linfonodos ( $p=0,014$ ), enquanto INS/G ( $p=0,015$ ) foi de suscetibilidade para invasão de linfonodos, demonstrando que estes haplótipos podem ter implicações na suscetibilidade e prognóstico do CaP, o que merece investigações complementares.

**Palavras-chave:** PCR. Haplótipos. Suscetibilidade. Desequilíbrio de ligação. Variante alélica.

MATTOS, B. Beatriz. **Association study of polymorphisms in *PTEN* and *mTOR* genes in patients with prostate cancer and disease free controls.** 2019. 91 p. Dissertation (Master's in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Cancer is one of the biggest public health problems in the world. Prostate tumors (PCa) are multifocal diseases, that is, there may be a prevalent tumor and one or more small tumors in the same region of the prostate gland, there being histological and biological differences between them. This fact has required the search for more specific markers of susceptibility for the disease. In this context, the present study aimed to analyze polymorphic variants in *PTEN* genes (rs3830675 and rs2735343) and *mTOR* (rs2536) as possible markers of susceptibility and prognosis for PCa. This study was a case-control study, in which 554 subjects were studied, 277 free of PCa (controls) and 277 patients diagnosed with the disease, confirmed by histopathological analysis, and paired with controls with a PSA level less than 2 ng/mL in the ratio 1:1 in relation to age, smoking and alcohol habits. Genotyping of the rs3830675 polymorphism of the *PTEN* gene was performed by standard PCR, followed by restriction fragment length (PCR-RFLP) analysis. For the *mTOR* rs2536 and *PTEN* rs2735343 genes genotypes were performed by real-time PCR using hydrolysis probe. The association between the occurrence of PCa and the polymorphic variants was calculated by *Odds Ratio* (OR) with 95% confidence interval, obtained by multivariate logistic regression of the data. No significant association was found between rs3830675 of the *PTEN* gene for susceptibility to PCa and none of the clinical (PSA) and histopathological parameters, as well as when this same polymorphism was analyzed in association with rs2536 of the *mTOR* gene. Patients with the *mTOR* CC genotype showed higher susceptibility to PCa ( $p = 0.010$ ), protection for tumor bilaterality ( $p = 0.026$ ), and protection for higher PSA levels ( $p = 0.037$ ). The haplotypes of the two polymorphisms of the *PTEN* gene were analyzed and there was no linkage disequilibrium between them. When their haplotypes were inferred, only the INS/G haplotype (with insertion for rs3830675 and G allele of rs2735343) had a protective effect for the appearance of PCa ( $p = 0.022$ ). The WT /C haplotype was of susceptibility for seminal vesicle invasion ( $p = 0.015$ ) and invasion of lymph nodes ( $p = 0.014$ ), whereas INS/G ( $p = 0.015$ ) was susceptible to lymph node invasion, demonstrating that these haplotypes may have implications for the susceptibility and prognosis of PCa, which warrants further investigation.

**Keywords:** PCR. Haplotypes. Susceptibility. Linkage disequilibrium. Allelic variant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Posição anatômica da próstata humana com suas diferentes zonas .....	22
<b>Figura 2</b> - Frequências de incidência e mortalidade em homens com CaP em diferentes regiões do mundo .....	24
<b>Figura 3</b> - Diferentes métodos para triagem e diagnóstico do CaP.....	27
<b>Figura 4</b> - Classificação dos padrões de diferenciação histopatológica da próstata para determinação do Gleason .....	29
<b>Figura 5</b> - Estadiamento do CaP baseado na classificação TNM (tamanho, acometimento de linfonodos e presença de metástase) .....	30
<b>Figura 6</b> - Exemplos de polimorfismos genéticos: SNP, Inserção e Deleção.....	36
<b>Figura 7</b> - Vias de sinalização compartilhadas pelos genes <i>PTEN</i> e <i>mTOR</i> .....	38
<b>Figura 8</b> - Estrutura da proteína PTEN indicando suas respectivas regiões .....	39
<b>Figura 9</b> - Regulação negativa pela proteína <i>PTEN</i> na via do <i>PI3K/AKT</i> .....	40
<b>Figura 10</b> - Representação esquemática dos dois complexos <i>mTOR</i> .....	42
<b>Figura 11</b> - Visão geral das vias de sinalização <i>mTORC1</i> e <i>mTORC2</i> .....	44
<b>Figura 12</b> - Perfil eletroforético do polimorfismo do gene <i>PTEN</i> IVS4 rs3830675 em gel de agarose (2%) .....	49
<b>Figura 13</b> - Genotipagem do rs2536 do gene <i>mTOR</i> pela técnica de PCR em tempo real utilizando sistema TaqMan® .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Classificação clínica TNM para o CaP .....	31
<b>Tabela 2</b> - Genes selecionados, localização cromossômica e variantes alélicas investigadas no presente estudo .....	37
<b>Tabela 3</b> - Análise univariada das características clínicas e socioculturais dos pacientes com CaP e controles livres da doença .....	53
<b>Tabela 4</b> - Frequências alélicas e genótípicas dos SNPs dos genes <i>PTEN</i> e <i>mTOR</i> nos pacientes com CaP (n=277) e controles livres da doença (n=277) em estudo de associação do tipo caso- controle .....	54
<b>Tabela 5</b> - Análise das características histopatológicas, dos parâmetros prognósticos e níveis de PSA das amostras tumorais dos pacientes com CaP (n=277) .....	56
<b>Tabela 6</b> - Frequências genótípicas dos genes <i>PTEN</i> e <i>mTOR</i> associados ao parâmetro clínico (nível de PSA) e aos parâmetros histopatológicos (extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, invasão perineural, invasão de linfonodo, estadiamento, escore de Gleason e bilateralidade).....	57
<b>Tabela 7</b> - Análise univariada das características clínicas e sócio-culturais dos pacientes com câncer de próstata e indivíduos controles, considerando somente os portadores dos SNPs 2735343 e 3830675 do gene <i>PTEN</i> (n=246) .....	59
<b>Tabela 8</b> - Frequências dos quatro haplótipos dos polimorfismos rs3830675 e rs2735373 do gene <i>PTEN</i> em pacientes com CaP (n=246) e controles livres da doença (n=246).....	60
<b>Tabela 9</b> - Modelos dominante, recessivo e aditivo para os quatro haplótipos dos dois polimorfismos do gene <i>PTEN</i> associados ao CaP após regressão logística univariada .....	60
<b>Tabela 10</b> - Associação dos haplótipos nos modelos dominante e recessivo do gene <i>PTEN</i> com proteção ao CaP em pacientes portadores da doença após regressão logística multivariada .....	61
<b>Tabela 11</b> - Associação significativa do teste de correlação Tau-b de Kendall dos haplótipos rs3830675 e rs2735343 do gene <i>PTEN</i> com suscetibilidade para invasão de vesícula seminal e invasão de linfonodos em pacientes com CaP .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADT	Do inglês, <i>Androgen Deprivation Therapy</i>
AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
AR	Do inglês, <i>Androgen Response Element</i>
CaP	Cancer de Próstata
CRPC	Do inglês, <i>Castrate-Resistant Prostate Câncer</i>
DE	Disfunção Erétil
DHT	Di-hidrotestosterona
DL	Desequilíbrio de Ligação
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administraton</i>
GWAS	Do inglês, <i>Genome Wide Association Studies</i>
INCA	Instituto Nacional do Cancer
ISUP	Do inglês, <i>International Society of Urological Pathology</i>
KLK3	Peptidase 3 de Calcreínas
MAPK	Proteínas Quinases
miRNA	microRNA
MMAC	Do inglês, <i>Mutated in Mutiple Advance Cancers</i>
NCBI	Do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCI	Do inglês, <i>The National Cancer Institute</i>
OR	Do inglês, <i>Odds Ratio</i>
PAP	Do inglês, <i>Prostatic Acid Phosphatase</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	Análise do Comprimento do Fragmento de Restrição
PR	Prostatectomia Radical
PIP2	Do inglês, <i>Phosphatidylinositol (4,5) - Bisphosphate</i>
PIP3	Do inglês, <i>Phosphatidylinositol (3,4,5) – Trisphosphate</i>
PI3K	Do inglês, <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PSA	Do inglês, <i>Prostate Specific Antigen</i>
PTEN	Do inglês, <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
SBU	Sociedade Brasileira de Urologia
SNPs	Do inglês, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TH	Terapia Hormonal

TR	Toque retal
TSGs	Do inglês, <i>Tumor Supressor Genes</i>
VNTR	Do inglês, <i>Variable number of tandem repeats</i>
3'UTR	Do inglês, <i>3'Untranslated region</i>
5'AR	Enzima 5 $\alpha$ Redutase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	20
2.1	Próstata .....	20
2.1.1	Epidemiologia e câncer de próstata .....	22
2.1.2	Fatores de risco para o desenvolvimento de CaP .....	24
2.1.3	Diagnóstico e tratamento .....	26
2.2	Biomarcadores moleculares para CaP .....	33
2.2.1	Polimorfismos Genéticos.....	35
2.2.2	Genes candidatos a biomarcadores para CaP .....	37
2.2.3	Haplótipo e desequilíbrio de ligação .....	45
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
3.1	Objetivo Geral .....	46
3.2	Objetivos Específicos .....	46
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
4.1	CrITÉRIOS de seleção para o estudo do tipo caso-controle.....	47
4.2	Análise Molecular.....	47
4.2.1	Extração de DNA.....	47
4.2.2	Genotipagem do gene <i>PTEN</i> IVS4 rs3830675 .....	48
4.2.3	Genotipagem dos genes <i>mTOR</i> e <i>PTEN</i> rs2735343 .....	49
4.3	Análise Estatística.....	50
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	52
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68

<b>8</b>	<b>APÊNDICES</b> .....	80
	APÊNDICE 1 - Associação entre os genótipos dos genes <i>PTEN</i> rs3830675 e <i>mTOR</i> rs2536 em pacientes com CaP (n=277) e indivíduos livres da doença (n=277) para o modelo ajustado .....	80
	APÊNDICE 2 - Associação entre genótipos dos genes <i>mTOR</i> rs2536 e <i>PTEN</i> rs2735343 em pacientes com CaP (n=246) e indivíduos livres da doença (n=246) para o modelo ajustado.....	81
<b>9</b>	<b>ANEXO</b> .....	82
	ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido para pacientes .....	82
	ANEXO B- Consentimento pós informado para pacientes com CaP e livres de neoplasia (controles).....	84
	ANEXO C- Termo de consentimento livre e esclarecido para indivíduos controles.....	85
	ANEXO D- Questionário Pessoal .....	87
	ANEXO E- Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEL .....	92

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer tem se tornado o maior problema de saúde pública em todo mundo (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Existem determinados tipos de câncer que acometem homens e mulheres em frequências distintas; por exemplo, em mulheres, os três tipos mais frequentes são os de mama, cólon e pulmão. Em homens, são os tumores de pulmão, próstata e cólon (GLOBOCAN, 2018). Quando se analisa a frequência do câncer para ambos os sexos, o câncer de próstata (CaP) é o quarto tipo de tumor sólido mais frequente no mundo e o quinto em causa de morte em homens (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) indicam que o CaP é o segundo tipo de câncer mais frequente entre os homens, ficando atrás apenas do câncer de pele não-melanoma, e o quarto tipo mais incidente no país; sua expectativa para o ano de 2019 foi de 68.220 novos casos (INCA, 2018).

O CaP é uma doença considerada de terceira idade, pois em grande parte dos casos acomete homens na faixa dos 67 anos (BRAWLEY, 2012). A estimativa para o ano de 2020 em homens acima de 65 anos no Brasil é de aproximadamente 53.058 mil novos casos (GLOBOCAN, 2018).

O aspecto clínico do CaP é bastante heterogêneo, pois a doença pode ser assintomática e o paciente permanecer com ela em estágio latente, sem progressão; ou de forma contrária, algumas vezes o tumor pode se desenvolver rapidamente, evoluindo para a forma metastática (CRAWFORD, 2009).

Atualmente dois exames complementares vêm sendo realizados na triagem do CaP, o nível do antígeno prostático específico (do inglês – *Prostate Specific Antigen*- PSA) e o toque digital retal. Apesar do PSA ser válido como um marcador para CaP, uma de suas limitações é sua baixa especificidade, pois também pode apresentar níveis elevados em processos benignos, como na hiperplasia prostática ou até mesmo na inflamação da próstata, levando a uma preocupação com os diagnósticos excessivos e tratamentos desnecessários de pacientes com a forma latente da doença (TABAYOYONG; ABOUASSALY, 2015). Além disso, foi demonstrado que a inclusão deste exame na triagem não promoveu impacto na redução da mortalidade devido à doença (SAINI, 2016).

Apesar dos fatores, acima mencionados, indicarem que o exame de PSA como forma de rastreamento para o CaP não é o mais adequado, ele ainda é a melhor ferramenta para o rastreamento da doença, até que outro marcador esteja disponível para uso clínico (ROOBOL; CARLSSON, 2013). Dessa maneira, a descoberta de novos marcadores é de extrema

necessidade para tornar o diagnóstico do CaP mais preciso, e isto tem estimulado pesquisas no mundo inteiro (TORRE et al., 2015). Assim, as investigações têm buscado por novos marcadores moleculares que sejam sensíveis e específicos para diferenciar as formas latente e agressiva da doença, auxiliando na detecção e na escolha do melhor tratamento (ESFAHANI; ATAEI; PANJEHPOUR, 2015).

Perante os desafios de suscetibilidade, diagnóstico e prognóstico do CaP, o presente estudo teve como objetivo contribuir para busca por novos marcadores moleculares para esta doença e, conseqüentemente, para a melhora da conduta terapêutica com o paciente. Também esperamos contribuir para a compreensão dos fatores biológicos que possam influenciar no desenvolvimento e progressão deste tipo tumoral. Foram escolhidos os genes *PTEN* e *mTOR* para se investigar, respectivamente, um polimorfismo de inserção e um de nucleotídeo único (SNP), como potenciais marcadores para este carcinoma.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Próstata

A próstata é uma glândula exócrina masculina, anatomicamente localizada no compartimento subperitoneal entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal, posterior à sínfise púbica, anterior ao reto, e inferior à bexiga. O desenvolvimento da glândula se inicia durante o período gestacional. Tem aproximadamente 1,5g ao nascimento e permanece dessa maneira até a puberdade precoce, quando a glândula chega a ter 6g de tamanho em indivíduos adultos e se assemelha em tamanho a uma noz (VIGNOZZI et al., 2014; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011).

O crescimento da glândula prostática depende de hormônios masculinos andrógenos, principalmente a testosterona, principal regulador do crescimento e manutenção do epitélio prostático normal, produzida nos testículos. Este hormônio atravessa a membrana plasmática das células e no citoplasma é convertido em di-hidrotestosterona (DHT) pela ação da enzima 5 $\alpha$  redutase (5AR). A DHT, principal hormônio trófico da próstata, atua ativando o receptor de andrógeno (AR do inglês- *androgen receptor*), com importante papel na transcrição de genes alvo, como os associados com proliferação e progressão celular e o gene (PSA) (MEIKLE; SMITH; WEST, 1985; CUNHA et al., 2004).

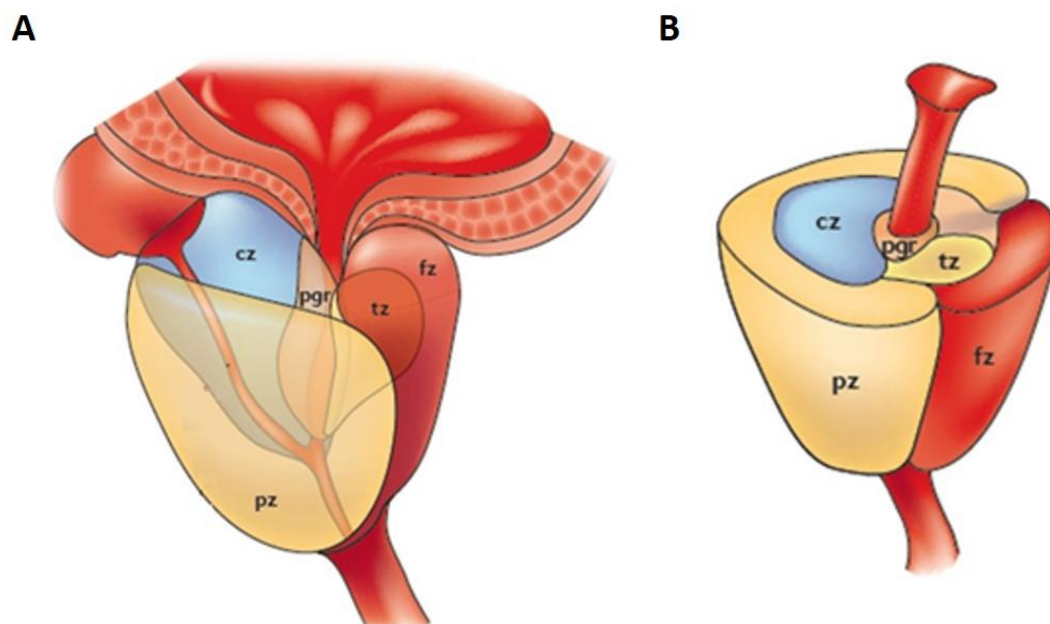
A principal função da próstata é secretar a glicoproteína PSA, que é ligeiramente ácida (pH de aproximadamente 6,4) e constitui 20% do sêmen. O PSA é codificado pelo gene peptidase 3 de calcreínas (*KLK3*), o que faz essa glicoproteína ser também denominada de calcreína-3 (BALK; KO; BUBLEY, 2003). É produzida nas células do epitélio colunar, passa pelas células basais, atravessa o músculo liso, e age fragmentando e solubilizando as proteínas fibronectina e seminogelina, liquefazendo o coágulo seminal durante o processo de ejaculação (LILJA.; ULMERT.; VICKERS, 2008) e auxiliando, conseqüentemente, na motilidade espermática (ARNETH, 2009; ÜRE; CAN, 2014).

A próstata consiste de tecido glandular com epitélio colunar pseudo-estratificado inserido em um estroma fibromuscular. Quatro tipos celulares são encontrados no epitélio prostático: a) basais, sendo células precursoras das secretoras; não estão em grande quantidade em relação às células secretoras, porém, quando ausentes, são usualmente marcadores para pior prognóstico de CaP; b) secretoras, que possuem ductos e são responsáveis pela função fisiológica da glândula e produção de fosfatase ácida e PSA; c) neuroendócrinas, associadas com o crescimento celular bem como com a regulação da

secreção prostática; produtoras de substâncias como serotonina, hormônio tireotrófico e calcitonina; d) transicionais, localizadas ao redor da uretra, região que compõe cerca de 5% da próstata e é formada por dois ductos mais complexos e sistema acinar mais desenvolvido (JOSHUA et al., 2008).

O estroma fibromuscular envolve quatro regiões (zonas) com diferenças anatômicas, bem como funções biológicas distintas: periférica, transicional, central e anterior, sendo esta última também denominada fibromuscular (Figura 1) (JOSHUA et al., 2008). Dentro de cada uma dessas zonas há uma probabilidade diferente para a ocorrência de tumores malignos ou benignos (ZIADA; ROSENBLUM, CRAWFORD, 1999; CRAWFORD, 2009). A zona periférica está localizada predominantemente na região dorsal e próxima à uretra, constituindo cerca de 70% do volume prostático. Aproximadamente 80% dos casos de CaP acometem a zona periférica, mais precisamente a região dorsolateral, sendo que menos de 30% dos tumores ocorrem na zona transicional, que apresenta quase que exclusivamente hipertrofia prostática benigna (ZIADA; ROSENBLUM, CRAWFORD 1999; CRAWFORD, 2009). Dados indicam que quando o tumor está nesta região da zona transicional é menos agressivo e também apresenta uma baixa recidiva bioquímica (elevação dos níveis de PSA no sangue após a realização da cirurgia de retirada da próstata) (MCNEAL et al., 1988).

**Figura 1** - Posição anatômica da próstata humana com suas diferentes zonas.



A: posição anatômica da próstata; B: corte transversal da glândula com suas diferentes zonas: cz: zona central; fz: zona fibromuscular; tz: zona de transição; pz: zona periférica; pgr: região periuretral.

**Fonte:** Adaptado de Marzo et al. (2007)

O CaP se desenvolve em vários estágios. Inicia-se com a proliferação de um epitélio atrófico ou benigno, progredindo para o adenocarcinoma através de estágios histologicamente definidos. Grande parte dos tumores fica confinado à próstata durante muitos anos e nunca se desenvolve em estágios mais graves da doença, como a metástase (LUO; YU, 2003).

O desenvolvimento e a progressão do CaP podem ser causados por inúmeras alterações genéticas, porém, os andrógenos têm um papel fundamental no aparecimento de tumores nesta glândula. Isso se deve ao fato de que durante o curso clínico da doença, pode ocorrer uma alteração de tumor andrógeno responsivo para um tumor andrógeno não responsivo. Além disso, o CaP refratário a andrógeno geralmente não tem uma boa resposta à terapia (LUO; YU, 2003).

### 2.1.1 Epidemiologia e câncer de próstata

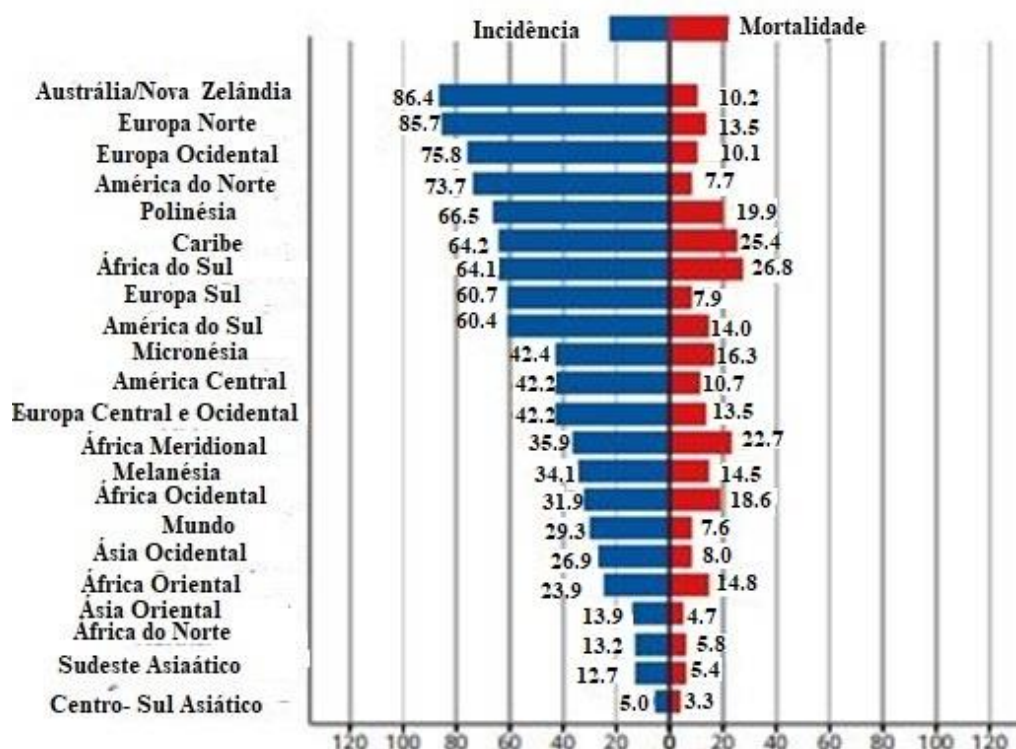
O CaP é o quarto tipo de tumor mais incidente no mundo, sendo o terceiro mais comum entre homens que vivem na Europa, Ásia, América do Norte e em algumas regiões da África (GLOBOCAN, 2018). No Brasil os dados indicam que o CaP é o segundo tipo tumoral mais incidente entre os homens, atrás apenas do câncer de pele não-melanoma. Em valores

absolutos e considerando ambos os sexos, é o segundo tipo mais comum de neoplasia maligna (INCA, 2018).

Essa doença é diagnosticada em menos de 0,1% dos homens com 50 anos, sendo que em 85% dos casos a doença é descoberta após os 65 anos de idade. A taxa entre populações com etnias diferentes varia muito. Por exemplo, na Ásia, especialmente os chineses, apresentam uma baixa incidência, sendo de 1 a 9 casos a cada 100.000 homens. Já na América do Norte a taxa é muita elevada, sendo confirmados 137 casos a cada 100.000 homens. Essas diferenças podem ter relação com diferentes fatores, como idade, exposição a fatores de risco, cuidados com a saúde, entre outros (GRONBERG, 2003). A incidência do CaP nos países desenvolvidos é maior do que a dos países em desenvolvimento. Embora a incidência e a mortalidade variem substancialmente na população, a australiana é a mais acometida (Figura 2) (REBBECK, 2017).

No Brasil, a expectativa para o ano de 2019 é de 68.220 novos casos, de acordo com O INCA, órgão do Ministério da Saúde (INCA, 2018). Tem sido observada uma elevação no número de casos, o que pode ser justificado em parte, pelo fato de que o país está investindo em métodos de diagnóstico, no aumento da expectativa de vida entre homens e no maior acesso da população à informação sobre a doença (INCA, 2018).

**Figura 2** - Frequências de incidência (azul) e mortalidade (vermelho) em homens com CaP em diferentes regiões do mundo.



Taxa padronizada por 100.000 homens.

Fonte: Adaptado de Globocan (2018)

### 2.1.2 Fatores de risco para o desenvolvimento do CaP

O desenvolvimento do CaP varia substancialmente de acordo com idade, fatores geográficos, suscetibilidade genética, exposição ambiental e obesidade, considerados fatores de risco primários no desenvolvimento da doença (REBBECK, 2017; O'CONNOR, 2015).

O fator de risco mais conhecido para CaP é a idade, uma vez que a doença é raramente diagnosticada antes dos 45 anos. Nas comunidades ocidentais, a incidência é maior principalmente em homens entre os 65 e 75 anos. Dados da literatura demonstram que a alta incidência associada ao aumento da idade pode ocorrer em consequência do acúmulo de danos no DNA (O'CONNOR, 2015). Uma meta-análise feita a partir de 29 estudos realizados em mais de 20 países, que consistiu em autópsia de homens que morreram por outras causas e apresentavam alterações malignas na próstata, demonstrou que 5% possuíam menos de 30 anos e 59% mais de 79 anos. Isso confirma um dos maiores dilemas atuais no diagnóstico de CaP: a maioria dos homens que sofre de CaP morre com a doença e não devido à doença. Um

dos principais objetivos da pesquisa neste tipo de tumor maligno é a identificação de testes discriminatórios que possam distinguir com precisão os casos de CaP letal e indolente (BELL et al., 2015).

Além da idade, o histórico familiar de câncer é outro fator de risco bem estabelecido, pois está relacionado com fatores genéticos e fatores ambientais compartilhados, como por exemplo, condição socioeconômica, hábitos alimentares e comportamentos culturais (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016). O CaP familiar é uma doença muito heterogênea, com contribuições de muitos loci genéticos, quando comparado a outros tipos de tumores malignos (LIU et al., 2011). A identificação dos genes envolvidos na transformação maligna da próstata parece ser muito mais problemática do que, por exemplo, para o câncer de mama. O CaP hereditário é associado ao histórico da doença em pelo menos dois parentes de primeiro grau afetados na família, bem como com diagnóstico antes dos 55 anos de idade. Foi estimado que 5-10% dos casos de CaP são hereditários, sendo caracterizados pela herança de mutações em genes de alta penetrância, mas que ainda não são bem estabelecidos (LYNCH et al., 2016).

Assim, atualmente é possível distinguir três formas epidemiológicas desse tipo tumoral: i) esporádica, ocorre de maneira aleatória na população; ii) familiar, caracterizada pela ocorrência imprevisível de casos na família, quando, por exemplo dois irmãos têm CaP; iii) hereditária, homens que possuem parentes de primeiro grau afetados possuem um risco aumentado de serem diagnosticados com a doença, pela presença de mutações em genes de alta penetrância (CARTER et al., 1993).

A incidência do CaP também varia de acordo com a ancestralidade da população. Os homens afrodescendentes possuem níveis elevados de testosterona, que foram associados com aumento de risco de CaP. Este tipo de tumor é menos incidente em homens de descendência asiática, enquanto aqueles que vivem na América do Norte e no Norte Europeu têm um alto risco para CaP. No entanto, resultados de estudos de migração reportaram baixa incidência em homens asiáticos e alta incidência em asiáticos que migraram para os EUA, devido a mudanças no estilo de vida e à exposição a novos fatores de risco. Entretanto, a taxa de incidência ainda é menor em asiáticos que vivem na América do Norte quando comparados aos americanos nativos (COOK; GOLDOFT, SCHWARTZ et al., 1999).

A obesidade é um fator frequentemente associado ao CaP avançado e este fato pode ser consequência do sobrepeso influenciando os níveis de hormônios esteroides; também está associada com um estado inflamatório crônico de baixo grau, bem como com o aumento do estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são energeticamente mais

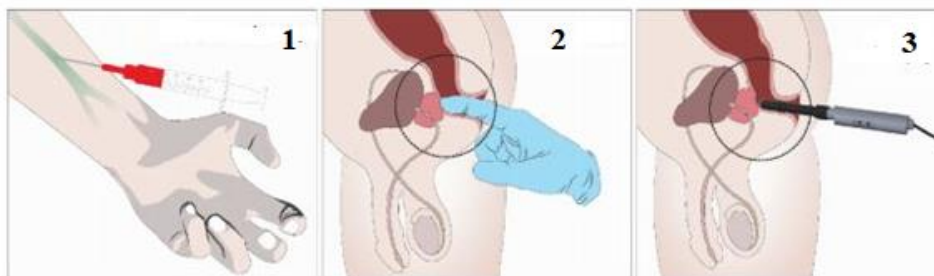
reativas que o oxigênio molecular, ou seja, são compostos que têm maior facilidade em reagir com outras substâncias podendo gerar uma cascata de reações. Dentre as vias reguladas pelas EROs destacam-se as das proteínas quinase (MAPK) e do fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) (DHILLON et al., 2007). Durante o estresse oxidativo há aumento de EROs, que podem desregular diversas vias de transdução de sinais e diversas etapas da transformação e progressão tumoral, como apoptose, potencial replicativo, angiogênese, invasão, inflamação e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A ativação das vias inflamatórias induz a secreção de citocinas, que leva à desregulação de genes e pode promover o desenvolvimento do câncer (SFANOS; ISAACS, MARZO, 2013).

### **2.1.3 Diagnóstico e tratamento**

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

Atualmente estão disponíveis alguns exames de triagem e métodos de diagnóstico para o CaP. Entre os exames de triagem destacam-se o ensaio bioquímico – dosagem sérica de PSA a partir do sangue periférico (MELICHAR et al., 2013) e o exame de toque retal (TR) (CHODAK; KELLER; SCHOENBERG, 1988); já o diagnóstico é feito por meio de biopsia por agulha guiada por ultrassonografia transretal (GHAI; TOI, 2012) (Figura 3).

**Figura 3** - Diferentes métodos para triagem e diagnóstico do CaP.



1-Ensaio bioquímico: coleta de sangue para a dosagem sérica de PSA; 2- Toque retal (TR) para análise de textura e tamanho da próstata; 3- Biópsia por agulha por ultrassonografia transretal, para retirada de fragmentos da próstata.

**Fonte:** Adaptado de Kang et al., (2015)

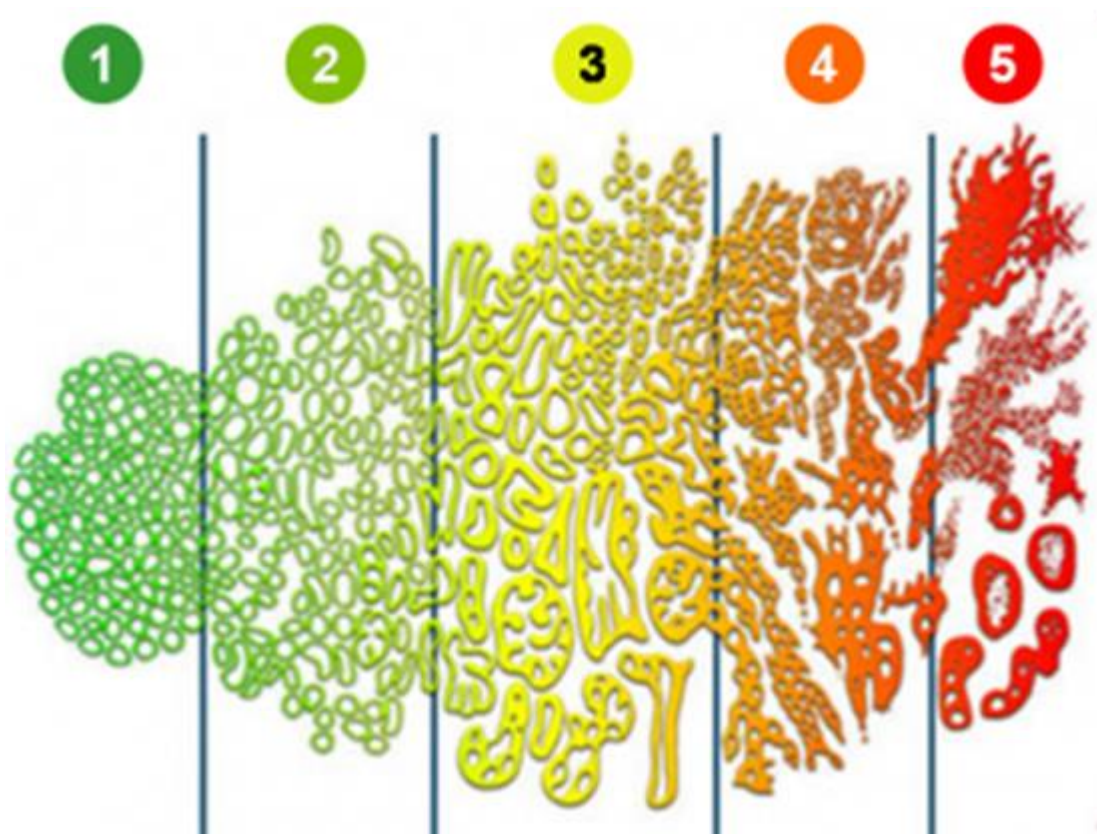
Desde a aprovação há 25 anos pela *Food and Drug Administration* dos EUA (FDA), do ensaio bioquímico que mede a quantidade de PSA no sangue total do paciente, a concentração maior que 4 ng/mL é considerada de risco para CaP. O exame de toque retal (TR) inspeciona a condição da próstata, examinando sua textura e tamanho (MOORE et al., 1992; MELICHAR, 2013). Sua importância se justifica pelo fato de que cerca de 80% das transformações malignas ocorrem nas células secretoras da região periférica da próstata, que pode ser apalpada através do reto. No entanto, o exame de TR possui limitações, podendo apresentar um resultado falso-negativo quando o tumor não está localizado na zona periférica, que neste caso mantém a característica conservada da glândula na periferia (HALPERN et al., 2017). A Sociedade Brasileira de Urologia (SBU) recomenda que homens negros ou que possuam histórico familiar de CaP façam exames de triagem a partir dos 45 anos; caso não possuam essas características, os exames devem ser realizados anualmente a partir dos 50 anos (SBU, 2018).

Quando os dois testes de triagem sugerem existência de tumor, é indicada a realização de biópsia por agulha. Atualmente esta biópsia é realizada preferencialmente por via transretal guiada por ultrassonografia, o que oferece uma visualização da glândula e pode orientar biópsias subsequentes (CHODAK; KELLER; SCHOENBERG, 1988; PRAKASH et al., 2013). Após ser realizada a análise microscópica do material obtido da biópsia, as células prostáticas são classificadas morfológicamente (VANACORE et al., 2017). Para cada diferença morfológica celular, são atribuídos graus numéricos que vão de 1 a 5, sendo o grau 1 referente a células mais diferenciadas e o grau 5 a células mais indiferenciadas (Figura 4). A partir desses valores é calculado o escore de Gleason (GLEASON, 1992), que varia de 2 a 10. O escore final é uma combinação de duas graduações diferentes e mais abundantes observadas na análise morfológica da amostra. Por exemplo, se há prevalência de células grau

4 e grau 5, o escore de Gleason será 9. Quanto mais baixo o escore de Gleason, melhor será o prognóstico do paciente (LOBLER et al., 2012).

Com os avanços dos estudos na área médica e tecnológica, a Sociedade Internacional de Urologia Patológica (ISUP) (do inglês, *International Society of Urological Pathology*) adotou em 2016 um novo sistema de classificação para o CaP, que foi incorporado à classificação atual da OMS (EPSTEIN et al., 2016). A nova classificação passou a considerar que os padrões 1 e 2 eram alterações precoces, que não correspondiam necessariamente ao câncer, e foram retiradas da classificação. Assim, atualmente o grau varia de 6 ( $3+3=6$ ) até 10 ( $5+5=10$ ) (HUMPHREY et al., 2016). Tumores considerados de baixo grau são aqueles com escore 6, tumores com escore 7 são classificados como grau intermediário, pois podem resultar da soma  $3+4$  ou  $4+3$ , sendo este último de pior prognóstico, porque o padrão histológico mais agressivo (4) é o predominante (HEIDENREICH et al., 2011; MOHLER et al., 2012; THOMPSON et al., 2007). Já os tumores de escores 8, 9 e 10 são de alto grau. Em biópsias, o escore se dá pela soma do padrão mais prevalente (padrão primário) com o padrão de mais alto grau (padrão secundário), pois a ISUP em uma conferência de consenso, definiu que o padrão secundário é definido pelo grau morfológico mais próximo de câncer observável na amostra. Em espécimes de prostatectomia radical, o escore é definido pela soma do padrão mais comum com o segundo mais comum (EPSTEIN et al., 2005).

**Figura 4** - Classificação dos padrões de diferenciação histopatológica da próstata para determinação do escore de Gleason.

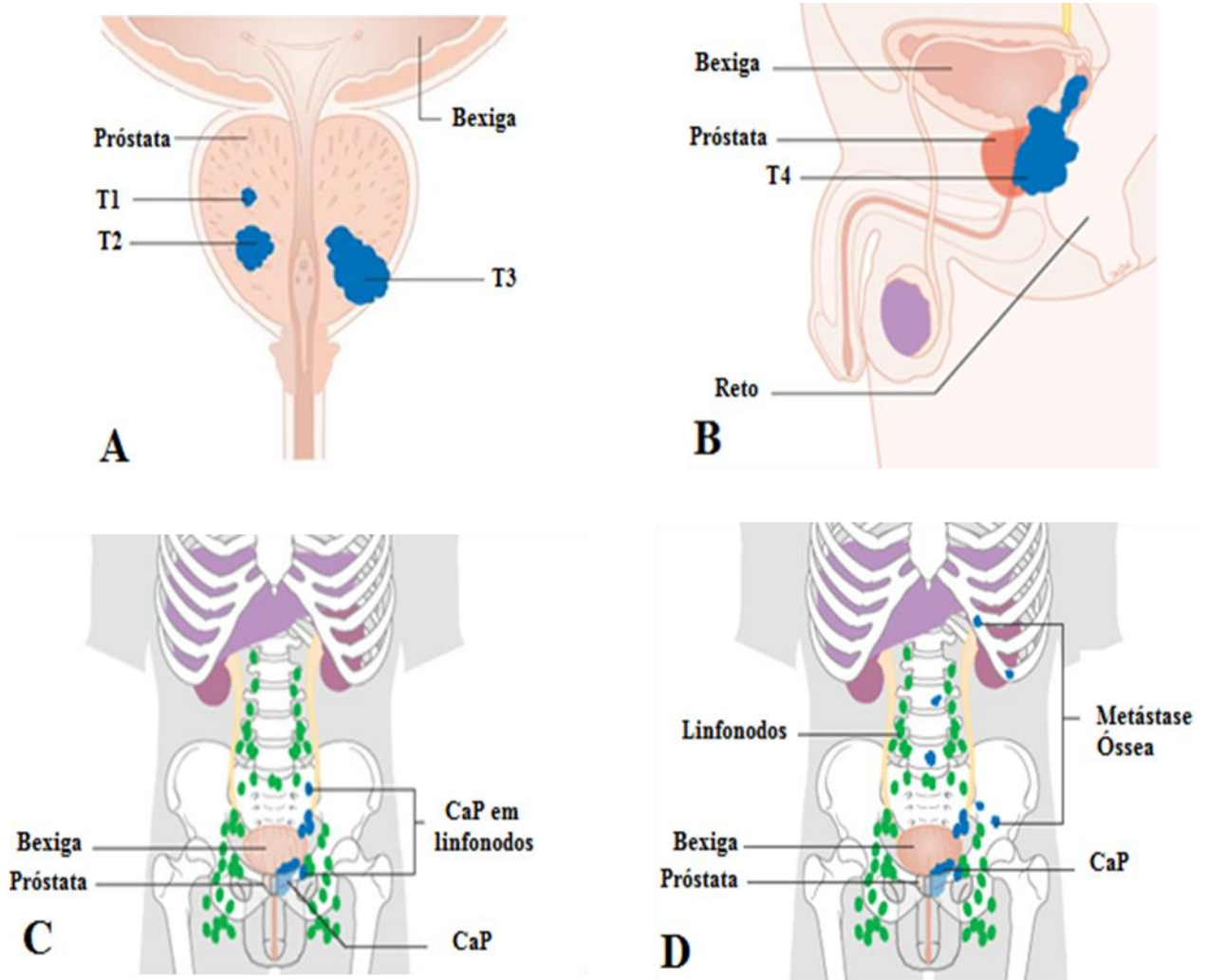


Grau 1: Glândulas pequenas e uniformes; muito diferenciado; 2: Presença de estroma entre as glândulas; 3: Margens distintamente infiltradas e moderadamente diferenciadas; 4: Massas irregulares de glândulas neoplásicas; pouco diferenciadas; 5: Apenas ocasionalmente ocorre formação de glândulas; indiferenciado.

**Fonte:** Gleason (1992)

O estadiamento patológico determina a doença localmente avançada a partir de um sistema de classificação TNM determinado pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC 2010), onde se leva em conta o tamanho do tumor primário (T), variando de Tx até T4; comprometimento dos linfonodos (N) variando de Nx a N1 e a existência de metástase (M) variando de M0 a M1 (Figura 5 e Tabela 1) (HASS et al., 2008; SHUKLA et al., 2015).

**Figura 5** - Estadiamento do CaP baseado na classificação TNM (tamanho, acometimento de linfonodos e presença de metástase).



A e B) T1:tumor muito pequeno; T2: tumor completamente dentro da próstata; T3: tumor se estende para fora da cápsula prostática; T4: Tumor invade estruturas adjacentes, que não as vesículas seminais (colo vesical, esfíncter externo, músculos elevadores e /ou parede pélvica); C) Presença de invasão de linfonodos regionais (nódulos da pelve verdadeira, os quais são essencialmente os nódulos abaixo da bifurcação ilíaca comum); D) Presença de metástase a distância (tumor presente em mais de uma localização).

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

**Tabela 1** - Classificação clínica TNM para o CaP.

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

Fonte: Cancer Research UK (2016)

Atualmente existem opções amplamente aceitas para o tratamento desse tipo tumoral, que incluem cirurgia (prostatectomia radical - PR), terapia hormonal (TH), radioterapia e quimioterapia. Esses tratamentos podem ser aplicados ao paciente de forma individual, sequencial ou em combinação (WOLFF et al., 2015).

A prostatectomia radical envolve a remoção da próstata juntamente com tecidos circundantes e vesículas para a redução de testosterona circulante; é um dos métodos mais relevantes para o tratamento de pacientes que possuem a doença confinada à próstata (SOORIAKUMARAN et al., 2014). Este tipo de tratamento é oferecido preferencialmente a pacientes que possuem fatores prognósticos mais graves, como tumor no estágio T3a, escore de Gleason > 8 e nível de PSA > 20 ng / mL (ALI et al., 2017). As complicações mais comuns relacionadas são incontinência urinária, que ocorre em aproximadamente em 5 a 20% dos pacientes e lesão dos feixes neurovasculares que regulam a ereção, resultando na disfunção erétil (DE) em cerca de 40 a 80% dos casos (KO et al., 2013). As diferenças entre a incidência de CaP e mortalidade, indicam que muitos pacientes podem não se beneficiar do tratamento imediato (como cirurgia), diferente daqueles pacientes diagnosticados com a doença em estágio inicial (ALI et al., 2017).

Além da prostatectomia, existe também o tratamento por radioterapia juntamente com a terapia hormonal, onde há privação de andrógenos (do inglês, *androgen deprivation therapy* - ADT). O objetivo desse método é reduzir os níveis dos principais andrógenos no corpo, a testosterona e a di-hidrotestosterona (DHT), ou impedi-los de estimularem as células cancerígenas da próstata a crescerem. A maioria dos andrógenos é produzida pelos testículos, portanto, diminuir seus níveis ou impedi-los de entrar nas células cancerígenas muitas vezes faz com que o CaP diminua de tamanho ou cresça mais lentamente. Dessa forma, a ADT tem sido tradicionalmente aplicada em pacientes diagnosticados com CaP avançado, como em casos de paciente com metástases (BOULOS; MAZHAR, 2017), que fizeram outro tipo de tratamento, como a radioterapia ou a prostatectomia radical (American Cancer Society, 2019). A radioterapia com ADT tem sido a base do tratamento para pacientes com CaP resistente à castração (do inglês - *castrate-resistant prostate cancer* -CRPC), uma consequência biológica da falta de uma resposta apoptótica de células tumorais da próstata a andrógenos. Esse tratamento tem como finalidade a sensibilização das células cancerígenas no estado de castração. Uma droga que auxilia este tratamento é o docetaxel, que pode afetar diretamente o eixo de sinalização dos andrógenos-receptores, bloqueando sua translocação nuclear e transcrição (MARTÍN et al., 2016).

## 2.2 Biomarcadores moleculares para CaP

Para se detectar, definir o desenvolvimento e o estágio clínico em que a doença se encontra, faz se necessário o uso de biomarcadores. Estes podem ser proteínas, DNA, transcritos de RNA, entre outros. O Instituto Nacional do Câncer (NCI) (do inglês - *The National Cancer Institute*) dos Estados Unidos da América define biomarcador como uma molécula biológica que pode ser encontrada no sangue, fluidos corporais ou até em tecidos, a fim de identificar e distinguir sinais de processos biológicos normais, alterados ou patológicos (PRENSNER et al., 2012).

Para se tornar um marcador tumoral ideal, é necessário que o mesmo se encontre em níveis alterados somente em caso de malignidade, preferencialmente nos estágios iniciais do processo neoplásico e não sofra alteração em doença inflamatória ou infecciosa (PONIAH et al., 2017).

É considerado um bom biomarcador aquele que possui algumas características, como por exemplo, (i) ser específico para a doença; (ii) a detecção ser pouco invasiva; (iii) o ensaio ter custo acessível; (iv) ser ensaio reprodutível com alta sensibilidade e especificidade; (v) apresentar correlação verdadeira com o resultado da doença (LIN, 2009).

Na prática clínica, o uso de marcadores é de grande importância, pois eles podem indicar indivíduos com maior suscetibilidade para desenvolver câncer, distinguir os estágios da doença e também prever o melhor tratamento (SCHRÖDER, 2009). Os biomarcadores são classificados em três categorias: suscetibilidade, resposta farmacodinâmica e prognóstico (ESFAHANI; ATAIE, PANJEHPOUR, 2015; MADU; LU, 2010; SAWYERS, 2008).

Os biomarcadores de suscetibilidade estão relacionados com maior ou menor possibilidade de um indivíduo possuir a doença com relação a outro; são usados em estudos do tipo caso-controle. Os de resposta farmacodinâmica reconhecem os impactos terapêuticos de uma droga nos primeiros estágios da progressão clínica da doença para determinar uma dosagem adequada. Os de prognóstico reconhecem o curso natural do câncer e inferem se a doença está em estágios mais agravantes (MADU; LU, 2010).

Em 1930 foi detectada em elevada concentração no plasma sanguíneo de homens que estavam com CaP metastático a enzima PAP (do inglês *prostatic acid phosphatase*), definida como o primeiro marcador para esta doença (LOWE; TRAUZZI, 1993). Após 50 anos, em 1980 foi detectada a presença de uma glicoproteína com várias subunidades, produzida na próstata e específica de tecido prostático, o PSA (ERCOLE et al., 1987). O método de triagem baseado no PSA foi aprovado pelo FDA em 1994, que definiu em 4ng/mL seu limite superior

normal. Em homens saudáveis o nível deste marcador é muito baixo; porém, em homens que apresentam alterações na morfologia da glândula prostática, os níveis de PSA sobem, indicando prostatite ou mesmo a presença de tumores (THOMPSON et al., 2004). Contudo, a especificidade do PSA é limitada, sendo o diagnóstico (biópsia) positivo em somente 25% dos pacientes com concentrações séricas de PSA entre 2 e 10 ng/mL (TORRE et al., 2015). Dessa forma, não existe relação entre os níveis de PSA e o desenvolvimento maligno da doença, pois embora o PSA seja uma enzima específica da próstata, não é marcador específico para o CaP (HENDRIKS; VAN OORT, SCHALKEN, 2017).

A triagem por PSA levou a uma preocupação sobre tratamento excessivo de pacientes que possuem CaP na sua forma indolente (TABAYOYONG, ABOUASSALY, 2015) e consequências causadas pelos procedimentos cirúrgicos ou farmacológicos sem a real necessidade, por se tratar de um tumor não agressivo, o qual não interferiria na qualidade de vida do paciente (HAMDY et al., 2016).

Estudos indicam que mesmo a doença sendo diagnosticada estritamente na próstata, pacientes que apresentam similaridade no escore de Gleason apresentaram diferentes níveis de PSA, bem como diferentes taxas de mortalidade (D'AMICO et al., 2003; BUYYOUNOUSKI et al., 2012). Em outra situação, homens que possuíam valores de PSA e estadiamento estritamente parecidos, não apresentavam o mesmo prognóstico para a patologia, indicando que o exame de PSA não é específico para o prognóstico (BOUTROS et al., 2015). Embora seja compreendida a baixa especificidade do PSA em distinguir os diferentes graus de alterações prostáticas, ele é o biomarcador mais utilizado até o momento, pois a quantificação desta enzima é uma importante ferramenta para acompanhamento de progressão da doença e análise de recidiva do tumor (SAINI, 2016).

Diante do exposto, há uma extrema necessidade de estudos para descobrir novos marcadores moleculares de suscetibilidade e marcadores para melhorar o diagnóstico para o CaP (GAO et al., 2016).

Ainda que não esteja estabelecido quais genes estão diretamente relacionados com a suscetibilidade ao CaP, os marcadores disponíveis atualmente na prática clínica ainda são de difícil acesso para a população devido ao alto custo e ao fato de serem obtidos a partir de testes invasivos, como a biópsia por agulha, um procedimento doloroso para os pacientes, que não é livre de complicações. Em consequência disso, existe um grande interesse na aplicação dos polimorfismos genéticos para suscetibilidade e prognóstico de pacientes com CaP, tendo em vista que podem ser futuros marcadores, com um protocolo fácil, seguro e eficaz.

### 2.2.1 Polimorfismos genéticos

Polimorfismos caracterizam-se por serem mutações que ocorrem em uma determinada sequência do DNA em um local cromossômico (*locus*) na frequência maior do que 1% em uma determinada população; caso essa frequência seja menor que 1%, a alteração é apenas chamada de mutação (GRIFFITS et al., 2016). Podem ser encontrados em toda a sequência genômica dos eucariotos.

Existe uma classe de polimorfismos, a INDEL, que resulta da inserção (adição de um ou mais nucleotídeos) ou da deleção (remoção de pares de bases) (Figura 6) (NUSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016). Essas adições ou deleções dentro de sequências que codificam proteínas podem levar a mudanças na matriz de leitura do gene e, conseqüentemente, alterarem a expressão da proteína (PIERCE, 2004).

Outra classe de polimorfismo estudada é a repetição em *tandem* de número variável (VNTR do inglês- *variable number of tandem repeats*), que consiste em uma sequência de DNA repetida várias vezes no genoma; o número de vezes que a sequência é repetida pode diferir entre indivíduos, tornando, portanto, estes VNTRs polimórficos. Os candidatos mais prováveis para polimorfismos VNTR funcionais são aqueles que estão dentro das regiões codificadoras do gene, afetando diretamente o produto protéico.

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) representam a classe mais abundante de polimorfismos em seres humanos. Os SNPs são definidos como uma mudança de uma única base em uma sequência de DNA, quando apenas um único nucleotídeo (A, T, C ou G) difere daquele normalmente esperado (VIGNAL et al., 2002) (Figura 6). As alterações mais frequentes no DNA são as que envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, troca entre duas purinas (A>G ou G>A) ou duas pirimidinas (C>T ou T>C) (KWOK; GU, 1999).

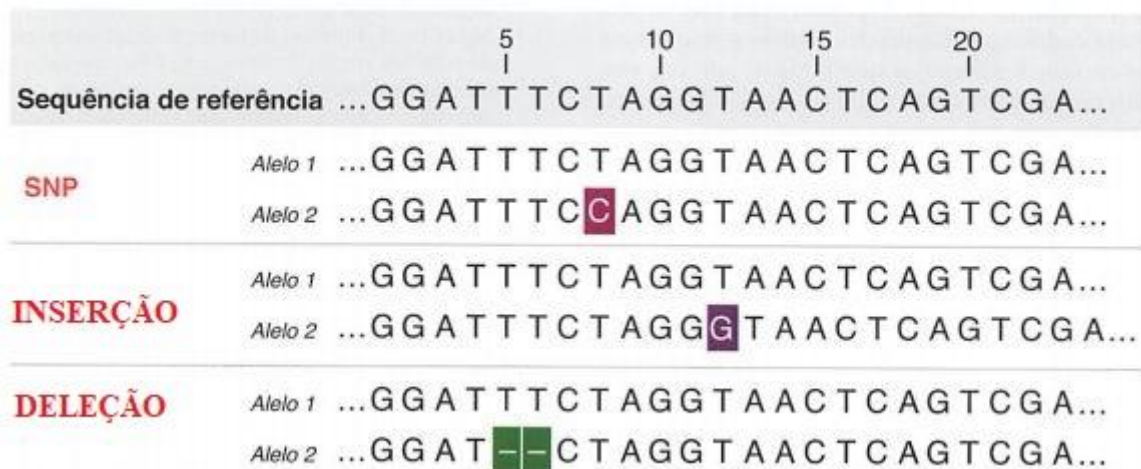
Uma estimativa do número de SNPs no genoma, em diferentes bases de dados públicos e privados, entre eles o SNP500 Cancer, que fornece a sequência e o genótipo de SNPs utilizados para mapear doenças complexas como o câncer (PACKER et al., 2004), apontou que mais de cinco milhões de SNPs foram identificados e aproximadamente quatro milhões foram validados, isto é, foram confirmados como polimórficos em um ou vários grandes grupos populacionais (SOBRINO et al., 2005).

Muitos estudos demonstraram associação entre SNPs e diversas doenças como Alzheimer (XIE et al., 2017) e esquizofrenia (GOZUKARA BAG, 2018). Em relação ao câncer, os SNPs podem estar envolvidos nas diferentes respostas a tratamentos e também com

os diferentes níveis de risco individual de desenvolvimento tumoral. No CaP, os SNPs são clinicamente relevantes como fatores que determinam a suscetibilidade (KUASNE et al., 2010 and 2011; JANG et al., 2013), o prognóstico (PU et al., 2012) e a resposta ao tratamento desta doença (LINDSTROM et al., 2007).

GWAS (do inglês- *Genome wide association studies*) são amplos estudos que analisam a sequência de DNA e suas variações (principalmente SNPs) ao longo do genoma humano, a fim de identificar marcadores genéticos para doenças, como o câncer, para predizer os fundamentos biológicos que levam a maior suscetibilidade, buscando o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção (BUSH; MOORE, 2012). Em um estudo do tipo GWAS foram encontrados mais de 90 SNPs comuns associados ao desenvolvimento de CaP (VARGHESE; EASTON, 2010; GOH et al, 2012). Em conjunto, estes SNPs podem estar relacionados com cerca de um terço do risco mundial de desenvolvimento de CaP (EELES et al., 2013).

**Figura 6** - Exemplos de polimorfismos genéticos: SNP, Inserção e Deleção.



No exemplo de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), há dois alelos na posição 8, um com o nucleotídeo T (sequência de referência) e outro com C. No polimorfismo do tipo inserção, o alelo 2 apresenta uma inserção de um nucleotídeo G entre as posições 11 e 12 e no polimorfismo do tipo deleção, o alelo 2 apresenta uma deleção de 2 pares de bases nas posições 5 e 6.

**Fonte:** Nusbaum; McInnes; Willard (2016)

### 2.2.2 Genes candidatos a biomarcadores para o CaP

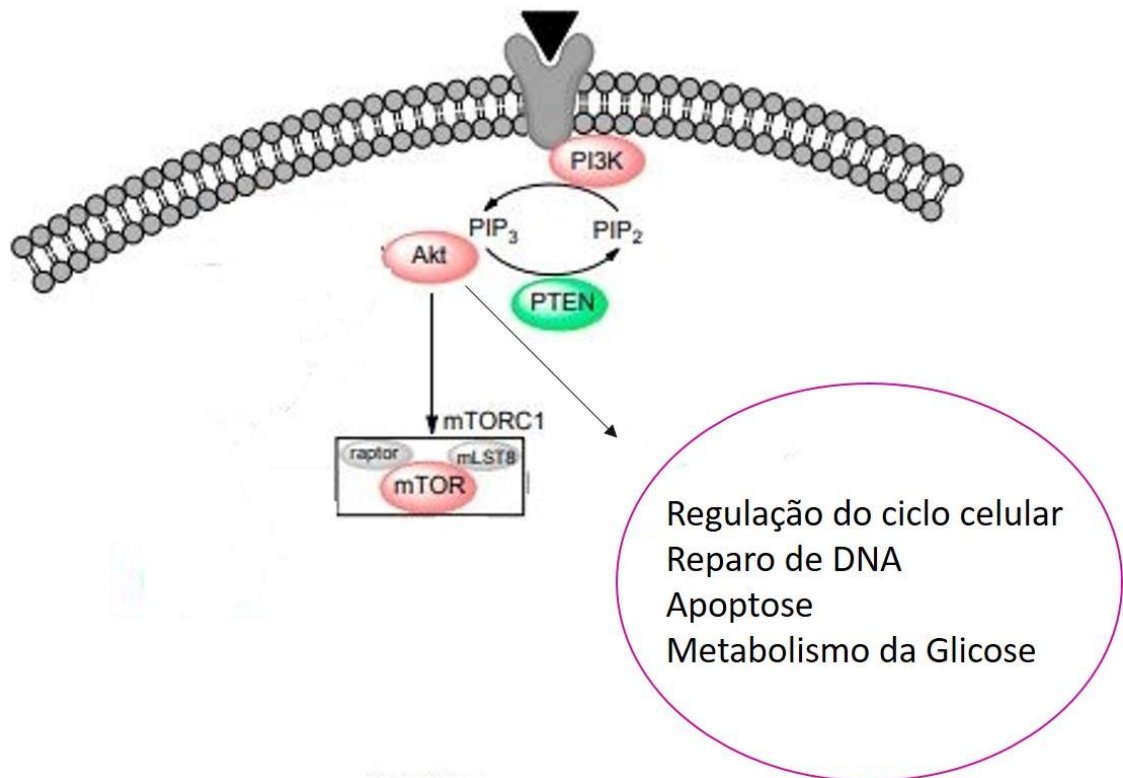
O gene *PTEN*, um supressor tumoral, e o proto-oncogene *mTOR* são muito estudados em investigações sobre CaP, pois atuam na mesma via de sinalização (*PI3K/AKT*) (Figura 7). Estes genes foram escolhidos para serem analisados no presente estudo como possíveis biomarcadores de suscetibilidade e prognóstico do CaP, e seus polimorfismos genéticos estão descritos na Tabela 2. Juntamente com os polimorfismos rs3830675 do gene *PTEN* e rs2536 do gene *mTOR* investigados neste estudo, foi incluída a análise de associação do SNP rs3830675 gene *PTEN* com outro SNP no mesmo gene, o rs27353743, anteriormente estudado por nosso grupo de pesquisa.

Genes supressores de tumor (do inglês- *tumor suppressor genes* TSGs) são genes que protegem a célula de prosseguir em direção ao câncer, pois codificam proteínas que normalmente servem como um “freio” para a proliferação celular evitando, dessa forma, o aparecimento da doença. Quando esses genes estão mutados, havendo perda ou redução de sua função, pode ocorrer um crescimento celular descontrolado, que pode levar ao desenvolvimento tumoral (ABREU VELAZ, HOWARD, 2015). Por outro lado, os proto-oncogenes codificam fatores de crescimento, proteínas envolvidas na transdução de sinal e fatores de transcrição. As proteínas codificadas por esses genes desempenham papel no crescimento, diferenciação celular e na apoptose. Quando mutados, são denominados oncogenes e ativam os processos aos quais estão relacionados, promovendo proliferação celular (ANDERSON et al., 1992).

**Tabela 2** – Genes selecionados, localização cromossômica e variantes alélicas investigadas no presente estudo.

Genes	Localização cromossômica	Localização gênica	SNP	Tipo	Alteração
<i>PTEN</i>	10q23.3	Íntron	rs 3830675	Inserção	(ATCTT)
<i>PTEN</i>	10q23.3	Íntron	rs 2735343	SNP	(C>G)
<i>mTOR</i>	1q36.2	3'UTR	rs 2536	SNP	(T>C)

**Figura 7-** Vias de sinalização compartilhadas pelos genes *PTEN* e *mTOR*.



**Fonte:** Adaptado de Brenner; Andersson tvedt; Bruserud (2016)

### Gene *PTEN*

Os primeiros estudos envolvendo o gene *PTEN* começaram em 1997, quando se descobriu que este gene era um supressor tumoral e estava presente de forma mutada em muitos tumores malignos, como cérebro, mama e próstata. Inicialmente foi denominado *MMAC* (do inglês - *mutated in mutiple advanced cancers*) e em seguida foi denominado *PTEN* (do inglês - *phosphatase and tensin homolog*) (LI et al., 1997; STEACK et al., 1997).

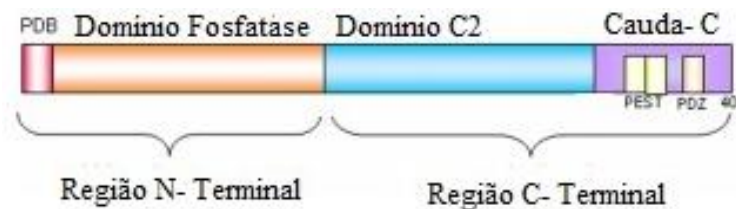
O gene *PTEN* está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q23.3). Vários processos celulares como adesão a tecidos, metabolismo celular e apoptose são regulados pela expressão deste gene (STAMBOLIC et al., 2001). A expressão de seu RNAm, bem como os níveis de sua proteína, depende de vários fatores, tais como fatores de transcrição, metilação do DNA, miRNAs, acetilações de histonas e alterações na fosforilação de proteínas (WANG et al., 2003).

A proteína codificada pelo gene *PTEN* é uma fosfatase que atua em substratos como polipeptídeos e fosfoinositídeos; contém um domínio tirosina fosfatase, que é capaz de desfosforilar tanto resíduos de serina/treonina como tirosina. Apesar dessa especificidade

dual, o principal substrato desta proteína é o lipídeo PIP3 presente na membrana plasmática (DI CRISTOFANO; PANDOLFI, 2000).

A proteína PTEN possui 403 aminoácidos e domínio de ligação a PIP2 (do inglês- *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) (PBD); domínio catalítico fosfatase; domínio C2, responsável pela ligação na membrana e desfosforilação de PIP3 (do inglês- *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*); uma região caudal C-terminal com 50 aminoácidos, que possui domínios PEST e um domínio de ligação PDZ, região onde proteínas regulatórias irão se ligar e também região que vai se ligar à membrana plasmática (Figura 8) (MOLINARI; FRANTINI, 2014)

**Figura 8** - Estrutura da proteína PTEN indicando suas respectivas regiões.



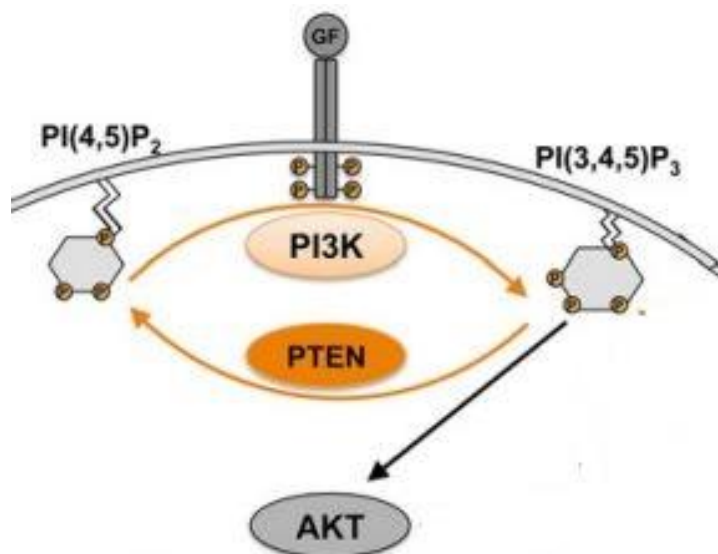
PBD: região N-terminal - domínio de ligação a PIP2 e domínio de fosfatase; Região C-terminal e Cauda C: composta por PEST e PDZ - motivo de interação com proteínas regulatórias.

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

PTEN regula negativamente o processo de sinalização de fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K do inglês- *phosphoinositide 3-kinase*) que fosforilam a membrana plasmática, convertendo fosfatidilinositol 4,5- bifosfatase (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfatase (PIP3). Com o aumento de PIP3, a proteína AKT é recrutada para a membrana plasmática, (FERRALDESCHI et al., 2015). A proteína PTEN mantém os níveis de PIP3 baixos, removendo o 3º grupo fosfato e convertendo-o em PIP2, o que proporciona uma regulação negativa dos processos indutores de carcinogênese (Figura 9) (LAPLANTE, SABATINI, 2013).

As mutações neste gene são encontradas em muitos tipos de câncer e promovem o crescimento celular descontrolado porque prolongam a sinalização pela via *PI3K* (LUO et al., 2003; ZHU et al., 2016).

**Figura 9-** Regulação negativa pela proteína PTEN na via do *PI3K/AKT*.



Quando a via do *PI3K/AKT* fica ativada regula vários processos, como proliferação, migração celular e angiogênese.

**Fonte:** adaptado de Wise; Hermida; Leslie (2017)

O SNP do gene *PTEN* IVS4 (rs3830675) localiza-se em uma região não codificante (intron 4) à altura de 109bp, após o éxon 4 e resulta na inserção de cinco pares de bases ATCTT (WANG et al., 2016), a proteína resultante desse polimorfismo contém 408 pb. De acordo com Sun et al. (2014), regiões intrônicas, apesar de não codificarem proteínas, possuem funções cruciais na regulação da expressão gênica e na interrupção do processo de *splicing* durante a transcrição. Sendo assim, o polimorfismo *IVS4* (rs3830675) no gene *PTEN*, situado no intron 4, pode levar a um erro de *splicing*, afetando a expressão e função do gene.

Estudos do tipo caso-controle avaliaram a associação deste polimorfismo com uma ampla variedade de cânceres, como os de mama (OZTURK et al., 2013), colo retal (CANBAY et al., 2013) e esôfago (GE et al., 2008), porém, em todos eles os resultados foram inconsistentes. Este fato pode ser atribuído à etnia das populações estudadas ou em alguns casos ao tamanho da amostra, pois estudos individuais costumam ter baixo poder para avaliar o efeito global de um polimorfismo (SUN et al., 2014; MANDAL et al., 2015).

George et al. (2001) não encontraram associação deste polimorfismo com a suscetibilidade ao CaP, e sugeriram que novos estudos deveriam ser feitos em associação com outros polimorfismos. A ocorrência de perda de função do gene *PTEN* foi associada com CaP metastático agressivo, o que pode permitir utilizar este gene como marcador de prognóstico

para diferir tumores indolentes daqueles que são propícios a serem mais agressivos (WISE; HERMIDA, LESLIE, 2017), e ressalta a importância de estudos adicionais, como o presente trabalho, envolvendo este gene no contexto da carcinogênese prostática.

O gene *PTEN* é um supressor tumoral e atua como regulador negativo da via de sinalização *mTOR/AKT*. Alguns SNPs desse gene podem ter relação com o processo tumoral, como é o caso do rs2735343 (COLAKOGLU et al., 2008). Este polimorfismo foi estudado anteriormente por nosso grupo de pesquisa e está localizado em uma região intrônica, ou seja, não codificadora; porém, pode regular a expressão de proteínas e do ciclo celular (JANG et al., 2013).

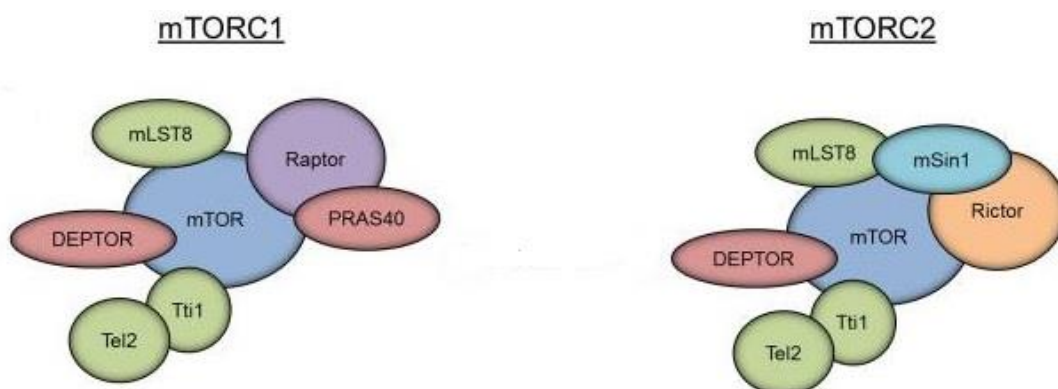
Um estudo de meta-análise demonstrou que principalmente o genótipo GG deste polimorfismo está associado à suscetibilidade ao câncer na população chinesa (SONG et al., 2017) Este mesmo genótipo também foi associado ao desenvolvimento de carcinoma espinocelular esfogágico (ESCC) (JANG et al., 2013). Chen et al. (2018), em um estudo do tipo caso-controle, demonstraram que portadores do genótipo CC apresentaram maior suscetibilidade para desenvolvimento de câncer de mama em casos esporádicos e com histórico familiar. Este polimorfismo foi associado aos SNPs do nosso estudo para análises haplotípicas, a fim de identificar se as associações conferem suscetibilidade ao CaP ou têm relação com fatores histopatológicos e clínico (PSA).

### **Gene *mTOR***

O gene *mTOR* codifica uma serina/treonina quinase, alvo de rapamicina em mamíferos, descoberta no início dos anos 90 (BROWN et al., 1994; SABATINI et al., 1994). Também chamado de *FRAP1*, o gene está localizado no cromossomo 1p36.2 e possui um tamanho aproximado de 156 kb com 59 éxons (ZINING et al., 2016).

O gene *mTOR* codifica proteínas que fazem parte de dois complexos distintos que atuam na sinalização celular, o mTORC1 e mTORC2, sendo RAPTOR e PRAS40 específicas para mTORC1. Em contrapartida, RICTOR e mSin1, são exclusivas para mTORC2. Porém, exceto para essas proteínas específicas, os dois complexos compartilham as mesmas proteínas, como mLST8, DEPTOR e o complexo Tti1/Tel2. Cada um dos complexos possui preferências específicas para um determinado tipo de substrato. Dessa forma, promovem eventos distintos na modulação da função celular (KIM, GUAN, 2015) (Figura 10).

**Figura 10** - Representação esquemática dos dois complexos de *mTOR*.



O mTORC1 consiste de um complexo que contém a mTOR quinase e as proteínas regulatórias, mLST8, DEPTOR, Tti1/ Tel2, Raptor e PRAS40. O mTORC2 compartilha algumas proteínas com o complexo mTORC1 mas contém componentes exclusivos como Rictor e mSin1.

**Fonte:** Kim; Cook; Chen, 2017

A função do complexo *mTORC1* é atualmente bem estabelecida, e sabe-se que promove o metabolismo celular anabólico, como síntese de lipídios, proteínas, nucleotídeos e bloqueia os processos catabólicos, como a autofagia, tanto em nível pós-traducional como transcricional. Desta forma, fornece o suporte necessário para a proliferação e o crescimento celular, através da sua ampla rede de integração e de vias de sinalização (SHIMOBAYASHI, HALL, 2014; LAPLANTE, SABATINI, 2013).

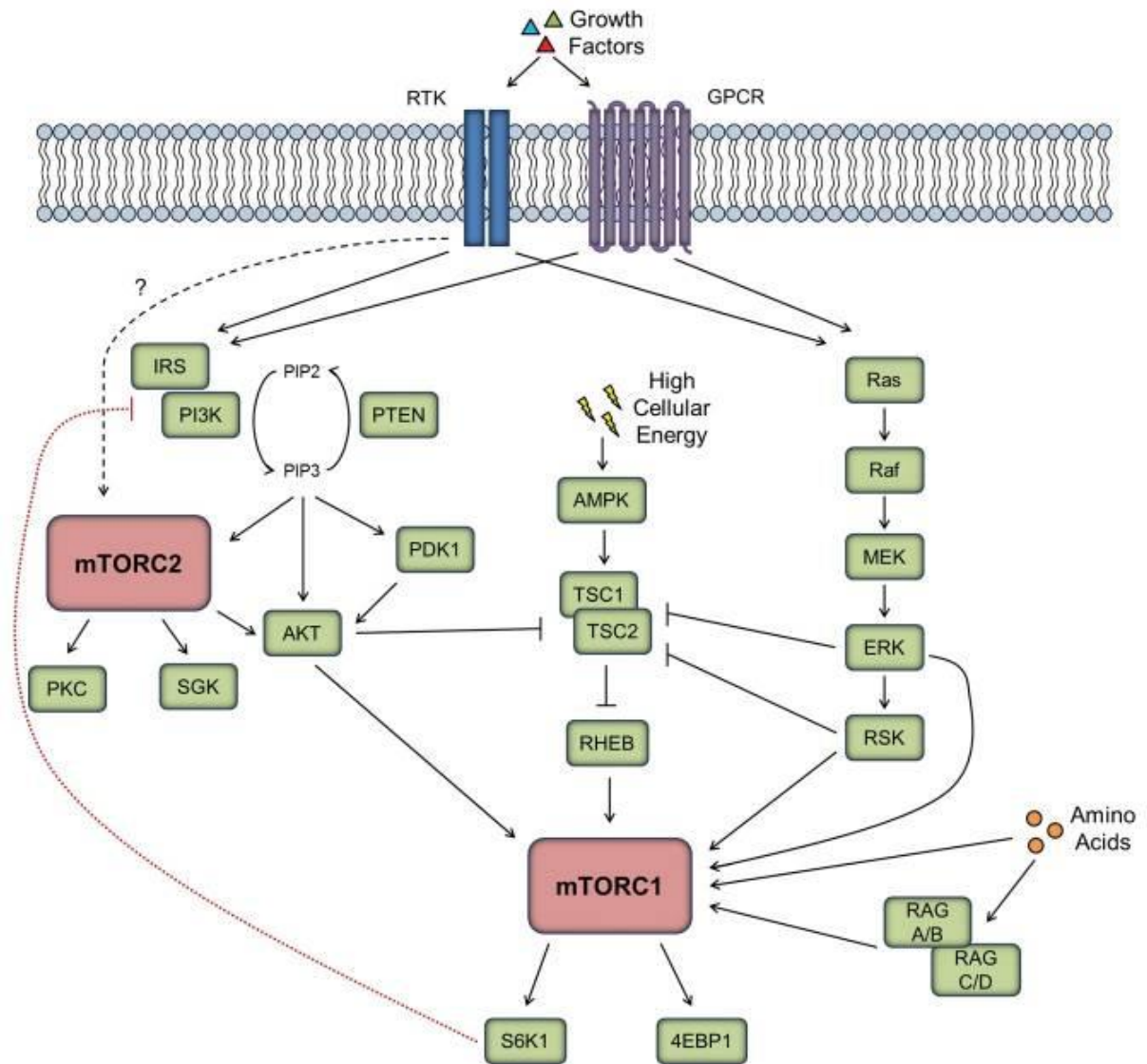
Uma via bem conhecida onde o gene atua como efetor *downstream* é a da sinalização *PI3K/AKT*, que regula diversos processos celulares associados à oncogênese, como proliferação, migração, sobrevivência e crescimento (LAPLANTE; SABATINI, 2013). *PI3K* pertence à família dos lipídios quinases, que converte PIP2 em PIP3, recrutando AKT para membrana plasmática. Esta quando fosforilada inibe a ação da proteína PRAS40 que está no complexo mTORC1, a qual regula negativamente a atividade quinase do complexo, levando dessa forma à ativação de mTORC1 (SANCAK et al., 2007; WANG et al., 2007) (Figura 11). A desregulação na sinalização desta via tem sido implicada em muitas doenças humanas, incluindo diabetes, doenças neurodegenerativas e câncer (YUAN; CANTLEY, 2008; LAPLANTE, SABATINI, 2013).

Quando há mutações nos genes *PI3K*, *Ras*, *Raf*, a via *PI3K/mTOR* fica superativada, bem como os processos que levam à oncogênese. Outra maneira disso acontecer, é através da

inativação de alguns supressores tumorais, tais como *PTEN*, *AMPK*, *TSC2*. Além disso, a proteína p53 não se expressa durante a progressão do câncer, e por ser um supressor da via *mTOR*, promove sua ativação (BLAGOSKLONNY, 2011). Em CaP essa via está desregulada em 42% dos casos iniciais da doença e em 100% dos tumores mais agressivos (TAYLOR et al., 2010),

Slattery et al. (2010) associaram pela primeira vez o SNP rs1057079 do gene *mTOR* com câncer de colon. Em seguida, surgiram novos estudos para avaliar a associação de SNPs neste gene com outros tipos tumorais, como carcinoma esofágico (ZHU et al., 2013), renal (CAO et al., 2012) e gástrico (HE et al., 2013) e em nenhum destes estudos foi observada associação significativa.

**Figura 11** - Visão geral das vias de sinalização *mTORC1* e *mTORC2*.



**Fonte:** Kim; Cook; Chen (2017)

O SNP rs2536 está localizado na região 3'-UTR (do inglês- 3' *untranslated region*) conferindo uma troca de T > C e afeta diretamente o sítio de ligação de miRNAs (miRNA-576 ou miRNA-767) ao RNAm (ZINING et al., 2016). Li et al. (2014) relataram aumento do risco de CaP em chineses que possuíam os genótipos CT ou CC e apresentavam as seguintes características: fumantes e com escore de Gleason maior que 7 (3+4).

Em vista do exposto, podemos sugerir que os SNPs nos genes *PTEN* e *mTOR* podem ser biomarcadores candidatos interessantes para a suscetibilidade e prognóstico ao CaP, merecendo novas investigações.

### 2.2.3 Haplótipo e desequilíbrio de ligação

Haplótipo se refere ao conjunto de alelos em dois ou mais loci próximos em um cromossomo do par de homólogos e são usados para estudos de análise de ligação, genética de populações e genética clínica (NALLS et al., 2014).

A inferência de haplótipos na população é baseada na genotipagem de determinados genes em múltiplos indivíduos não relacionados, onde diversas variantes podem ser usadas para se avaliar o desequilíbrio de ligação (DL) (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM et al., 2012).

O desequilíbrio de ligação é principalmente analisado em SNPs, pois descreve o grau ao qual um alelo de um SNP é herdado ou correlacionado com um alelo de outro SNP dentro de uma determinada população (BUSH, MORRE, 2012). É considerado um indicador sensível das forças genéticas da população que estruturam um genoma, bem como fundamental para mapear genes que estão associados com caracteres quantitativos e com doenças hereditárias (SLATKIN, 2008).

Os valores de DL dependem de múltiplos fatores, incluindo o tamanho e tipo da população estudada e quando o alelo portador de uma determinada doença entrou pela primeira vez na população através de mutação. Por exemplo, populações afro-descendentes são as mais ancestrais e têm regiões menores de DL devido ao acúmulo de mais eventos de recombinação (BUSH; MORRE, 2012).

Duas medidas principais são usadas para se calcular o DL,  $D'$  e  $r^2$  (DEVLIN, RISCH, 1995).  $D'$  é uma medida genética relacionada com a frequência com que os alelos são herdados juntos e varia entre 0 e 1. Quando o valor de  $D'$  é próximo de 0 indica ausência de DL, o que implica em recombinações frequentes entre os dois alelos e independência estatística sob os princípios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Se o valor de  $D'$  for próximo a 1 indica a presença de DL. A outra medida utilizada, o  $r^2$ , fornece a previsão de ocorrência de um polimorfismo em relação ao outro. Valores altos para essa medida indicam que dois SNPs transmitem informações semelhantes, sendo que apenas um dos dois SNPs precisaria ser genotipado para o estudo de uma determinada doença (BUSH; MOORE, 2012). Isso sugere que se testar um SNP dentro de cada bloco com associação significativa para uma determinada doença, pode ser suficiente para indicar associação com cada SNP no referido bloco, reduzindo, dessa forma, o número de SNPs que precisariam ser testados em estudos do tipo caso-controle (SLATKIN, 2008).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar a associação de polimorfismos nos genes *PTEN* e *mTOR* com a suscetibilidade e o prognóstico do câncer de próstata, na busca por novos marcadores moleculares para esta neoplasia maligna.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para avaliar a possível associação entre variantes polimórficas dos genes *PTEN* (rs3830675 e rs2735343) e *mTOR* (rs2536) com a suscetibilidade ao câncer de próstata.
- Correlacionar os dados genéticos com os parâmetros clínico (nível de PSA) e histopatológicos dos tumores (extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, invasão perineural, invasão de linfonodo, estadiamento, escore de Gleason e bilateralidade), avaliando o potencial dessas variantes como marcadores moleculares de prognóstico para o câncer da próstata.
- Avaliar os haplótipos dos dois polimorfismos do gene *PTEN* quanto à existência de desequilíbrio de ligação e analisar se há um ou mais haplótipos de suscetibilidade ou proteção para CaP na amostra estudada.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Critérios de seleção para o estudo do tipo caso-controle

Foram estudados 554 indivíduos do sexo masculino, sendo 277 indivíduos livres de CaP (controles) e com nível de PSA menor que 2ng/mL, e 277 pacientes diagnosticados com CaP, confirmado por análise histopatológica. Os atributos de exclusão foram homens submetidos à radioterapia e/ou quimioterapia. Os pacientes foram pareados com os controles na proporção 1:1 quanto à idade ( $\pm 5$  anos) e hábitos (tabagista e etilista).

As amostras de sangue periférico de pacientes e controles foram coletadas no CISMENPAR (Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema-PR), Irmandade Santa Casa de Londrina, Universidade Estadual de Londrina (UEL) e Hospital do Câncer de Londrina, Paraná, Brasil, no período de 2006 a 2015. Os controles e pacientes voluntários assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e responderam um questionário baseado em Carrano e Natarajan (1988) (Anexo A, B, C e D). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CEPE/UEL 176/2013) (ANEXO E).

### 4.2 Análise Molecular

#### 4.2.1 Extração de DNA

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

Para cada um dos dois genes selecionados foram escolhidos polimorfismos nos bancos de dados públicos do NCBI, 2018, *PTEN* (rs3830675), (rs2735343) e *mTOR* (rs2536). Estes polimorfismos foram escolhidos devido à ausência de estudos em populações miscigenadas, como é o caso da população brasileira.

#### 4.2.2 Genotipagem do gene *PTEN* IVS4 rs3830675

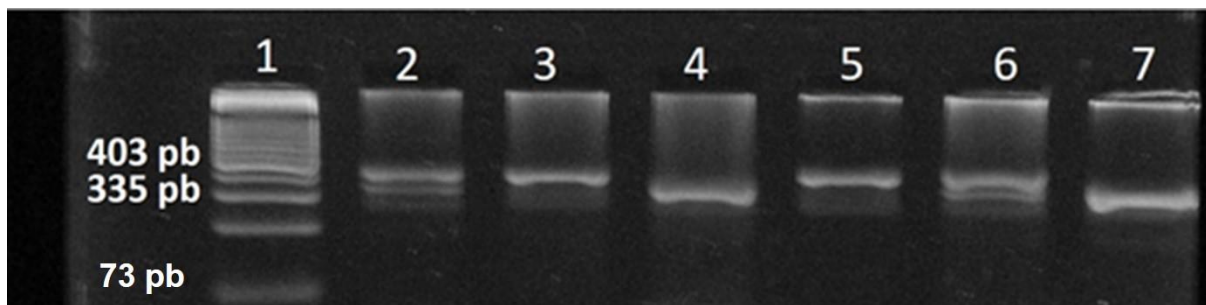
Dois SNPs do gene *PTEN* foram investigados no presente estudo. O rs3830675 foi avaliado para 277 pacientes e 277 controles e os dados do rs2735343 obtidos em estudo anterior do nosso laboratório (NÓBREGA, 2018) em 246 pacientes e 246 controles foram avaliados quanto aos possíveis haplótipos e ao desequilíbrio de ligação.

Os genótipos para o polimorfismo rs3830675 foram analisados por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de análise do comprimento do fragmento de restrição (RFLP). O DNA foi amplificado por PCR com *primers* específicos (5'-GGG GGT GAT AAC AGT ATC TA-3' e 5'-CTT TAT GCA ATA CTT TTT CCT A-3'), sintetizados de acordo com a sequência depositada no GenBank (GENBANK, 2016).

As reações de amplificação foram padronizadas no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina (UEL) a partir de protocolos padrões previamente utilizados para o estudo de variantes genéticas. Na PCR foram utilizados 100ng de DNA genômico, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Invitrogen by LIFE Technologies 17™, Carlsbad, Califórnia, USA), 10% de tampão livre de magnésio Buffer (Invitrogen), 50mM de MgCl<sub>2</sub>, 1uL de primers forward e reverse a 20pmol, 2mM de dNTP e água ultra-pura para completar o volume final de 25μL. As condições da reação foram: desnaturação- 95°C por 5' (1x) anelamento- 95°C por 30"; 57°C por 30"; 72°C por 40" (35x) e extensão- 72°C por 10' (1x).

As reações foram realizadas em termociclador PCR Sprint Thermo Hybaid (BioSystems, Guelph, Canadá). Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) diluído em tampão DNA Super Buffer (8 g de NaOH e 45 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) e corados com o corante fluorescente *gel red* (LGC Biotecnologia). Após a obtenção dos produtos de PCR, 6uL de volume foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição BspTI (10 U/μL) (Invitrogen™, Anza™, Vilnius, Lituânia, UE) a 37°C por uma hora. Esta enzima reconhece o sítio 5' C<sup>^</sup>TTAAG 3', o que permitiu a identificação dos diferentes genótipos do polimorfismo. Após a etapa de clivagem, os produtos de PCR foram novamente submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) e corados conforme descrito acima, possibilitando a observação dos genótipos obtidos (Figura 12).

**Figura 12** - Perfil eletroforético do polimorfismo do gene *PTEN* IVS4 rs3830675 em gel de agarose (2%).



1-Ladder de 100pb (marcador padrão de tamanho de fragmento); 2 e 6 - genótipo heterozigoto WT/INS; 3 e 5- genótipo homozigoto sem inserção WT/WT; 4 e 7- genótipo homozigoto para a inserção INS/INS.

Os genótipos foram identificados da seguinte maneira: WT/INS para amostras que possuíam a inserção em apenas um dos alelos e apresentaram três bandas na eletroforese (403bp, 335bp e 73bp), caracterizando o indivíduo heterozigoto. INS/INS para o genótipo homozigoto raro para a inserção e que apresentam duas bandas na eletroforese (335bp e 73bp) e WT/WT para o homozigoto prevalente, que não possui a inserção em nenhum dos alelos e apresentam uma única banda (403 bp) (Figura 12). O fragmento de 73pb é dificilmente visualizado em gel de agarose devido ao seu pequeno tamanho, mas sua presença foi confirmada em alguns géis de poliacrilamida. Para o controle da reação foi utilizada água destilada para cada reação de PCR. As genotipagens de pelo menos 10% das amostras foram repetidas para controle de qualidade.

#### 4.2.3 Genotipagem dos genes *mTOR* e *PTEN* rs2735343

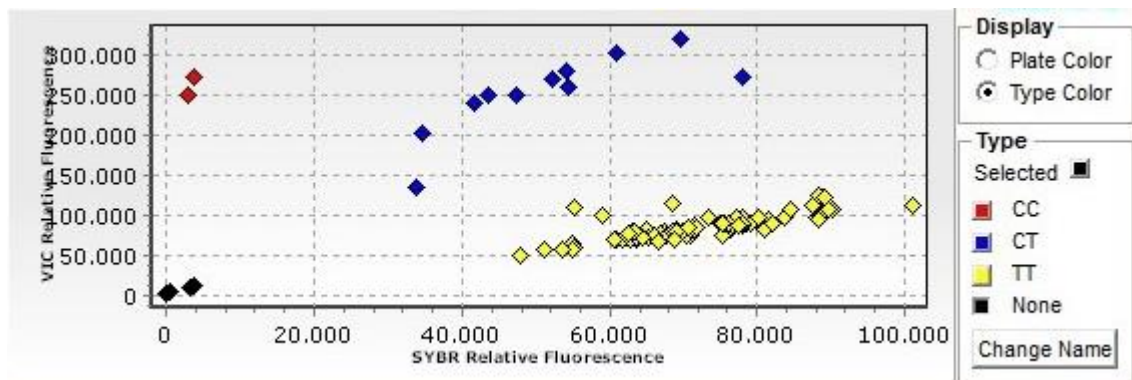
A genotipagem dos genes *mTOR* e *PTEN* rs2735343 foram realizadas por meio da técnica de PCR em tempo real utilizando-se sonda de hidrólise (sistema TaqMan® Applied Biosystemns®, Foster City, Califórnia, USA) (Figura 13). A genotipagem de rs2735343 do gene *PTEN* foi realizada previamente por nosso grupo de pesquisa (NÓBREGA, 2018).

As reações para genotipagem de ambos SNPs foram feitas no equipamento Quantica Real Time (Techne) utilizando 250µL de Genotyping master mix (Applied Biosystems), 5ng/mL de DNA e 12,5µL de sonda específica para cada gene. Para o gene *mTOR* foi utilizada a sequência VIC/FAM:

TTGAGTATTTGTTCTGCTCATAATT[C/T]CCAATATGTACCAGACCTTCCCTGT e para o gene *PTEN* rs2735343 foi utilizada a sequência VIC/FAM: TTCAAAGCTAGATATACTGTTAGC[C/G]CCTTTGGCAACAGAAGAAATGAAAA descritas por Applied Biosystems.

A ciclagem foi realizada da seguinte forma: 50 ciclos divididos em dois passos, o primeiro uma desnaturação a 92°C por 15 segundos, o segundo passo sendo o anelamento e extensão dos *primers* a 60°C por 90 segundos. Para garantir a precisão dos resultados da genotipagem, quatro controles foram incluídos em cada uma das placas de 96 poços.

**Figura 13** - Genotipagem do rs2536 do gene *mTOR* pela técnica de PCR em tempo real utilizando sistema TaqMan®.



Eixo Y- VIC; Eixo X- FAM. Genótipo CC- figuras vermelhas; Genótipo CT- figuras azuis; Genótipo TT- figuras amarelas. Figuras pretas: amostras que não amplificaram ou amostras sem DNA.

### 4.3 Análise Estatística

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

A partir das informações do questionário respondido pelos indivíduos do estudo foi feita análise estatística por regressão logística univariada. Os parâmetros que apresentaram nesta análise valores de  $p < 0,05$  foram utilizados para ajustar o modelo multivariado, onde os genótipos foram avaliados quanto à possível associação com CaP.

A análise da associação dos polimorfismos estudados com suscetibilidade ao CaP foi dada pela relação dos genótipos prevalentes, heterozigotos e raros entre os indivíduos

controles e pacientes. Para essa avaliação foi utilizado o cálculo de *Odds Ratio* – OR (razão de risco) e intervalo de confiança de 95%.

Os diferentes genótipos dos genes *PTEN* e *mTOR* também foram avaliados frente aos parâmetros histopatológicos (escore de Gleason, bilateralidade, invasão de vesícula seminal, invasão perineural, invasão de linfonodos e extensão extracapsular) e ao parâmetro clínico (PSA), empregando-se o teste de OR. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

Os haplótipos dos dois SNPs do gene *PTEN* foram obtidos com base nos genótipos de todos os participantes do estudo usando o *software* PHASE 2.1.1 (STEPHENS; SCHEET 2005(STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001);)Teste de permutação também foi realizado com este *software* para verificar se houve diferenças na distribuição de haplótipos entre pacientes e controles. Haploview 4.2 (BARRETT et al. 2005) foi utilizado para avaliar a existência de desequilíbrio de ligação (DL) entre os polimorfismos avaliados. O teste de correlação Tau-b de Kendall foi utilizado para avaliar possíveis significâncias entre os haplótipos e os parâmetros clínico e histopatológicos nos pacientes com a neoplasia.

## 5 RESULTADOS

As frequências genotípicas observadas a partir do teste do qui quadrado para pacientes e controles do rs3830675 do gene *PTEN* foram, respectivamente,  $\chi^2= 0.31$  e  $\chi^2= 0.11$ , com nível de significância de 5%, sendo assim, encontravam-se em equilíbrio de Hardy Weinberg. Por outro lado, o rs2536 do gene *mTOR*, não estava em equilíbrio, apresentando, respectivamente, valores de  $\chi^2= 147.05$  e  $\chi^2= 17.97$ , para paciente e controles. Na análise estatística univariada foram observadas diferenças significativas entre os grupos de pacientes e controles quanto à presença de histórico familiar de câncer (58,3% dos pacientes possuíam pelo menos um parente de primeiro grau afetado), histórico de CaP na família (35,0% declararam histórico familiar para este tipo de tumor) e grau de escolaridade (entre os pacientes com CaP 21,7% eram analfabetos e entre os indivíduos livres da doença, essa taxa foi de apenas 10,1%). Outros parâmetros analisados como vasectomia, exposição ocupacional a agroquímicos e consumo de carne vermelha não apresentaram resultado estatisticamente significativo entre pacientes e controles (Tabela 3).

A análise multivariada ajustada quanto a esses fatores de risco mostrou que o SNP no gene *PTEN* rs3830675, quando analisado tanto nos modelos genotípicos dominante, recessivo e quanto a frequência alélica, não apresentou dados estatisticamente significativos entre os grupos de pacientes e controles. No entanto, o genótipo CC do SNP rs2536 do *mTOR* apresentou resultados significativos quando avaliado no modelo recessivo (OR= 8,53; IC95%=1,68-43,39 p=0,010). A presença do alelo C também apresentou associação significativa para suscetibilidade ao CaP (OR=2,00; IC95%= 1,29-3,08 p= 0,00) (Tabela 4).

Quando foram analisados os genótipos dos SNPs do gene *PTEN* rs3830675 e do gene *mTOR* rs2536 em associação na análise multivariada nenhum resultado estatisticamente significativo foi obtido (Apêndice 1).

Na Tabela 5 estão especificados os parâmetros clínico (PSA) e histopatológicos dos tumores obtidos a partir dos prontuários dos pacientes. Devido ao fato de não haver informações disponíveis de todos os pacientes, os números amostrados não atingem o total de 277 em nenhum dos parâmetros analisados. A maioria dos pacientes (n=141) apresentou nível de PSA entre 4,1-10 ng/mL; 120 pacientes possuíam nível plasmático de PSA maior que 10 ng/mL e apenas 10 apresentaram nível de PSA até 4ng/mL. A bilateralidade do tumor foi identificada em 82 indivíduos enquanto 150 amostras encontravam-se em estágio T2; em contrapartida, 104 pacientes estavam em estágio T3 e T4. Em relação ao score de Gleason,

130 pacientes possuíam escore de 3 a 6; para o escore 7, 118 e somente 25 apresentaram escore de 8 a 10.

**Tabela 3** - Análise univariada das características clínicas e socioculturais dos pacientes com CaP e controles livres da doença.

Características		Pacientes		Controles		Valor p
		N	(%)	N	(%)	
Histórico familiar de câncer	Não	115	(41,7)	154	(55,8)	<b>0,001*</b>
	Sim	161	(58,3)	122	(44,2)	
	Total <sup>a</sup>	276	(100,0)	276	(100,0)	
Histórico familiar de CaP	Não	102	(65,0)	98	(80,3)	<b>0,005*</b>
	Sim	55	(35,0)	24	(19,7)	
	Total <sup>a</sup>	157	(100,0)	122	(100,0)	
Vasectomia	Não	269	(98,2)	249	(97,6)	0,671
	Sim	5	(1,8)	6	(2,4)	
	Total <sup>a</sup>	274	(100,0)	255	(100,0)	
Exposição ocupacional agroquímicos <sup>a</sup>	Não	111	(40,1)	129	(46,6)	0,175
	Sim	166	(59,9)	148	(53,4)	
	Total	277	(100,0)	277	(100,0)	
Grau de Escolaridade	S <sup>b</sup>	44	(16,5)	41	(16,5)	0,486 <b>0,017*</b>
	P <sup>c</sup>	165	(61,8)	182	(73,4)	
	A <sup>d</sup>	58	(21,7)	25	(10,1)	
	Total <sup>a</sup>	267	(100,0)	248	(100,0)	
Consumo de carne vermelha	Não	9	(3,2)	7	(2,5)	0,298 0,500
	Sim (1-4)	153	(55,2)	141	(51,3)	
	Sim (5-7)	115	(41,6)	127	(46,2)	
	Total	277	(100,0)	275	(100,0)	

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

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

Grau de escolaridade – S<sup>b</sup>: ensino médio completo a superior; P<sup>c</sup>: ensino fundamental incompleto a ensino médio incompleto;

A<sup>d</sup>: analfabetos.

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

**Tabela 4** – Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs dos genes *PTEN* e *mTOR* nos pacientes com CaP (n=277) e controles livres da doença (n=277) em estudo de associação do tipo caso-controle.

Genes SNPs	Genótipos	Casos N(%)	Controle N(%)	Multivariada <sup>a</sup>	
				OR(IC95%) <sup>b</sup>	Valor <i>p</i>
<i>PTEN</i> rs3830675	WT/WT <sup>c</sup>	89 (32,1)	94 (33,9)	Referência	
	WT/INS <sup>d</sup>	132 (47,7)	137 (49,5)	0,75 (0,37-1,54)	0,434
	INS/INS <sup>e</sup>	56 (20,2)	46 (16,6)	0,92 (0,38-2,26)	0,863
	Modelo dominante				
	WT/WT	89 (32,1)	94 (33,9)	Referência	
	WT/INS + INS/INS	188 (67,9)	183 (66,1)	0,80 (0,44-1,46)	0,468
	Modelo recessivo				
	WT/INS + WT/WT	221 (79,8)	231 (83,4)	Referência	
	INS/INS	56 (20,2)	46 (16,6)	1,08 (0,45-2,63)	0,859
	Frequência alélica				
WT	310(44,0)	325(58,7)	Referência		
INS	244(56,0)	229(41,3)	1,12(0,88-1,42)	0,39	
<i>mTOR</i> rs2536	TT	238 (85,9)	248 (89,5)	Referência	
	CT	14 (5,1)	24 (8,7)	0,56 (0,18-1,72)	0,312
	CC	25 (9,0)	5 (1,8)	7,26 (0,87-60,51)	0,067
	Modelo Dominante				
	TT	238 (85,9)	248 (89,5)	Referência	
	CT+CC	39 (14,1)	29 (10,5)	1,30 (0,39-4,26)	0,670
	Modelo Recessivo				
	CT+TT	252 (90,0)	272 (98,2)	Referência	
	CC	25(9,0)	5 (1,8)	<b>7,46 (1,39-39,97)</b>	<b>0,019*</b>
	Frequencia alélica				
T	490 (88,4)	520 (93,9)	Referência		
C	64 (11,5)	34 (6,1)	<b>2,00 (1,29-3,08)</b>	<b>0,000*</b>	

<sup>a</sup>Ajustado para histórico familiar de câncer, histórico familiar de CaP, grau de escolaridade

<sup>b</sup>OR (IC95%): Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%

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

<sup>c</sup> WT/WT homocigoto prevalente (não possui o polimorfismo por inserção);

<sup>d</sup> WT/INS inserção em apenas um dos alelos;

<sup>e</sup> INS/INS homocigoto raro (inserção em ambos alelos).

Os genótipos dos dois SNPs foram avaliados quanto a associação com os diferentes parâmetros clínico (nível de PSA) e histopatológicos relacionados ao prognóstico (extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, invasão perineural, invasão de linfonodos, estadiamento, escore de Gleason e bilateralidade do tumor) (Tabela 5). Não foram observadas associações do polimorfismo do gene *PTEN* rs3830675 com nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, o genótipo CC do gene *mTOR* apresentou-se como um fator de proteção para a bilateralidade tumoral (OR= 0,23; IC95%=0,06-0,84 p=0,026) e para nível de PSA maior que 10 ng/mL (OR=0,36; IC95% 0,14-0,94 p= 0,037) (Tabela 6).

**Tabela 5-** Análise das características histopatológicas, dos parâmetros prognósticos e dos níveis de PSA das amostras tumorais dos pacientes com CaP (n=277).

<b>Parâmetros*</b>	<b>Categorias</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Nível de PSA (ng/mL)	0,0-4,0	10	3,7
	4,1-10,0	141	52,0
	>10,1	120	43,3
	Total	271	100,0
Extensão extracapsular	Presença	99	38,7
	Ausência	157	61,3
	Total	256	100,0
Invasão de vesícula seminal	Presença	32	12,5
	Ausência	224	87,5
	Total	256	100,0
Invasão perineural	Presença	43	16,8
	Ausência	213	83,2
	Total	256	100,0
Invasão de linfonodos	Presença	7	2,9
	Ausência	232	97,1
	Total	239	100,0
Estadiamento	T2	150	59,1
	T3 e T4	104	40,9
	Total	254	100,0
Score de Gleason	3 - 6	130	47,6
	7(4+3) ou (3+4)	118	43,2
	8 - 10	25	9,2
	Total	273	100,0
Bilateralidade	Presença	82	43,6
	Ausência	106	56,4
	Total	188	100,0

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

**Tabela 6-** Frequências genótípicas dos genes *PTEN* e *mTOR* associados ao parâmetro clínico (nível de PSA) e aos parâmetros histopatológicos (extensão extracapsular, invasão de vesícula seminal, invasão perineural, invasão de linfonodo, estadiamento, escore de Gleason e bilateralidade).

		<i>PTEN</i> rs3830675			<i>mTOR</i> rs2536		
		WT/WT	WT/INS	INS/INS	TT	CT	CC
<b>Nível de PSA</b> (N=270)	<b>0-10 N(%)</b>	56 (37,3)	64 (42,7)	30 (20,0)	124 (82,7)	7 (4,7)	19 (12,6)
	<b>&gt;10 N(%)</b>	32 (26,7)	64 (53,3)	24 (20,0)	108 (90,0)	6 (5,0)	6 (5,0)
	<b>OR (IC95%)</b>	Referência	1,75 (1,00-3,05)	1,40 (0,70- 2,79)	Referência	0,98 (0,32-3,02)	<b>0,36 (0,14- 0,94)*</b>
<b>Extensão extracapsular</b> (N= 256)	<b>P- N(%)</b>	28 (28,3)	47(47,5)	24 (24,2)	90 (90,9)	4 (4,0)	5 (5,1)
	<b>A- N(%)</b>	53 (33,8)	76 (48,4)	28 (17,8)	131 (83,4)	9 (5,7)	17 (10,9)
	<b>OR (IC 95%)</b>	Referência	1,17 (0,65-2,10)	1,62 (0,80-3,31)	Referência	0,65 (0,19-2,16)	0,43 (0,15-1,20)
<b>Invasão de vesícula seminal</b> (N= 256)	<b>P- N(%)</b>	9 (28,1)	13 (40,6)	10 (31,3)	30 (93,8)	1 (3,1)	1 (3,1)
	<b>A- N(%)</b>	72 (32,1)	110 (49,1)	42 (18,8)	191 (85,3)	12 (5,3)	21 (9,4)
	<b>OR (IC 95%)</b>	Referência	0,94 (0,38-2,33)	1,90 (0,72-5,06)	Referência	0,53 (0,07-4,23)	0,30 (0,04-2,34)
<b>Invasão Perineural</b> (N=256)	<b>P- N(%)</b>	16 (37,2)	17 (39,5)	10 (23,3)	37 (86,1)	5 (11,6)	1 (2,3)
	<b>A- N(%)</b>	65 (30,5)	106 (49,8)	42 (19,7)	184 (86,4)	8 (3,8)	21 (9,8)
	<b>OR (IC 95%)</b>	Referência	0,65 (0,31-1,38)	0,97 (0,40-2,33)	Referência	3,11 (0,96-10,33)	0,24 (0,31-1,82)
<b>Invasão de Linfonodo</b> (N=239)	<b>P- N(%)</b>	2 (28,6)	2 (28,6)	3 (42,8)	7 (100,0)	0	0
	<b>A- N(%)</b>	72 (31,0)	113 (48,7)	47 (20,3)	199 (85,8)	13 (5,6)	20 (8,6)
	<b>OR (IC 95%)</b>	Referência	0,64 (0,09-4,62)	2,30 (0,37-4,27)	Referência	0	0
<b>Estadiamento</b> (N=254)	<b>T2- N(%)</b>	49 (32,7)	74(49,3)	27(18,0)	126 (84,0)	7 (4,7)	17(11,3)
	<b>T3-T4 N(%)</b>	31(29,8)	48(46,2)	25(24,0)	94 (90,4)	5 (4,8)	5 (4,8)
	<b>OR (IC 95%)</b>	Referência	1,02 (0,57-1,82)	1,46(0,72-2,96)	Referência	0,96 (0,29-3,11)	0,39 (0,14-1,11)
<b>Escore de Gleason</b> (N=272)	<b>3 a 7 (3+4) N(%)</b>	76 (33,6)	105 (46,5)	45 (19,9)	192 (85,0)	10 (4,4)	24 (10,6)
	<b>7 (4+3) a 10 (N%)</b>	13 (28,3)	24 (52,1)	9 (19,6)	43(93,5)	2 (4,3)	1 (2,2)
	<b>OR (IC 95%)</b>	Referência	1,37 (0,64-2,79)	1,17 (0,46-2,45)	Referência	0,89 (0,19-4,22)	0,19 (0,02-1,41)
<b>Bilateralidade</b> (N=188)	<b>P- N(%)</b>	30 (36,6)	40 (48,8)	12 (14,6)	75 (91,4)	4 (4,9)	3 (3,7)
	<b>A- N(%)</b>	34 (32,1)	47 (44,3)	25 (23,6)	88 (83,0)	3 (2,8)	15 (14,2)
	<b>OR (IC 95%)</b>	Referência	0,54 (0,23-1,27)	0,96 (0,50-1,84)	Referência	1,56 (0,34-7,21)	<b>0,23 (0,06-0,84)*</b>

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

P= presença

A= ausência

OR = Valor de *OddsRatio* com intervalo de confiança de 95%.

T2= tumor completamente dentro da próstata; T3-T4= tumor se estende a cápsula prostática, invade outras estruturas adjacentes.

Os polimorfismos estudados no presente trabalho foram associados também com o SNP do gene *PTEN* rs2735343 previamente avaliado por nosso grupo de pesquisa. A análise estatística univariada indicou diferenças significativas entre os grupos de pacientes e controles quanto à presença de histórico familiar de câncer (57,3% dos pacientes possuíam pelo menos um parente de primeiro grau afetado), para histórico de CaP na família (36,3% declararam histórico familiar para este tipo de tumor) e grau de escolaridade (entre os analfabetos, 21,7% tinham CaP e 9,6% não apresentavam a doença) (Tabela 7).

Os genótipos do rs2735343 do gene *PTEN* e do rs2536 do gene *mTOR* foram analisados em associação na análise multivariada, não sendo observado nenhum resultado estatisticamente significativo (Apêndice 2).

Os dois polimorfismos do gene *PTEN* foram ainda avaliados no presente estudo quanto à formação de haplótipos, usando o software PHASE 2.1.1. Quatro haplótipos distintos (INS/C, INS/G, WT/C e WT/G) foram identificados na presente amostra, onde INS significa a inserção de cinco pares de bases (presença do polimorfismo) e WT a ausência de inserção (genótipo selvagem) correspondentes ao rs3830675, enquanto que G ou C correspondem ao rs2735343. Suas respectivas frequências estão descritas na Tabela 8.

Na sequência foi testada a regressão logística univariada entre os haplótipos e o CaP na amostra e nenhum dos haplótipos demonstrou relação com suscetibilidade ou proteção para esta neoplasia (Tabela 9). Quando foi testada a regressão logística multivariada para esses haplótipos ajustando-se as características clínicas e sócio culturais, apenas o haplótipo INS/G no modelo recessivo foi protetor para o CaP (OR=0,42; IC95%=0,20-0,88; p=0,022) (Tabela 10).

Quando os haplótipos foram associados aos parâmetros clínico e histopatológicos após o teste de correlação Tau-b de Kendall, o haplótipo WT/C no modelo dominante foi de suscetibilidade para invasão de vesícula seminal (p=0,015) e invasão de linfonodos (p=0,014). Já o haplótipo INS/G no modelo recessivo foi de suscetibilidade para invasão de linfonodos (p=0,015) (Tabela 11). Para os outros parâmetros clínico e histopatológicos não foram obtidas associações significativas (dados não apresentados).

Para os parâmetros de desequilíbrio de ligação da amostra, o valor de  $r^2$ , que mostra a previsão de ocorrência de um polimorfismo em relação ao outro, foi de 0,252. O parâmetro  $D'$ , que relaciona a frequência com que os alelos dos dois polimorfismos são herdados juntos, foi de 0,532.

**Tabela 7** - Análise univariada das características clínicas e sócio culturais dos pacientes com CaP e indivíduos controles, considerando somente os portadores dos SNPs 2735343 e 3830675 do gene *PTEN* (n=246).

Características		Pacientes		Controles		Valor <i>p</i>
		N	(%)	N	(%)	
Histórico familiar de câncer	Não	105	(42,7)	140	(56,9)	<b>0,002*</b>
	Sim	141	(57,3)	106	(43,1)	
	Total <sup>a</sup>	246	(100,0)	246	(100,0)	
Histórico familiar de CaP	Não	86	(63,7)	80	(79,2)	<b>0,011*</b>
	Sim	49	(36,3)	21	(20,8)	
	Total <sup>a</sup>	135	(100,0)	101	(100,0)	
Vasectomia	Não	239	(98,4)	233	(97,5)	0,509
	Sim	4	(1,6)	6	(2,5)	
	Total <sup>a</sup>	243	(100,0)	239	(100,0)	
Exposição ocupacional a agroquímicos	Não	100	(40,7)	119	(48,4)	0,939
	Sim	146	(59,3)	127	(51,6)	
	Total <sup>a</sup>	246	(100,0)	246	(100,0)	
Grau de Escolaridade	S <sup>b</sup>	42	(17,2)	38	(15,8)	0,256
	P <sup>c</sup>	149	(61,1)	179	(74,6)	
	A <sup>d</sup>	53	(21,7)	23	(9,6)	
	Total <sup>a</sup>	244	(100,0)	240	(100,0)	
Consumo de carne vermelha	Não	8	(3,2)	6	(2,4)	0,465
	Sim (1-4)	135	(54,9)	124	(50,4)	
	Sim (5-7)	103	(41,9)	116	(47,2)	
	Total <sup>a</sup>	246	(100,0)	246	(100,0)	

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

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

Grau de escolaridade – S<sup>b</sup> ensino médio completo a superior; P<sup>c</sup>: ensino fundamental incompleto a ensino médio incompleto;

A<sup>d</sup>: analfabetos.

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

**Tabela 8-** Frequências dos quatro haplótipos dos polimorfismos rs3830675 e rs2735373 do gene *PTEN* em pacientes com CaP (n=246) e controles livres da doença (n=246).

Genes	SNP	Haplotipos	Frequência Pacientes (p) <sup>a</sup>	Frequência Controles (p)
<i>PTEN</i>	rs3830675	INS/ C <sup>b</sup>	0,262	0,284
+		INS/G <sup>c</sup>	0,160	0,193
<i>PTEN</i>	rs2735343	WT/C <sup>d</sup>	0,142	0,102
		WT/G <sup>e</sup>	0,435	0,420

<sup>a</sup>p válido para paciente e controle >0.01

<sup>b</sup>INS/C = inserção de ATCTT do rs3830675 e presença do alelo C do rs2735343

<sup>c</sup>INS/G= inserção de ATCTT do rs3830675 e presença do alelo G do rs2735343

<sup>d</sup>WT/C= ausência de ATCTT do rs3830675 e presença do alelo C do rs2735343

<sup>e</sup>WT/G = ausência de ATCTT do rs3830675 e presença do alelo G do rs2735343

**Tabela 9-** Modelos dominante, recessivo e aditivo para os quatro haplótipos dos dois polimorfismos do gene *PTEN* associados ao CaP após regressão logística univariada.

Modelos	Frequência (pacientes e controles) Valor p <sup>a</sup>
<b>Dominante</b>	
INS/G	0,913
INS/C	0,086
WT/G	1,000
WT/C	0,503
<b>Recessivo</b>	
INS/G	0,066
INS/C	0,519
WT/G	0,734
WT/C	0,503
<b>Aditivo</b>	
INS/G	0,101
INS/C	0,111
WT/G	0,938
WT/C	0,503

<sup>a</sup>Valor de p não ajustada para as características clínicas e sócio-culturais

**Tabela 10-** Associação dos haplótipos nos modelos dominante e recessivo do gene *PTEN* com proteção ao CaP em pacientes portadores da doença após regressão logística multivariada.

Haplótipos		Análise Multivariada <sup>a</sup>	
<i>PTEN</i> (rs3830675/rs2735373)		OR(IC95%) <sup>b</sup>	Valor <i>p</i>
INS/G Recessivo		<b>0,42 (0,20-0,88)</b>	<b>0,022*</b>
INS/C Dominante		1,38 (0,69-2,73)	0,362
WT/G Dominate		1,08 (0,71-1,65)	0,725
WT/C Recessivo		0,77 (0,29-2,04)	0,606

<sup>a</sup>Ajustado para histórico familiar de câncer, histórico familiar de CaP, grau de escolaridade

<sup>b</sup>OR (IC95%): Valor da *Odds Ratio* com intervalo de confiança de 95%

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

**Tabela 11-** Associação significativa do teste de correlação Tau-b de Kendall dos haplótipos rs3830675 e rs2735343 do gene *PTEN* com suscetibilidade para invasão de vesícula seminal e invasão de linfonodos em pacientes com CaP.

Parâmetros	Haplótipos	Multivariada <sup>a</sup>
	Modelos	Valor de <i>p</i>
Invasão de Vesícula Seminal	WT/C-Dominante	<b>0,015*</b>
Invasão de Linfonodo	WT/C-Dominante	<b>0,014*</b>
	INS/G-Recessivo	<b>0,015*</b>

<sup>a</sup>Ajustado para histórico familiar de câncer, histórico familiar de CaP, grau de escolaridade

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

## 6 DISCUSSÃO

As frequências genotípicas obtidas no presente estudo para o polimorfismo rs3830675 do gene *PTEN* se encontravam em equilíbrio de Hardy Weinberg, ou seja, a frequência dos alelos está estabilizada nesta população. Dessa forma é possível inferir que para este gene, não há seleção contra qualquer genótipo específico. Porém, as frequências genotípicas do rs2536 do gene *mTOR* não estavam em equilíbrio, tanto no grupo de pacientes como nos controles. Uma das possíveis explicações é que forças evolutivas, como por exemplo, um maior fluxo gênico estejam atuando na amostra estudada (NUSSBAUM; MCINNES; WILLARD, 2016).

No presente estudo o histórico familiar de câncer foi um fator de risco para CaP, pois os pacientes que possuíam a doença na família apresentaram maior suscetibilidade para desenvolverem a neoplasia prostática. Este achado comprova a importante contribuição hereditária para o desenvolvimento deste carcinoma. Esta associação foi descrita por Morganti et al. pela primeira vez em 1956.

De acordo com Boehm, Thomas e Tsauro (2018), é improvável que um homem com histórico familiar negativo para CaP seja portador de mutações que estejam associadas com risco aumentado para esta doença. No entanto, esta probabilidade aumenta se a família apresenta histórico positivo para uma mutação conhecida ou se há parentes que foram afetados em idade precoce.

O grau de escolaridade é um indicador de *status* socioeconômico e está inversamente associado à incidência de câncer em vários órgãos; em geral, quanto maior o nível de escolaridade, menor o risco de cânceres agressivos (RUNDLE et al., 2013). Na amostra estudada os indivíduos com baixa escolaridade apresentaram uma incidência maior de CaP quando comparados com seus respectivos controles; dos 58 pacientes analfabetos presentes na amostra, 21(36,2%) apresentaram CaP em estágios mais avançados (T3 e T4). Esses dados corroboram relatos da literatura, uma vez que Campbell; McClain, (2013) afirmaram que um nível mais alto de alfabetização proporciona ao homem maior compreensão da saúde da próstata e, conseqüentemente, a busca por acompanhamento médico. Neste caso, a baixa instrução dos pacientes pode levar ao diagnóstico do tumor em estágios mais avançados e ter como consequência um maior índice de mortalidade.

Estudos têm sido dedicados para a investigação da suscetibilidade genética à carcinogênese, principalmente envolvendo o estudo de variantes alélicas, a fim de identificar se as mesmas são capazes de modular o desenvolvimento do câncer, detecção precoce da

doença ou para definir um tratamento direcionado (WANG et al., 2015). Considerando o importante papel que os polimorfismos têm apresentado como biomarcadores em diversos tipos de doenças, foram escolhidos polimorfismos em dois genes candidatos a marcadores de suscetibilidade e prognóstico para o CaP.

*PTEN* é um dos genes supressores tumorais mais comumente silenciados durante o desenvolvimento do câncer. Durante a progressão da neoplasia prostática, podem ocorrer mutações e deleções neste gene, inativando sua atividade enzimática e levando ao aumento da proliferação celular bem como a redução de apoptose (WANG et al., 2015). Aproximadamente 70% dos homens com CaP perdem um alelo deste gene e matêm a outra cópia (CHEN et al., 2005). O gene *PTEN* atua negativamente nas vias de sinalização *PI3K/AKT/mTOR*, pois mantém os níveis de PIP3 baixos, prolongando essa via e assim há a proliferação celular descontrolada. O SNP rs3830675 deste gene está localizado em uma região intrônica, ou seja, não codificadora. De acordo com Wang et al. (2015), este SNP pode influenciar o *splicing* ou o desequilíbrio de ligação com outros lóci, afetando a expressão de sua proteína e, conseqüentemente, a regulação do ciclo celular e o risco de câncer.

Nos resultados obtidos no presente estudo não foi possível encontrar uma associação significativa entre o polimorfismo rs3830675 e a suscetibilidade ao CaP. Sun et al. (2014), a partir de uma meta análise de estudos caso-controle, encontraram associação deste SNP com outros tipos tumorais. O genótipo homozigoto raro (inserção de cinco nucleotídeos em ambos alelos) foi significativamente associado a um maior risco de câncer do trato digestivo em comparação com o genótipo homozigoto prevalente (não possui o polimorfismo por inserção em nenhum dos alelos). Nossos achados negativos em relação à suscetibilidade ao CaP corroboram aqueles descritos por George et al. (2001), que concluíram, através de um estudo caso-controle (n=600 pacientes e n=803 controles), que mesmo que este polimorfismo possa influenciar outros tipos de câncer, como mama e coloretal, parece não possuir influência significativa na suscetibilidade ao desenvolvimento do CaP.

Além disso, quando analisadas as frequências genóticas deste polimorfismo no gene *PTEN* em associação aos parâmetros histopatológicos e clínico, não foi possível observar nenhuma associação significativa, de forma que não pudemos associar esta variante alélica ao prognóstico desta neoplasia.

O *mTOR*, uma serina/treonina quinase, é reconhecido como um regulador central de processos celulares vitais através da via *PI3K/AKT/mTOR*, como a proliferação, crescimento, diferenciação, metabolismo e sobrevivência celular; angiogênese; controle da tradução; biogênese do ribossomo e autofagia (SHAO et al., 2014). A grande maioria dos estudos

envolvendo o SNP rs2536 na população chinesa apresentou resultados contraditórios. O genótipo heterozigoto CT foi associado com menor risco para leucemia linfoblástica aguda (HUANG et al., 2012). No entanto, nenhuma associação foi observada em outros tipos de tumores, como o câncer gástrico (HE et al., 2013), CaP (CHEN et al., 2012) e carcinoma de células escamosas do esôfago (ZHU et al., 2013), o que ressalta a importância de estudos adicionais visando a melhor compreensão do papel desta variante alélica no processo tumoral.

Os achados do presente estudo mostraram que o genótipo CC, no modelo recessivo e também a frequência do alelo C, estavam associados com maior risco para CaP. Até o momento estas associações para este tipo tumoral não foram descritas na literatura.

Outro achado muito importante do presente estudo e que não foi anteriormente relatado na literatura, é a associação do genótipo CC do SNP rs2536 com proteção para a bilateralidade do tumor e para altos níveis de PSA. A presença da bilateralidade tumoral em CaP é um preditor de doença avançada, levando à recomendação de cirurgia. Como este genótipo foi indicativo de proteção para o aparecimento da bilateralidade, o paciente com essa variante genética teria maior risco para desenvolver a doença, porém menor chance de apresentar CaP em estágios mais avançados (MOURAVIEV et al., 2007).

Uma das possíveis explicações para a diversidade de resultados em diferentes tipos tumorais é que miRNAs podem se ligar à região 3' UTR de genes alvo inibindo a expressão gênica durante a tradução ou podem desestabilizar o mRNA alvo. Dados de bioinformática (<http://snpinfo.niehs.nih.gov/cgi-bin/snpinfo>) indicam que os alelos T e C do SNP rs2536 podem estar associados, respectivamente, aos sítios de ligação do miRNA-576 e do miRNA-767. Dessa maneira, pode-se inferir que a expressão de *mTOR* depende das proporções destes dois miRNAs, bem como de qual alelo estará presente. O SNP avaliado no presente estudo está presente na região 3' UTR afetando, portanto, a eficiência da transcrição, alongamento do RNAm ou seu *splicing* (Li et al., 2013).

Reis et al. (2013) afirmaram em relação ao câncer oral que variantes alélicas isoladas não têm um poder informativo tão forte como a análise combinada do efeito dessas variantes com o risco da doença. Acreditamos que isso também se aplica ao CaP; assim, foram realizadas análises combinadas das variantes dos dois SNPs estudados no presente estudo e também entre esses dois SNPs com o rs 2735343 do gene *PTEN* anteriormente analisado por nosso grupo de pesquisa.

Da mesma maneira que o rs3830675 do gene *PTEN*, o rs2735343 deste mesmo gene também está localizado em uma região intrônica, ou seja, não codificante. Estudo feito por Ma et al. (2012) mostrou que esta variante seria um fator de suscetibilidade para carcinoma de

células escamosas de esôfago (ESCC) em pacientes que apresentavam os genótipos CG e GG. Além disso, em um estudo de meta-análise direcionada à população asiática relacionando diferentes tipos de câncer, inclusive CaP, observou-se suscetibilidade aumentada em indivíduos portadores do alelo G (SONG et al., 2017). Este polimorfismo foi anteriormente estudado por nosso grupo de pesquisa em associação com outros genes, e observou-se que a presença do alelo G apresentou maior risco para presença de extensão extracapsular (NÓBREGA, 2018).

Quando realizadas as análises combinadas de ambos os polimorfismos do gene *PTEN* de forma separada (rs3830675 e rs2735343) com o SNP rs2536 do gene *mTOR*, não foram observados resultados estatisticamente significativos, dessa maneira, não foi possível associar as variantes alélicas com risco ou proteção ao CaP.

Segundo Jang et al. (2013), a influência coletiva de diversos polimorfismos ou haplótipos pode exercer proteção natural combinacional ou sinérgica contra doenças, incluindo tumores. Assim, os dois polimorfismos do gene *PTEN* foram combinados para se avaliar a existência de desequilíbrio de ligação (DL) entre eles e se juntos exerceriam risco ou proteção ao CaP. Nossos achados mostraram que, na presente amostra, os dois polimorfismos no gene *PTEN* não estão em DL, ou seja, um polimorfismo não prediz o outro. Este achado ressalta a importância da genotipagem de ambos, bem como a análise de seus respectivos haplótipos. Porém, quando analisados em um banco de dados para a população mundial através do LDlink (MACHIELA; CHANOCK, 2015) encontraram o valor de  $D'$  de 0,9992, e o de  $r^2$  é de 0,972, valores que conferem desequilíbrio de ligação e indicam dados conflitantes aos nossos. Uma das possíveis explicações é que nossa amostra é altamente miscigenada e a comparação da amostra de diferentes populações provenientes de lugares distintos, com hábitos de vida e histórias diferentes, possibilita que os mesmos alelos no mesmo locus do genoma tenham valores de  $D'$  divergentes (NUSSBAUM, MCINNES, WILLARD, 2016).

Quando foi analisada a associação dos haplótipos dos polimorfismos do gene *PTEN* com o CaP por meio de regressão logística univariada, nenhum deles apresentou significância estatística em relação ao desenvolvimento deste tipo tumoral. No entanto, na regressão logística multivariada, após ajustadas as características clínicas e sócio-culturais, apenas o haplótipo INS/G no modelo recessivo foi protetor para o CaP, indicando que pacientes portadores deste haplótipo teriam menor suscetibilidade para esta neoplasia.

Ainda, quando os haplótipos foram associados aos parâmetros histopatológicos por meio do teste de correlação Tau-b de Kendall, o haplótipo WT/C no modelo dominante foi positivamente associado a invasão de vesícula seminal e invasão de linfonodos, constituindo-

se num haplótipo de mau prognóstico, uma vez que se mostrou associado simultaneamente a duas características. Adicionalmente, o haplótipo INS/G no modelo recessivo foi positivamente correlacionado com invasão de linfonodos, apesar de também ter sido associado à proteção em relação ao desenvolvimento da doença. Desta forma, este haplótipo pode proteger quanto ao surgimento do CaP, mas uma vez que a doença tenha se estabelecido pode passar a contribuir para uma pior evolução clínica.

Diante dos desafios para suscetibilidade e prognóstico para CaP, espera-se que os polimorfismos investigados neste estudo possam contribuir como novos marcadores moleculares para esta doença e conseqüentemente, para melhora da conduta com o paciente portador de Cap. Esperamos ter contribuído para a compreensão dos fatores biológicos que possam influenciar no desenvolvimento e progressão deste tipo tumoral, a partir dos polimorfismos estudados.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram associação de fatores como histórico familiar de câncer, histórico familiar de CaP e escolaridade com o risco de CaP, o que corrobora dados da literatura.

As variantes polimórficas do gene *PTEN* (rs3830675), tanto nos modelos dominante, recessivo e na frequência alélica, não foram associadas com suscetibilidade nem proteção ao desenvolvimento do CaP. A análise das variantes polimórficas do gene *mTOR* (rs2536) mostrou que portadores do alelo C tem maior suscetibilidade ao desenvolvimento da neoplasia prostática.

Não foram encontrados resultados estatisticamente significativo quando analisados os parâmetros clínico e histopatológicos dos pacientes com os genótipos do gene *PTEN* rs 3830675. Ao comparar os genótipos do gene *mTOR* com parâmetros histopatológicos, prognósticos e clínico foi observado que apenas o genótipo CC apresentou um efeito protetor para bilateralidade tumoral e para níveis mais elevados de PSA.

As análises haplotípicas entre os dois SNPs (rs3830675 e rs2735343) do gene *PTEN* mostrou que os mesmos não estavam em desequilíbrio de ligação, confirmando a importância da genotipagem de ambos os polimorfismos. Apenas o haplótipo INS/G apresentou-se protetor para o aparecimento de CaP. Este haplótipo merece estudos posteriores, pois também conferiu suscetibilidade para invasão de linfonodos. A análise de associação dos haplotipos com parâmetros prognósticos e clínico ainda indicou que o haplótipo WT/C foi associado com suscetibilidade para a invasão de vesícula seminal e de linfonodos.

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram o genótipo CC do gene *mTOR* (rs2536) e os haplótipos INS/G e WT/C dos polimorfismos do *PTEN* como candidatos a marcadores de suscetibilidade e prognóstico para o CaP. Sendo assim, estudos adicionais com essas variantes alélicas em outras populações e em outras amostras de população brasileira serão pertinentes para se confirmar os resultados obtidos até o presente momento.

## REFERÊNCIAS

- ABREU VELEZ, A. M.; HOWARD, M. S. Tumor-suppressor Genes, Cell Cycle Regulatory Checkpoints, and the Skin. **North American Journal of Medical sciences**, v. 7, n. 5, p. 176–88, mai. 2015.
- ALI, A. et al. **Health technology assessment at health quality ontario Health Technology Assessment Series**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.hqontario.ca/evidence-to-improve-care/journal-ontario-health-technology-assessment-series>> Acesso em: 10 dez. 2018.
- American Cancer Society. *Prostate Cancer*. Cancer Information Database. 2019.
- ANDERSON, M. W. et al. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 98, p. 13–24, nov. 1992.
- ARNETH, B. M. Clinical Significance of Measuring Prostate-Specific Antigen. **Laboratory Medicine**, v. 40, n. 8, p. 487–491, 1 ago. 2009.
- BALK, S. P.; KO, Y.-J.; BUBLEY, G. J. Biology of Prostate-Specific Antigen. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 2, p. 383–391, 15 jan. 2003.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263–265, 15 jan. 2005.
- BELL, K. J. L. et al. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 7, p. 1749–1757, 1 out. 2015.
- BOULOS, S.; MAZHAR, D. The evolving role of chemotherapy in prostate cancer. **Future Oncology**, v. 13, n. 12, p. 1091–1095, mai. 2017.
- BOUTROS, P. C. et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. **Nature Genetics**, v. 47, n. 7, p. 736–745, 25 jul. 2015.
- BLAGOSKLONNY, M. V. Molecular damage in cancer: an argument for mTOR-driven aging. **Aging**, v. 3, n. 12, p. 1130–1141, 31 dez. 2011.
- BRAWLEY, O. W. Prostate cancer epidemiology in the United States. **World Journal of Urology**, v. 30, n. 2, p. 195–200, 5 abr. 2012.
- BRENNER, A.; ANDERSSON TVEDT, T.; BRUSERUD. The Complexity of Targeting *PI3K-Akt-mTOR* Signalling in Human Acute Myeloid Leukaemia: The Importance of Leukemic Cell Heterogeneity, Neighbouring Mesenchymal Stem Cells and Immunocompetent Cells. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1512, 11 nov. 2016.
- BROWN, E. J. et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin–receptor complex. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 756–758, 30 jun. 1994.
- BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12, p. e1002822, 27 dez. 2012.

BUYYOUOUSKI, M. K; PICKLES, T; KESTIN, L. L; ALLISON, R; WILLIAMS, S. G, Validating the interval to biochemical failure for the identification of potentially lethal prostate cancer, **Journal of Clinical Oncology**, v.30, n. 15, p. 1857–1863, mai. 2012.

CANBAY, E. et al. Association between *PTEN* IVS4 polymorphism and development of colorectal cancer in a Turkish population. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 14 jan. 2013.

CANCER RESEARCH UK – PROSTATE CANCER. Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/prostate-cancer/stages/tnm-staging>. (Acesso em 25/ 07/ 2018).

CAMPBELL, L. C.; MCCLAIN, J. Exploring Prostate Cancer Literacy and Family Cancer Awareness in College Students: Getting Ahead of the Curve in Cancer Education. **Journal of Cancer Education**, v. 28, n. 4, p. 617–622, 1 dez. 2013.

CAO, Q. et al. A functional variant in the MTOR promoter modulates its expression and is associated with renal cell cancer risk. **PLoS one**, v. 7, n. 11, p. e50302, 28 nov. 2012.

CARRANO, A. V; NATARAJAN, A. T. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication no. 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation research**, v. 204, n. 3, p. 379–406, mar. 1988.

CARTER, B. S. et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. **The Journal of urology**, v. 150, n. 3, p. 797–802, set. 1993.

CHEN, F.-Y. et al. Association of Single-Nucleotide Polymorphisms in Monoubiquitinated FANCD2-DNA Damage Repair Pathway Genes With Breast Cancer in the Chinese Population. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 17, p. 153303381881984, 25 jan. 2018.

CHEN, J. et al. Genetic Variations in a PTEN/AKT/mTOR Axis and Prostate Cancer Risk in a Chinese Population. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e40817, 18 jul. 2012.

CHEN, Z. et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of PTEN-deficient tumorigenesis. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 725–730, 4 ago. 2005.

CHODAK, G. W.; KELLER, P.; SCHOENBERG, H. Routine screening for prostate cancer using the digital rectal examination. **Progress in clinical and biological research**, v. 269, p. 87–98, 1988.

COLAKOGLU, T. et al. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence? **The American Journal of Surgery**, v. 195, n. 6, p. 719–725, jun. 2008.

COOK, L. S.; GOLDOFT, M.; SCHWARTZ, S. M.; WEISS, N. S. Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. **The Journal of Urology**, v.161, n.1, p.152-155. jan. 1999.

CRAWFORD, E. D. Understanding the Epidemiology, Natural History, and Key Pathways Involved in Prostate Cancer. **Urology**, v. 73, n. 5 SUPPL., p. S4–S10, mai. 2009.

CUNHA, G. R. et al. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, n. 4, p. 221–236, nov. 2004.

D'AMICO, A. V; MOUL, J; CARROLL, P. R; SUN, L; LUBECK, D; CHEN, M. H, Cancer-specific mortality after surgery or radiation for patients with clinically localized prostate cancer managed during the prostate-specific antigen era, **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 11, p. 2163–2172, jun. 2003.

DEVLIN, B.; RISCH, N. A Comparison of Linkage Disequilibrium Measures for Fine-Scale Mapping. **Genomics**, v. 29, n. 2, p. 311–322, 20 set. 1995.

DI CRISTOFANO, A.; PANDOLFI, P. P. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. **Cell**, v. 100, n. 4, p. 387–90, 18 fev. 2000.

DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279–3290, 14 mai. 2007.

EELES, R. A. et al. Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. **Nature Genetics**, v. 45, n. 4, p. 385–391, 1 abr. 2013.

EPSTEIN, J. I. et al. Prognostic factors and reporting of prostate carcinoma in radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy specimens. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 39, n. sup216, p. 34–63, 9 maio 2005.

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

ERCOLE, C. J; LANGE, P. H; MATHISEN, M; CHIOU, R. K; REDDY, P. K; VESSELA, R. L. Prostatic specific antigen and prostatic acid phosphatase in the monitoring and staging of patients with prostatic cancer. **The Journal of Urology**, v. 138, n. 5, p. 1181–1184, nov. 1987.

ESFAHANI, M.; ATA EI, N.; PANJEHPOUR, M. Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 16, n. 7, p. 2601–11, jul. 2015.

FERRALDESCHI, R. et al. PTEN Protein Loss and Clinical Outcome from Castration-resistant Prostate Cancer Treated with Abiraterone Acetate. **European Urology**, v. 67, n. 4, p. 795–802, abr. 2015.

FRANZ, M.-C. et al. Zinc transporters in prostate cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 2–3, p. 735–741, abr. 2013.

GAO, S. et al. ErbB2 Signaling Increases Androgen Receptor Expression in Abiraterone-Resistant Prostate Cancer. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 22, n. 14, p. 3672–82, 15 mai. 2016.

GE, H. et al. *PTEN* polymorphisms and the risk of esophageal carcinoma and gastric cardiac carcinoma in a high incidence region of China. **Diseases of the Esophagus**, v. 21, n. 5, p. 409–415, ago. 2008.

GEORGE, D. J. et al. *PTEN* polymorphism (IVS4) is not associated with risk of prostate cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 10, n. 4, p. 411–2, abr. 2001.

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

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

GLOBOCAN. <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/prostate-new.asp> (acesso 25 setembro 2018)

GOH, C. L. et al. Genetic variants associated with predisposition to prostate cancer and potential clinical implications. **Journal of Internal Medicine**, v. 271, n. 4, p. 353–365, abr. 2012.

GOZUKARA BAG, H. G. Association between *COMT* gene rs165599 SNP and schizophrenia: A meta-analysis of case-control studies. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 6, n. 5, p. 845–854, set. 2018.

GRIFFITHS, A. J. F; WESSLER, S. R; CARROLL, S. B; DOEBLEY, J. **Introdução à Genética**. 9ª edição. Rio de Janeiro, (RJ): Ed. Guanabara Koogan, 2016.

GRONBERG, H. Prostate cancer epidemiology. **The Lancet**, v. 361, n. 8, p. 859- 964, mar. 2003.

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

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

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

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

HE, J. et al. Genetic variations of mTORC1 genes and risk of gastric cancer in an eastern chinese population. **Molecular Carcinogenesis**, v. 52, n. S1, p. 70–79, 1 nov. 2013.

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

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

HUANG, L. et al. Association of genetic variations in *mTOR* with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. **Leukemia & Lymphoma**, v. 53, n. 5, p. 947–951, 5 maio 2012.

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

INCA. Instituto Nacional do Câncer (<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao++>) acessado 25/07/2018.

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

JOSHUA, M. A.; EVANS, A.; VAN DER KWAST, T.; ZIELENSKA, M.; MEEKER, A. K.; CHINNAYAN, A.; SQUIRE, J.A. Prostatic preneoplasia and beyond. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 178, p. 156-181, abr. 2008.

KANG, B. J. et al. Diagnosis of prostate cancer via nanotechnological approach. **International journal of nanomedicine**, v. 10, p. 6555–69, out. 2015.

KIM, L. C.; COOK, R. S.; CHEN, J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. **Oncogene**, v. 36, n. 16, p. 2191–2201, abr. 2017.

KIM, Y. C.; GUAN, K.-L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 1, p. 25–32, 2 jan. 2015.

KO, J. et al. Prostate cancer patients older than 70 years treated by radical prostatectomy have higher biochemical recurrence rate than their matched younger counterpart. **The Prostate**, v. 73, n. 8, p. 897–903, jun. 2013.

KUASNE, H. et al. Polymorphisms in the *AR* and *PSA* Genes as Markers of Susceptibility and Aggressiveness in Prostate Cancer. **Cancer Investigation**, v. 28, n. 9, p. 917–924, 15 out. 2010.

KUASNE, H. et al. Base excision repair genes *XRCC1* and *APEX1* and the risk for prostate cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 3, p. 1585–1591, 18 mar. 2011.

KWOK, P.-Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? **Molecular Medicine Today**, v. 5, n. 12, p. 538–543, dez. 1999.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. **Journal of cell science**, v. 126, n. Pt 8, p. 1713–9, 15 abr. 2013.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565–575, 1 set. 2011.

LI, J. et al. *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 275, n. 5308, p. 1943–7, 28 mar. 1997.

LI, Q. et al. Polymorphisms in the mTOR Gene and Risk of Sporadic Prostate Cancer in an Eastern Chinese Population. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71968, 5 ago. 2013.

LI, Q. et al. Correction: Polymorphisms in the mTOR Gene and Risk of Sporadic Prostate Cancer in an Eastern Chinese Population. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 6 jan. 2014.

LILJA, H.; ULMERT, D.; VICKERS, A. J. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 4, p. 268–278, 1 abr. 2008.

LIN, D. W. Beyond PSA: Utility of novel tumor markers in the setting of elevated PSA. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 27, n. 3, p. 315–321, maio 2009.

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

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

LOBLER, R. et al, Avaliação do Escore de Gleason como fator prognóstico em pacientes com câncer de próstata em hormonioterapia. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, Vol. 8, no 27, janeiro / fevereiro / março, 2012. Disponível em: <http://www.sboc.org.br/revista-sboc/pdfs/27/artigo2.pdf>. Acesso em: 26/10/2018

LOWE, F. C.; TRAUZZI, S. J. Prostatic acid phosphatase in 1993. Its limited clinical utility. **The Urologic clinics of North America**, v. 20, n. 4, p. 589–95, nov. 1993.

LUO, J. H.; YU; Y. P. Genetic factors underlying prostate cancer. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 15, p. 1-24, abr. 2003.

LYNCH, H. T. et al. Screening for familial and hereditary prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 11, p. 2579–2591, 1 jun. 2016.

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

MACHIELA, M. J.; CHANOCK, S. J. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 31, n. 21, p. 3555–7, 1 nov. 2015.

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

MANDAL, R. K. et al. Association of the PTEN IVS4 (rs3830675) gene polymorphism with reduced risk of cancer: Evidence from a meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, mar. 2015.

MARTÍN, O. D. et al. Single port radical prostatectomy: current status. **Journal of Robotic Surgery**, v. 10, n. 2, p. 87–95, 12 jun. 2016.

MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256–269, abr. 2007.

MCNEAL, J. E.; REDWINE, E. A.; FREIHA, F. S.; STAMEY, T. A. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 12, p. 143-148, dez. 1988.

MELICHAR, B. PSA, PCA3 and the philosophy of prostate cancer management. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 4, p. 707–12, 1 abr. 2013.

MEIKLE, A. W.; SMITH, J. A.; WEST, D. W. Familial factors affecting prostatic cancer risk and plasma sex-steroid levels. **The Prostate**, v. 6, n. 2, p. 121–8, jan. 1985.

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

MOLINARI, F.; FRATTINI, M. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 3, p. 326, jan. 2014.

MORGANTI, G. et al. Clinico-statistical and genetic research on neoplasms of the prostate. **Acta genetica et statistica medica**, v. 6, n. 2, p. 304–5, 1956.

MOORE, S. et al. Screening for prostate cancer: PSA blood test, rectal examination, and ultrasound. **Urologic nursing**, v. 12, n. 3, p. 106–7, set. 1992.

MOURAVIEV, V. et al. Prostate Cancer Laterality Does Not Predict Prostate-Specific Antigen Recurrence After Radical Prostatectomy. **Urology**, v. 70, n. 6, p. 1141–1145, 1 dez. 2007.

NALLS, M. A. et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. **Nature Genetics**, v. 46, n. 9, p. 989–993, 27 set. 2014.

NOBRÉGA, M. Estudo de associação de polimorfismos nos genes *PTEN*, *PI3K*, *AKT1*, *AR* e *AMACR* em pacientes com câncer de próstata. Dissertação (Dissertação em Genética e Biologia Molecular) - UEL. Londrina. 2018.

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

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

OZTURK, O. et al. HER2 Ile655Val and PTEN IVS4 polymorphisms in patients with breast cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 2, p. 1813–1818, 21 fev. 2013.

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

PIERCE, B.A. **Genética – um enfoque conceitual**. 1ª ed. Rio de Janeiro (RJ). Editora Guanabara Koogan, 2004.

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

PRAKASH, V. S. et al. Ten-core versus 16-core transrectal ultrasonography guided prostate biopsy for detection of prostatic carcinoma: a prospective comparative study in Indian population. **Prostate International**, v. 1, n. 4, p. 163–168, dez. 2013.

PRENSNER, J. R. et al. Beyond PSA: The Next Generation of Prostate Cancer Biomarkers. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 127, p. 127rv3-127rv3, 28 mar. 2012.

PU, X. et al. Predictors of survival in never-smokers with non-small cell lung cancer: a large-scale, two-phase genetic study. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 18, n. 21, p. 5983–91, 1 nov. 2012.

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.

REIS, M. B. et al. Allelic variants of XRCC1 and XRCC3 repair genes and susceptibility of oral cancer in Brazilian patients. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 42, n. 2, p. 180–5, fev. 2013.

ROOBOL, M. J.; CARLSSON, S. V. Risk stratification in prostate cancer screening. *Nature Reviews Urology*, v. 10, n. 1, p. 38–48, 18 jan. 2013.

RUNDLE, A. et al. A prospective study of socioeconomic status, prostate cancer screening and incidence among men at high risk for prostate cancer. **Cancer. Causes & Control**, v. 24, n. 2, p. 297–303, 8 fev. 2013.

SABATINI, D. M. et al. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. **Cell**, v. 78, n. 1, p. 35–43, 15 jul. 1994.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 2, p. 97–106, 20 abr. 2016.

SANCAK, Y. et al. PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. **Molecular Cell**, v. 25, n. 6, p. 903–915, 23 mar. 2007.

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

SCHRÖDER, F. H. Review of diagnostic markers for prostate cancer. **Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer**, v. 181, p. 173–82, 2009.

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

SHAO, J. et al. Association of mTOR polymorphisms with cancer risk and clinical outcomes: a meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e97085, mai. 2014.

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. 155–62, 1 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.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, jan. 2018

SLATKIN, M. Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 477–485, 1 jun. 2008.

SLATTERY, M. L. et al. Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 9, p. 1604–1611, set. 2010.

SOBRINO, B.; BRIÓN, M.; CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic Science International**, v. 154, n. 2–3, p. 181–194, 25 nov. 2005.

Sociedade Brasileira de Urologia **Home Page - Portal da Urologia**. Disponível em: <<http://portaldaurologia.org.br/medicos/#>>. Acesso em: 30 abr. 2019.

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

SOORIAKUMARAN, P. et al. A Multinational, Multi-institutional Study Comparing Positive Surgical Margin Rates Among 22393 Open, Laparoscopic, and Robot-assisted Radical Prostatectomy Patients. **European Urology**, v. 66, n. 3, p. 450–456, set. 2014.

STAMBOLIC, V. et al. Regulation of PTEN Transcription by p53. **Molecular Cell**, v. 8, n. 2, p. 317–325, 1 ago. 2001.

STECK, P. A. et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nature Genetics**, v. 15, n. 4, p. 356–362, 1 abr. 1997.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 4, p. 978–989, abr. 2001

STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for Decay of Linkage Disequilibrium in Haplotype Inference and Missing-Data Imputation. **The American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 3, p. 449–462, mar. 2005.

SUN, L. et al. Association between PTEN Gene IVS4 Polymorphism and Risk of Cancer: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e98851, 5 jun. 2014.

TABAYOYONG, W.; ABOUASSALY, R. Prostate Cancer Screening and the Associated Controversy. **Surgical Clinics of North America**, v. 95, n. 5, p. 1023–1039, out. 2015.

TAYLOR, B. S. et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. **Cancer Cell**, v. 18, n. 1, p. 11–22, 13 jul. 2010.

THOMPSON, I. M. et al. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level  $\leq 4.0$  ng per Milliliter. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 22, p. 2239–2246, 27 maio 2004.

THOMPSON, I. M.; GOODMAN, P.J.; TANGEN, C. M.; et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**, v.349 n. 3, p. 215–224, jul. 2007.

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

ÜRE, İ.; CAN, C. Prostat Kanserinde Tümör Belirteçleri. **Türkiye Klinikleri Üroloji - Özel Konular**, v. 7, n. 4, p. 16–22, 2014.

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

VARGHESE, J. S.; EASTON, D. F. Genome-wide association studies in common cancers—what have we learnt? **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 20, n. 3, p. 201–209, jun. 2010.

VIGNAL, A. et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275–305, jun. 2002.

VIGNOZZI, L. et al. Benign prostatic hyperplasia: a new metabolic disease? **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 37, n. 4, p. 313–322, 24 abr. 2014.

XIE, B. et al. DNA Methylation and Tag SNPs of the BDNF Gene in Conversion of Amnesic Mild Cognitive Impairment into Alzheimer's Disease: A Cross-Sectional Cohort Study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 58, n. 1, p. 263–274, 3 maio 2017.

YUAN, T. L.; CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5497–5510, 15 set. 2008.

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, 1 set. 2016.

WANG, L. et al. PRAS40 Regulates mTORC1 Kinase Activity by Functioning as a Direct Inhibitor of Substrate Binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 27, p. 20036–20044, 6 jul. 2007.

WANG, S. et al. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. **Cancer cell**, v. 4, n. 3, p. 209–21, set. 2003.

WANG, Y. et al. Impact of PTEN IVS4 Polymorphism (rs3830675) on Cancer Susceptibility: An Updated Meta-analysis. **Cancer genomics & proteomics**, v. 12, n. 5, p. 263–9, 1 set. 2015.

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

WOLFF, R. F. et al. A systematic review of randomised controlled trials of radiotherapy for localised prostate cancer-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). **European Journal of Cancer**, v. 51, p. 2345–2367, nov. 2015.

ZIADA, A.; ROSENBLUM, M.; CRAWFORD, D. E. Benign prostatic hyperplasia: an a overview. **Urology**, v. 53, p. 1-6, mar. 1999.

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, 30 ago. 2016.

ZHU, M.-L. et al. Polymorphisms in mTORC1 Genes Modulate Risk of Esophageal Squamous Cell Carcinoma in Eastern Chinese Populations. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 8, n. 6, p. 788–795, jun. 2013.

ZHU, B. et al. TBX2 represses PTEN in rhabdomyosarcoma and skeletal muscle. **Oncogene**, v. 35, n. 32, p. 4212–4224, 21 ago. 2016.

1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 56–65, 1 nov. 2012.

## 8 APÊNDICES

**APÊNDICE 1-** Associação entre os genótipos dos genes *PTEN* rs3830675 e *mTOR* rs2536 em pacientes com CaP (n= 277) e indivíduos livres da doença (n=277) para o modelo ajustado.

Genes	SNP	Genótipos <i>PTEN/mTOR</i>	Pacientes com CaP N (%)	Indivíduos controle N (%)	Multivariado*	
					OR(IC95%)	Valor de <i>p</i>
<i>PTEN</i>	rs3830675	WT/WT + TT	81 (29,2)	85 (30,7)	Referência	
		INS/INS <sup>c</sup> + CT	3 (1,1)	4 (1,4)	-	0,995
<i>mTOR</i>	rs2536	INS/INS + TT	49 (17,7)	41 (14,8)	0,85 (0,35-2,08)	0,718
		WT/INS <sup>b</sup> + CC	14 (5,1)	2 (0,7)	2,43 (0,15- 38,15)	0,526
		WT/INS + CT	10 (3,6)	13 (4,7)	0,51 (0,09-2,80)	0,439
		WT/INS + TT	108 (39,0)	122 (44,0)	0,75 (0,35-1,57)	0,443
		WT/WT <sup>a</sup> + CC	7 (2,5)	2 (0,7)	-	0,990
		WT/WT + CT	1 (0,4)	7 (2,5)	0,21 (0,01-3,48)	0,274
		INS/INS + CC	4(1,4)	1 (0,5)	-	0,993

OR = Valor de *OddsRatio* com intervalo de confiança de 95%

\*Ajustado para histórico familiar de câncer, histórico familiar de CaP, grau de escolaridade

<sup>a</sup>WT/WT homocigoto prevalente (não possui o polimorfismo por inserção);

<sup>b</sup>WT/INS inserção em apenas um dos alelos;

<sup>c</sup>INS/INS homocigoto raro (inserção em ambos alelos).

**APÊNDICE 2-** Associação entre os genótipos dos genes *mTOR* rs2536 e *PTEN* rs2735343 em pacientes com CaP (n=246) e indivíduos livres da doença (n=246) para o modelo ajustado.

Genes	SNP	Genótipos <i>PTEN/mTOR</i>	Pacientes com CaP N (%)	Indivíduos controle N (%)	Multivariado*	
					OR(IC95%)	Valor de <i>p</i>
<i>mTOR</i>	rs2536	TT+ CC	42 (17,1)	30 (12,2)	Referência	
		TT+ CG	88 (35,8)	104 (42,3)	0,53(0,23-1,20)	0,127
<i>PTEN</i>	rs2735343	TT+ GG	82 (33,3)	84 (34,1)	0,69 (0,30-1,61)	0,393
		CT + CC	3(1,2)	3 (1,2)	-	-
		CT+ CG	9 (3,7)	16 (6,5)	0,41 (0,09-1,86)	0,249
		CT+ GG	1 (0,4)	4 (1,6)	0,21 (0,02-2,32)	0,205
		CC+ CC	2 (0,8)	-	-	-
		CC+ CG	8 (3,3)	4 (1,6)	1,15(0,09-14,40)	0,916
		CC+ GG	11 (4,5)	1(0,4)	-	0,998

OR = Valor de *OddsRatio* com intervalo de confiança de 95%

\*Ajustado para histórico familiar de câncer, histórico familiar de CaP, grau de escolaridade.

## 9 ANEXO

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

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

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

Pedimos sua autorização para que moléculas (DNA, RNA ou proteínas) obtidas a partir da amostra de sangue e/ou tecido possam ser armazenadas para estudos futuros no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, quando será solicitada nova autorização do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEL para a realização das pesquisas posteriores. O material obtido ficará armazenado no Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da UEL, sob responsabilidade dos pesquisadores responsáveis por esta pesquisa. Esclarecemos ainda que a autorização para manutenção destas amostras é por prazo indeterminado, podendo ser cancelada por aviso escrito à responsável pelo Laboratório de Mutagênese e Oncogenética da Universidade Estadual de Londrina.

Solicitamos também sua autorização para que possamos consultar seu prontuário médico (que fica no Hospital do Câncer de Londrina) e obter alguns dados clínicos. Solicitamos-lhe o

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

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

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

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

Os pesquisadores responsáveis por este estudo Ilce Mara de Syllos Cólus e Marilesia Ferreira de Souza, poderão ser contatados pelos telefones 3371-4608, 3371-4191, 9648-1918 ou no endereço rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Campus Universitário, Centro de Ciências Biológicas, Bloco 11, Laboratório de Mutagênese 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

**ANEXO B** - Consentimento pós informado para pacientes com CaP e livres de neoplasia  
(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) 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: \_\_\_\_\_

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

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

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

Sua participação neste projeto é muito importante para nós, uma vez que necessitamos avaliar e comparar as semelhanças e diferenças entre estes dois grupos (pessoas saudáveis 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 Mutagênese 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 / Entrevistado



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



## Histórico de Saúde

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

SIM  NÃO  não sabe

Se SIM

Hormônio

Antinflamatório

Analgésicos

Antipertensivos

Anabolizantes

Outros

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

SIM  NÃO  não sabe

24 – Você já foi submetido a cirurgia nos testículos?

SIM  NÃO

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

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

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

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

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

Pai  Mãe  Irmão  Filho  Tio  Primo  Outro

28- Qual foi a localização do tumor?

Próstata  Mama  Bexiga  Outro (qual?)

\_\_\_\_\_

29 – Você já teve alguma doença sexualmente transmissível?

SIM  NÃO

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

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

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

31- Você come carne? ( ) SIM ( ) NÃO

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

Dias/Semana

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

Histórico genético

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

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



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA



PARANÁ  
GOVERNO DO ESTADO

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 Syllós 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

