



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARILEZIA FERREIRA DE SOUZA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO E DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES *GSTP1*, *MGMT*,
VDR E *AR* EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

MARILEZIA FERREIRA DE SOUZA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO E DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES *GSTP1*, *MGMT*,
VDR E *AR* EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

MARILEZIA FERREIRA DE SOUZA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO E DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DOS GENES *GSTP1*, *MGMT*,
VDR E *AR* EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

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

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

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729a Souza, Marilesia Ferreira de.
Análise dos níveis de metilação e de polimorfismos genéticos dos genes
GSTP1, MGMT, VDR e AR em pacientes com câncer de próstata / Marilesia
Ferreira de Souza. – Londrina, 2013.
85 f. : il.

Orientador: Ilce Mara de Syllos Cólus.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Próstata – Câncer – Teses. 2. DNA – Teses. 3. Polimorfismo (Genética) –
Teses. 4. Marcadores biológicos de tumor – Teses. I. Cólus, Ilce Mara de Syllos.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agronômico
do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 575.173:616-006.6

MARILEZIA FERREIRA DE SOUZA

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO E DE POLIMORFISMOS
GENÉTICOS DOS GENES *GSTP1*, *MGMT*, *VDR* E *AR* EM PACIENTES
COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho - UNESP

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

Londrina, 21 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina por fornecer a estrutura para que a pesquisa pudesse ser desenvolvida. À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PQ) pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade.

Agradeço profundamente a todas as entidades que apoiaram o projeto, principalmente ao Hospital do Câncer de Londrina e toda a equipe de médicos urologistas, em especial Dr. Paulo Emílio Fuganti, Gustavo Marconi, Luis Gustavo Toledo, Emerson Pereira Gregório e Ricardo Brandina, à equipe de enfermeiros e todos os funcionários que sempre ajudaram e colaboraram com as coletas.

À clínica UROLIT, ao Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema (CISMEPAR), à Irmandade da Santa Casa de Londrina, à Unisep e ao Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina pela colaboração com as amostras.

Às pessoas que aceitaram participar da pesquisa, muito obrigada pela disposição e pela confiança.

À banca examinadora que foi carinhosamente selecionada. Muito obrigada por dispor do seu tempo para contribuir com esse trabalho.

À minha querida orientadora Ilce Mara de Syllos Cólus pela oportunidade, por ter acreditado em mim e me acolhido, por todo apoio, amizade, pelos conselhos e dedicação, mesmo quando estava longe. Por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse trabalhar com o que tanto amo e por ter compartilhado sua sabedoria. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Marcelo Tempesta de Oliveira por toda ajuda e dedicação.

Ao Dr. Gustavo Barcelos e ao Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior da FCFRP-USP, pela parceria e apoio nesta pesquisa.

Ao Dr. Kasuhiro Ito pela colaboração, à Dra. Marina Okuyama Kishima pelas análises histopatológicas, e ao técnico Gilmar pelo auxílio nos cortes dos blocos.

Ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri por ter aberto a infraestrutura do seu laboratório para que essa pesquisa pudesse ser realizada e à Ms. Juliana Torres Tomasi pela disponibilidade e ajuda.

À Profa. Dra. Claudia Rainho pelo apoio nesta pesquisa.

A todos os professores pela dedicação e por todo o conhecimento repassado.

À Deus, por tudo. Pois só Ele sabe quantas vezes eu disse: “Meu Deus e agora?!”

Aos Meus Pais por sempre terem me apoiado, por toda a dedicação, pelo amor incondicional, pelos conselhos, pela amizade, por serem as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada por tudo, amo muito vocês.

À minha avó Clari e ao meu avô Bruno, por serem uma segunda mãe e eu segundo pai pra mim. Obrigada por tudo. Amo vocês.

Ao meu namorado Braian Allievi pela paciência, compreensão, dedicação e carinho. Te amo!

Aos meus queridos amigos de laboratório que me acolheram e fizeram a distância de casa se tornar menor... Ao André van Helvoort Lengert, que foi mais que um colega de trabalho, foi um irmão, me ajudando sempre mesmo de longe, e me acalmando e ensinando que tudo da certo no final. À Hellen Kuasne por sempre estar disposta a ajudar, ao Dimitrius Pramio por toda ajuda na pesquisa, à Heloisa Cilião pela ajuda, congressos, sufocos e correria e pela amizade, à Maressa Maline pelo companheirismo, amizade e pelas inúmeras risadas. Ao Diego Luis Ribeiro, Ana Flávia Specian, Lucas Benicio, Juliana Mara Serpeloni, Adeline Linmberger pela amizade, apoio e carinho, à Rossana Godoy Camargo, Mariana Bizarro dos Reis, Valéria Belo, Milene Nobrega de Oliveira, Lara Zapata, Ligia Inocencio, Anaih Bezerra, Priscila Oka e aos demais amigos, obrigada por todo tempo de convivência e pela amizade.

Às minhas mais amadas amigas: Karen, Dalva, Vanessa, Marluci e Darlene, que mesmo com a distância estavam sempre presentes de um jeito ou de outro, me ajudando, aconselhando e me dando forças. Obrigada por tudo.

Aos técnicos dos laboratórios Dário Tormena e Melissa por toda ajuda e dedicação. E à secretária da pós-graduação Sueli Trindade, que sempre está disposta a ajudar, muito obrigada por toda a sua dedicação.

Muito Obrigada!

*“Todas as vitórias ocultam uma
abdicação”*

Simone de Beauvoir

SOUZA, Marilesia Ferreira de. **Análise dos níveis de metilação e de polimorfismos genéticos dos genes *GSTP1*, *MGMT*, *VDR* e *AR* em pacientes com câncer de próstata**. 2013. 85 f Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O câncer de próstata é o segundo tipo de neoplasia mais incidente no mundo. A eficácia do exame de PSA (Antígeno Prostático Específico), atualmente empregado para triagem da doença, está em discussão devido à suas limitações quanto à sensibilidade e especificidade. Portanto, a busca de novos marcadores mais sensíveis e eficazes para essa neoplasia é de extrema importância para reduzir o impacto clínico da mesma. A fim de contribuir para a solução deste problema, o presente estudo visou a busca de marcadores genéticos e epigenéticos de diagnóstico e prognóstico para o câncer de próstata. A pesquisa consistiu de amostras de DNA genômico extraídos de sangue periférico de 223 indivíduos com câncer de próstata e 223 indivíduos livres de neoplasia. A técnica de PCR em tempo real foi empregada para a realização da genotipagem de um polimorfismo para cada um dos genes previamente selecionados: *GSTP1*, *MGMT*, *VDR* e *AR*. A análise genotípica não mostrou associação entre câncer de próstata e os polimorfismos estudados individualmente. Entretanto, a associação dos genótipos GG (*GSTP1*) e GA (*VDR*) conferiu um aumento de risco para o câncer de próstata (OR=2,34; IC95%=1,10-4,97, p=0,04). Por outro lado, um efeito protetor para comprometimento de vesícula seminal foi conferido pelo genótipo AG do gene *GSTP1* (OR=0,22; IC95%=0,07-0,69, p=0,01), e quando este foi associado com o gene *AR* (G), apresentou efeito protetor para o câncer de próstata (OR=0,61; IC95%=0,39-0,96, p=0,04). Para a realização das análises de metilação de DNA foram selecionados 76 pacientes dos quais foram obtidas amostras de DNA de tecido tumoral e adjacente normal de próstata. A mensuração dos níveis de metilação dos genes *GSTP1* e *MGMT* foi realizada pela técnica *MS-HRM* (*Methylation-sensitive high resolution melting*) e mostrou baixos níveis de metilação de DNA no gene *MGMT* em ambos tecidos estudados. Em contrapartida, altos níveis de metilação para o gene *GSTP1* foram encontrados no tecido tumoral em relação ao tecido adjacente normal (p<0,0001), níveis estes que apresentaram-se associados com a agressividade da doença. Além disso, foi observada associação positiva entre níveis de metilação do promotor do gene *GSTP1* e o polimorfismo rs1695 do mesmo gene. Portanto, podemos sugerir com este estudo que combinações de genótipos de genes de diferentes vias podem estar relacionados com risco ou proteção do câncer de próstata; que a metilação do promotor do gene *GSTP1* é um bom marcador de prognóstico e diagnóstico, relacionado inclusive com agressividade tumoral; e que polimorfismos neste gene podem estar relacionados com os níveis de metilação do promotor do mesmo.

Palavras-chave: Câncer de próstata. Polimorfismo. Metilação de DNA. MS-HRM.PCR em tempo real.

SOUZA, Marilesia Ferreira de. **Analysis of methylation levels and genetic polymorphisms of genes *GSTP1*, *MGMT*, *VDR* and *AR* in patients with prostate cancer**. 2013. 85 p Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The prostate cancer is the second most frequent type of cancer around the world. The effectiveness of PSA test (Prostate-specific antigen), currently used for screening the disease, is under discussion because of the limitations in sensitivity and specificity. Therefore, the searching for new markers more sensitive and effective for this neoplasia is extremely important to reduce the clinical impact of the disease. To contribute to the solution of this problem, this study aimed to search for genetic and epigenetic markers for diagnosis and prognosis of prostate cancer. The research consisted of samples of genomic DNA extracted from peripheral blood of 223 patients with prostate cancer and 223 healthy individuals. The real-time PCR was used to perform the genotyping of one polymorphism to each gene previously selected: *GSTP1*, *MGMT*, *VDR* and *AR*. Genotypic analysis showed no association between prostate cancer and the polymorphisms studied individually. However, the association of the GG genotype (*GSTP1*) and GA (*VDR*) provided an increased risk for prostate cancer (OR = 2.34, IC95% = 1.10-4.97, p=0.04). On the other hand, a protective effect for impairment of seminal vesicle was provided by AG genotype of *GSTP1* gene (OR = 0.22, IC95% = 0.07- 0.69, p=0.01), and when this genotype was associated with the *AR* (G), it showed a protective effect for prostate cancer (OR = 0.61, IC95%=0.39-0.96). To carry out the DNA methylation analysis 76 patients were selected and were obtained DNA samples from tumor tissue and adjacent normal tissue of prostate. The measurement of the levels of methylation of *GSTP1* and *MGMT* genes were performed by *MS-HRM* (Methylation-sensitive high resolution melting), and showed low levels of DNA methylation of *MGMT* gene in both tissues evaluated. In contrast, high levels of methylation of the *GSTP1* gene were found in tumor tissue compared to adjacent normal tissue (p <0.0001), and the high levels of methylation are associated with the aggressiveness of the disease. Furthermore, a positive association was observed between methylation levels of *GSTP1* gene and rs1695 polymorphism in the same gene. Therefore, we suggest that genotype combinations of genes from different pathways may be related to risk or protection of prostate cancer; *GSTP1* gene promoter hypermethylation is a good marker for prognosis, diagnosis and tumor aggressiveness; and polymorphisms in this gene can be linked to the promoter methylation levels.

Key words: Prostate cancer. Polymorphism. DNA Methylation. MS-HRM. Real time PCR.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	MARCADORES MOLECULARES DO TIPO POLIMORFISMOS GENÉTICOS	14
2.2	MARCADORES MOLECULARES EPIGENÉTICOS	16
2.3	GENE GSTP1 E O CÂNCER DE PRÓSTATA	18
2.4	GENE MGMT E O CÂNCER DE PRÓSTATA	19
2.5	GENE AR E CÂNCER DE PRÓSTATA	21
2.6	GENE VDR E CÂNCER DE PRÓSTATA	22
3	OBJETIVO	24
3.1	OBJETIVO GERAL	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MANUSCRITO I - Polimorfismos genéticos associados com risco e/ou proteção ao desenvolvimento e progressão do câncer de próstata	25
	Resumo	26
	Introdução	26
	Material e métodos	28
	Resultados	29
	Discussão	30
	Agradecimentos	39
	Referências Bibliográficas	39
5	MANUSCRITO II - Hipermetilação e polimorfismo do gene GSTP1 associados à agressividade em câncer de próstata	45
	Resumo	46
	Introdução	46
	Material e métodos	48

Resultados	50
Discussão	52
Conclusões	55
Agradecimentos	61
Referências bibliográficas	61
6	CONCLUSÕES GERAIS	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8	ANEXOS	79
Anexo 1 -	Questionário pessoal.....	79
Anexo 2 -	Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná.....	84
Anexo 3 -	Autorização do Hospital do Câncer de Londrina para a utilização das amostras dos pacientes do Serviço de Urologia.....	85

1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é o tipo de câncer mais prevalente em homens no Brasil, e o segundo tipo mais prevalente em homens no mundo. A estimativa brasileira para 2012 era de aproximadamente 62 novos casos a cada 100.000 homens. Apesar de sua alta incidência, o prognóstico na maioria dos casos é considerado bom, sendo que a taxa de sobrevivência é, em média, de 58%, fazendo desta neoplasia a sexta causa de morte por câncer no mundo (JEMAL et al. 2011; INCA, 2011; PARKIN et al., 2005).

O carcinoma de próstata é uma doença considerada heterogênea na sua agressividade e prognóstico, variando desde formas latentes, que ficam confinadas na glândula e nunca irão evoluir, a formas metastáticas de alta agressividade (LUO; YU, 2003).

Atualmente, é realizada em muitos países, inclusive no Brasil, uma triagem para o câncer de próstata, que consiste de dois exames complementares: nível de antígeno prostático específico (PSA) e toque digital retal (DRE). Contudo, esses exames não abrangem todos os carcinomas prostáticos e, em relação ao PSA, esse marcador não diferencia a forma latente da forma agressiva do tumor; com isso, homens com a forma não letal da doença não se beneficiam desse diagnóstico e, conseqüentemente, do tratamento. Portanto, estratégias para melhorar o desempenho do exame de PSA e o desenvolvimento contínuo de novos marcadores para o tipo agressivo da doença são necessários (STROPE; ANDRIOLE, 2010).

A etiologia do câncer de próstata não é bem compreendida e os fatores que envolvem este câncer são complexos e diversos (PENTYALA et al., 2000; LUO; YU, 2003).

A pesquisa sobre o processo de carcinogênese tem um grande potencial e é fundamental para direcionar as causas do câncer de próstata e oferecer estratégias de saúde pública para reduzir o impacto dessa doença (JOSHUA et al., 2008).

Vários estudos genéticos e epigenéticos têm sido realizados buscando desvendar o processo de desenvolvimento e evolução do câncer de próstata e, com isso, encontrar um marcador mais sensível e específico que o PSA para esse tipo de câncer. Vários genes candidatos têm sido apontados, mas ainda não se obteve sucesso nessa busca. Visto essa problemática clínica, o presente estudo propõe

avaliar polimorfismos genéticos e o perfil epigenético de genes em busca de um marcador molecular para o câncer de próstata.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Sua incidência vem aumentando e, para o ano de 2030, a Organização Mundial de Saúde, prevê 27 milhões de novos casos (INCA, 2011; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2012). A estimativa para o câncer de próstata em 2012 no Brasil foi de 60.180 novos casos (INCA, 2011). A média mundial de estimativa de vida é de 58% em 5 anos, e varia dependendo das condições socioeconômicas do país, sendo de 76% nos países desenvolvidos e 45% nos países em desenvolvimento (PARKIN et al., 2005).

O termo câncer é utilizado para designar um conjunto de doenças. Dentre essas doenças, o carcinoma de próstata é o segundo mais prevalente em homens no mundo, sendo o mais prevalente em países desenvolvidos, onde aproximadamente $\frac{3}{4}$ dos casos ocorrem (BOYLE; LEVIN, 2008; FERLAY et al., 2010; JEMAL et al., 2011;). O Brasil, apesar de ser um país em desenvolvimento, se comporta como um país desenvolvido neste aspecto, pois o câncer de próstata é a neoplasia mais incidente em homens no país (INCA, 2011).

Devido ao câncer ser uma doença multifatorial, torna-se difícil saber exatamente as causas de seu desenvolvimento. Os fatores de risco para câncer de próstata ainda não estão bem estabelecidos, contudo, três fatores de risco têm sido identificados: idade avançada, etnia e hereditariedade (HEIDENREICH et al., 2011).

A idade avançada é um dos fatores de risco mais importante para o câncer de próstata, pois aproximadamente 81% dos casos ocorrem em indivíduos com mais de 65 anos (BECHIS et al., 2011; BRACARDA et al., 2005). A proporção do número de casos aumenta de acordo com a idade; abaixo dos 45 anos é raro, com incidência de 0,4 por 100.000 homens/ano, dos 45 aos 54 anos o número de casos é de 6 por 100.000 homens/ano; a incidência chega a 60 por 100.000 homens/ano para homens com 55 a 64 anos e 270 por 100.000 homens/ano para homens com mais de 65 anos (BRACARDA et al., 2005).

Em relação à etnia, estudos demonstram que asiáticos possuem um menor risco de desenvolverem câncer de próstata em relação aos caucasianos, e estes em relação aos afrodescendentes. Os últimos apresentam quase duas vezes mais risco de desenvolver a doença que os caucasianos e 2,4 vezes mais chances de morrer devido à mesma (CRAWFORD, 2009; KOLONEL; ALTSHULER; HENDERSON,

2004; JONES et al., 2008). Outro fator de risco bem descrito é o decorrente do histórico familiar de câncer. Em um estudo realizado por Braat (2002), foi demonstrado que o risco está diretamente relacionado com o número de parentes de primeiro grau afetados e a idade ao diagnóstico.

Diversos estudos vêm sendo realizados a fim de associar o câncer de próstata a outros fatores de risco, como a dieta, tabaco, consumo de álcool, atividade física, vasectomia, obesidade e deficiência de algumas vitaminas e micronutrientes; entretanto, esses resultados são fragmentados e inconsistentes (BRACARDA et al., 2005; DAMBER; AUS, 2008; FRIEDENRICH et al., 2001; LIPPMAN 2009; LOPHATANANON et al., 2010; PLASKON et al., 2003). Há ainda relatos na literatura sobre a provável proteção conferida pelo consumo de alimentos com licopeno e alto consumo de vegetais crucíferos para este câncer (COHEN et al., 2000; WCRF; AICR, 2007).

O câncer de próstata é uma doença multicêntrica e multifocal, além de ser hormônio dependente (SIMÕES et al, 2008; SCHAID, 2004). A maioria dos tumores está confinada dentro da próstata por muitos anos e nunca irá evoluir para um estágio clínico de câncer (LUO; YU, 2003). Há uma estimativa que cerca de 30% dos homens com mais de 50 anos e de 60-70% com mais de 80 anos possui a forma latente da doença (PENTYALA et al., 2000).

A grande maioria dos tumores prostáticos acomete a região posterior da glândula. Cerca de 70-75% dos tumores são encontrados na zona periférica da glândula, 15% surgem na zona central e 10-15% na zona transicional. Adenocarcinomas correspondem a 95% e 5% correspondem a outros tipos de tumor, entre eles o carcinoma de célula escamosa (0,5-1,0%) (BRACARDA et al., 2005).

A progressão para adenocarcinoma geralmente ocorre por estágios definidos histologicamente. Uma pequena proporção dos cânceres de próstata mostra invasão e metástase à distância (LUO; YU, 2003). A triagem é realizada por meio de exames de antígeno prostático específico (PSA) e toque digital retal (DRE). Os dois exames são complementares e, no caso de detecção de anormalidades no DRE e valores altos de PSA, é indicada a biópsia do tumor (THOMPSON et al., 2007). O diagnóstico é baseado nas avaliações histopatológicas da próstata (DAMBER; AUS, 2008).

Em populações que realizam triagem utilizando o PSA, a redução de metástases chegou a 53% e a mortalidade foi reduzida em 37% (LEEUEWEN et al., 2010). Recentemente, dois grandes estudos avaliaram o impacto da triagem utilizando o exame do PSA na mortalidade. O estudo europeu ERSPC (*European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer*), com duração de 11 anos, demonstrou uma redução moderada da mortalidade (SCHRÖDER et al., 2012) e o estudo norte-americano PLCO (*Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial*), com duração de 13 anos, não encontrou evidências da redução da mortalidade (ANDRIOLE et al., 2012).

O principal motivo da discussão em relação ao uso ou não do exame de PSA se deve à sua baixa sensibilidade e especificidade, pois ele é incapaz de distinguir câncer latente da forma agressiva do tumor. Além disso, doenças não neoplásicas, como hiperplasia prostática benigna e prostatites geram níveis de PSA aumentados, gerando resultados falso-positivos (BAADE, 2009; STROPE; ANDRIOLE, 2010). Estes fatos fazem com que um número substancial de homens seja diagnosticado e tratado desnecessariamente todos os anos. O sucesso da triagem depende da capacidade de um teste descobrir a doença que requer cura (STROPE; ANDRIOLE, 2010), o que não ocorre efetivamente com o exame do PSA.

Outro fator importante do diagnóstico deste câncer é que a análise da biópsia também pode ser fonte de erro. Estudos demonstram que apenas em cerca de 30% dos casos a somatória de *Gleason* da biópsia é igual à da prostatectomia radical (LATTOUF; SAAD, 2002). Portanto, é necessário o desenvolvimento de marcadores que supram esta carência no câncer de próstata.

O campo de marcadores moleculares para esta neoplasia é grande e infelizmente complicado devido à heterogeneidade da doença. Isso demonstra que uma solução mais fácil para diagnosticar de forma mais precisa o câncer de próstata ainda não foi encontrada (SCHROEDER, 2008), estimulando estudos em busca de marcadores moleculares para esta doença.

2.1. MARCADORES MOLECULARES DO TIPO POLIMORFISMOS GENÉTICOS

Dentre as diferentes formas de marcadores moleculares tumorais, os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) vêm sendo amplamente estudados para o desenvolvimento de marcadores para o câncer de próstata.

O mecanismo proposto para a contribuição dos polimorfismos no desenvolvimento do câncer de próstata é que as diferenças genéticas podem afetar a expressão dos genes e funcionalidade das proteínas e, com isso, promoverem uma desregulação celular, culminando no desenvolvimento de um tumor (GONZALO; ISAACS, 2003).

Estima-se que 40% dos carcinomas de próstata possuem um componente genético raro e de alta penetrância (GONZALGO; ISAACS, 2003). Contudo, diferentemente de outros tipos de cânceres, como o de mama que tem marcadores genéticos bem estabelecidos, a vasta maioria dos polimorfismos estudados para o câncer de próstata apresenta baixa penetrância e não são validados nos estudos subsequentes (REYNOLDS et al., 2007).

Schaid (2004) afirma que estudo do tipo caso-controle é um poderoso e eficiente método para avaliar a associação de potenciais fatores de risco para o câncer de próstata e que os melhores genes candidatos são os envolvidos em metabolismo de testosterona e outros andrógenos, devido ao fato do crescimento do câncer de próstata ser hormônio dependente.

Os estudos que buscam marcadores moleculares para o carcinoma prostático se concentram em duas grandes áreas: os genes relacionados com a metabolização de andrógenos e os genes envolvidos na metabolização de carcinógenos. Estudos também têm sido realizados em genes que realizam o reparo de DNA (COUGHLIN; HALL, 2002; REBBECK, 2002). Os genes candidatos mais estudados são: *AR* (receptor de andrógeno), *SRD5A2* (esteróide da 5 α -redutase do tipo II), *HSD3B* (3 beta-hidroxiesteróide desidrogenase) e *CYP17* (*Esteróide 17-alfa-Hidroxilase*), todos envolvidos na metabolização de andrógenos. Além desses, uma série de estudos tem avaliado genes envolvidos no metabolismo de carcinógenos ambientais, como os genes *CYP2D6*, *CYP2C19* (Família do citocromo P450), *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* (Família das glutathione-S transferase), *NAT1* e *NAT2* (Família das N-acetiltransferases), além do gene *KLK2* que codifica o PSA e o gene *VDR* que codifica o receptor da vitamina D (COUGHLIN; HALL, 2002; REBBECK, 2002).

Um dos fatores que influencia no desenvolvimento do câncer de próstata é a metabolização de andrógenos. A testosterona é o principal andrógeno circulante. Normalmente encontra-se ligada à albumina ou à globulina ligadora de hormônio sexual (SHBG); apenas uma pequena fração é encontrada livre no soro. Quando a testosterona entra nas células da próstata, 90% dela é convertida pela enzima 5 α -

redutase (SRD5A2) em di-hidrotestosterona (DHT), que é a forma mais ativa do hormônio, com afinidade cinco vezes maior ao receptor de andrógeno (AR) que a testosterona. A DHT liga-se ao AR induzindo a fosforilação do receptor. O AR se dimeriza e se liga aos elementos de resposta a andrógeno no promotor dos genes alvos, ativando a transcrição destes e, conseqüentemente, induzindo o crescimento e sobrevivência celular e o aumento de PSA (FELDMAN; FELDMAN, 2002).

Outro fator que influencia no desenvolvimento do câncer são os carcinógenos ambientais. Diariamente estamos expostos a diversos carcinógenos, e é amplamente aceito que a exposição a agentes químicos presentes no ambiente está associada ao risco aumentado de câncer (MILLER; MOHRENWEISER; BELL, 2001). A suscetibilidade ao câncer está relacionada com a metabolização desses xenobióticos. O processo de metabolização ocorre em duas fases. As enzimas de fase I, representadas pela família do Citocromo P450, realizam a ativação dos compostos químicos em formas eletrofílicas reativas, que produzem aductos de DNA (MURATA et al., 1998). As enzimas de fase II, como as Glutathione S-transferases, realizam a detoxificação, ou seja, facilitam a excreção dos compostos produzidos pelas enzimas de fase I, fazendo a conjugação e os transformando em compostos hidrossolúveis (COUGHLIN; HALL, 2002). Com isso, pessoas com alta atividade metabólica das enzimas de fase I e baixa capacidade de desintoxicação das enzimas de fase II podem apresentar um maior risco de desenvolvimento de câncer de próstata (STRONG, AMOS, 1996 apud COUGHLIN; HALL, 2002).

Apesar dos esforços da comunidade científica em encontrar um marcador genético para o câncer de próstata, os resultados ainda são insatisfatórios e estudos adicionais são necessários para elucidar essa problemática clínica.

2.2. MARCADORES MOLECULARES EPIGENÉTICOS

Atualmente tem se demonstrado que eventos epigenéticos, juntamente com eventos genéticos, são cruciais para a progressão do câncer (JORDÀ; PEINADO, 2010). O termo epigenética refere-se a modificações bioquímicas na estrutura da cromatina, herdáveis e reversíveis, que refletem em mudanças na expressão genica, não acompanhadas de mudanças na sequência do DNA (JONES; BAYLIN, 2007, CHIAM; RICCIARDELLI; BIANCO-MIOTTO, 2012, TABY; ISSA, 2012).

A metilação do DNA é um evento epigenético herdável, que exerce efeitos sobre a expressão gênica. Trata-se de adições covalentes de um grupo metil no carbono 5 das citosinas sucedidas por guaninas (dinucleotídeos CpG). A adição do grupo metil é catalisada por um grupo de enzimas altamente conservadas, denominadas DNA-metiltransferases (GOLL; BESTOR, 2005; JONES; BAYLIN, 2002).

Os dinucleotídeos CpG são encontrados em baixa frequência no genoma, mas em algumas regiões eles aparecem em altas concentrações e em *clusters*. Essas regiões são ditas ilhas CpGs e estão presentes na maioria dos genes de mamíferos. Aproximadamente 75% destas localizam-se em regiões promotoras ou próximo a elas, podendo ser encontradas em éxons ou ainda no primeiro íntron. A maioria das ilhas CpG associadas a promotores encontra-se não metilada em células normais (GOLL; BESTOR, 2005; JONES; BAYLIN, 2002; LI; OKINO; DAHIYA, 2004; PLASS, 2002; ROBERTSON, 2005; TAKAI; JONES, 2002), enquanto a maioria dos dinucleotídeos CpGs fora das ilhas CpG encontra-se metilada e geralmente em elementos repetitivos de DNA (YONDER; WALSH; BESTOR, 1997).

A metilação do DNA está relacionada com o silenciamento gênico, inibindo diretamente a transcrição, por impedir a ligação dos fatores de transcrição, ou indiretamente, recrutando proteínas de ligação a citosinas metiladas (PLASS, 2002; ROBERTSON, 2005). Assim, a hipermetilação das ilhas CpGs localizadas próximas a regiões promotoras é um importante mecanismo para a inativação gênica (ESTELLER, 2002).

O perfil de metilação encontrado no câncer é uma hipometilação global do genoma, isto inclui os elementos de DNA repetitivo, e uma hipermetilação das ilhas CpG associadas aos promotores dos genes (PLASS, 2002; JONES; BAYLIN, 2007). A instabilidade genômica, uma característica das células tumorais, é, em parte, resultado da desregulação das atividades dos transposons subsequente à desmetilação (YONDER; WALSH; BESTOR, 1997). Os transposons são elementos com capacidade de se mover de uma região para outra do genoma (LEWIN, 2009). A atividade de transposição é inativada pela metilação dos elementos transponíveis. Quando há uma desmetilação dessas regiões, os transposons se tornam ativos e contribuem para a instabilidade genômica (YONDER; WALSH; BESTOR, 1997).

Surpreendentemente, em seres humanos, a hipermetilação nos promotores durante o desenvolvimento do câncer é tão comum quanto à clássica inativação dos genes supressores de tumor (JONES; BAYLIN, 2002; TABY; ISSA, 2012). Em alguns tipos tumorais, a hipermetilação parece ser a única forma de inativação de alguns genes, como o gene que codifica a O6-metil-guanina-DNA metiltransferase (*MGMT*) (JONES; BAYLIN, 2002). Com isso, estudos visando a busca de marcadores epigenéticos são necessários, uma vez que os efeitos epigenéticos são tão determinantes quanto os efeitos genéticos para o desenvolvimento do câncer.

2.3. GENE *GSTP1* E O CÂNCER DE PRÓSTATA

As Glutathionas S-transferases (GST) são uma família de enzimas que realizam a detoxificação intracelular de vários tipos de xenobióticos e compostos químicos, por conjugação de compostos reativos eletrofílicos com a glutathiona (PICKETT, 1989; RUSHMORE; PICKETT, 1993).

Baseado em suas características químicas, imunológicas e suas propriedades estruturais, as GSTs são divididas em 5 famílias. Quatro famílias (α , μ , π e θ) codificam isoenzimas citosólicas (MANNERVIK et al., 1992) e uma família codifica uma forma microsomal da enzima (RUSHMORE; PICKETT, 1993).

O gene *GSTP1* é uma gene *caretaker*, que protege as células contra danos causados no DNA por compostos eletrofílicos da inflamação ou da exposição ambiental (PICKETT, 1989; LEE et al., 1994). Este gene está localizado no cromossomo 11q13, possui sete éxons, é bastante polimórfico e as diferentes variantes da proteína *GSTP1* possuem diferentes capacidades de metabolização. É descrito na literatura que a substituição A313G (rs1695) gera substituição do aminoácido Ile105Val no sítio ativo da enzima, levando assim, a uma redução na atividade da enzima (ZIMNIAK et al., 1994; ALI-OSMAN et al., 1997). A Figura 1 mostra um esquema da localização cromossômica deste gene, o SNPs rs1695 e sua ilha CpG.

A associação do polimorfismo rs1695 do gene *GSTP1* com câncer de próstata tem sido investigada. Jerónimo et al. (2002) não detectaram associação deste polimorfismo com câncer de próstata, enquanto outros estudos mostraram que esse polimorfismo está positivamente associado com esta neoplasia (KOTE-JARAIA et al., 2001, SIVOŇOVÁ et al., 2009). Com isso, os resultados encontrados para este

SNP ainda não são consistentes para afirmar sobre sua influência no câncer de próstata (MAO et al., 2004).

O gene *GSTP1* é predominantemente expresso na camada basal do epitélio da próstata (BEER et al., 2002). As células secretoras normais de próstata não expressam rotineiramente *GSTP1*, mas são capazes de expressá-lo se o promotor permanecer desmetilado. Já na maioria dos adenocarcinomas e neoplasias intraepiteliais prostáticas, a expressão deste gene é acentuadamente diminuída (DE MARZO et al., 1999). Lee et al. (1994) sugeriram que a inativação da expressão do gene *GSTP1* causada pela metilação pode ser o motivo pelo qual as células do epitélio normal adquirem uma maior vulnerabilidade aos compostos carcinogênicos eletrofílicos, propiciando, assim, o desenvolvimento do câncer de próstata.

A hipermetilação do gene *GSTP1* está presente em aproximadamente 90% dos casos de câncer de próstata (REYNODS, 2007; CAIRNS et al., 2001; JERÓNIMO et al, 2002). Diversos estudos vêm confirmando o alto nível de metilação no promotor deste gene (HASHAD et al. 2011; YOON et al., 2011). Contudo, a relação entre a hipermetilação do gene *GSTP1* e agressividade do tumor ainda não foi esclarecida. Alguns estudos não encontraram associação entre agressividade e hipermetilação (JERÓNIMO et al., 2002; YOON et al., 2011), enquanto que outros relataram uma associação (HASHAD et al., 2011; DELGADO-CRUZATA et al., 2012). Portanto, novas avaliações do promotor deste gene deverão ser realizadas com o intuito de esclarecer essas questões.

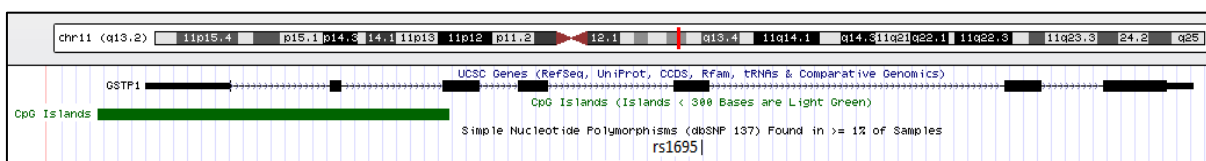


Figura 1: Esquema do gene *GSTP1* contendo sua localização cromossômica, promotor, éxons e introns, ilha CpG e SNP rs1695.

2.4. GENE *MGMT* E O CÂNCER DE PRÓSTATA

A proteína O6-metil-guanina-DNA metiltransferase (*MGMT*) humana consiste de 207 aminoácidos e é uma das mais importantes proteínas de reparo de DNA, pois catalisa, em um único passo, a transferência de grupos metil da guanina da dupla fita de DNA, induzidos por agentes alquilantes, para um resíduo de cisteína no

centro ativo da enzima evitando, assim, as transições G:C para A:T (PEGG; BYERS, 1992; DANIELS et al., 2000).

O gene *MGMT* está localizado no cromossomo 10q26 e possui cinco éxons (MARGISON et al., 2003; NATARAJAN et al., 1992 apud ZHONG et al., 2010). Diversos polimorfismos já foram identificados neste gene; os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 estão geneticamente ligados e geram, respectivamente, substituição de aminoácidos na proteína nas posições Ile143Val e Lis178Arg. Esses polimorfismos estão próximos à cisteína reativa do centro ativo da enzima, por isso essas substituições causam consequências funcionais à proteína (BUGNI et al., 2007), prejudicando o reparo do DNA (PEGG; FANG; LOKTIONOVA, 2007). A Figura 2 demonstra um esquema com a localização cromossômica deste gene, sua ilha CpG e os SNPs.

Vários estudos têm sido realizados para investigar as variantes do gene *MGMT*. Ritchey et al. (2005) não observaram associação dos polimorfismos rs2308321 e rs2308327 com câncer de próstata. Contudo, Loh et al. (2010) demonstraram que estes polimorfismos, quando associados ao alto consumo de álcool, aumentam em duas vezes o risco do desenvolvimento de câncer de próstata. Estes resultados contrastantes apontam para a necessidade de outros estudos que investiguem a relação destes polimorfismos com o câncer de próstata.

Além dos polimorfismos que afetam a função da proteína *MGMT*, sua expressão pode ser inativada via metilação na região promotora do gene (QIAN; BRENT, 1997), o que, segundo Esteller et al. (1999), desempenha um papel importante em vários tipos primários de câncer.

Os estudos relacionando carcinoma de próstata e metilação do gene *MGMT* ainda são raros e contrastantes. Um estudo avaliando câncer de próstata em relação à neoplasia intraepitelial prostática e hiperplasia prostática benigna não encontrou diferenças significativas na metilação do promotor de *MGMT* (JERÓNIMO et al., 2004). Outros estudos apontam metilação baixa ou inexistente em câncer de próstata (YAMANAKA et al., 2003; MARUYAMA et al., 2002). Contudo, Kang et al. (2004) encontraram metilação no gene *MGMT* em 75,5% das amostras de câncer de próstata analisadas. Estes dados refletem a importância de se realizar mais estudos sobre metilação do gene *MGMT* para definir sua contribuição no câncer de próstata.

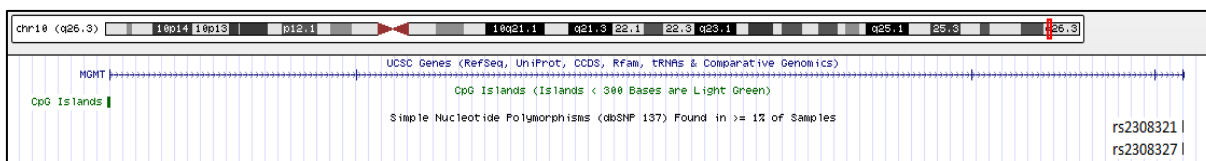


Figura 2: Esquema do gene *MGMT* contendo sua localização cromossômica, ilha CpG e os SNPs rs2308321 e rs2308327.

2.5. GENE *AR* E CÂNCER DE PRÓSTATA

Os andrógenos são reguladores críticos da diferenciação e função da próstata, bem como do crescimento e sobrevivência do câncer de próstata (DEHM; TINDALL, 2006). O receptor de andrógeno (AR) pertence à superfamília de receptores hormonais nucleares e atua principalmente como fator de transcrição nuclear (CULIG et al., 2003; HEINLEIN; CHANG, 2002).

Apesar de andrógenos séricos por si só não promoverem o desenvolvimento da carcinogênese de próstata, a ação do andrógeno e do estado funcional do gene *AR* são importantes mediadores da progressão deste câncer (HEINLEIN; CHANG, 2004).

O gene *AR* está localizado no cromossomo Xq11-12, contendo oito éxons (GELMANN, 2002). A Figura 3 apresenta um esquema deste gene. O receptor AR possui três domínios funcionais. Um domínio N-terminal, que contém as repetições (CAG)_n e, deste modo, é variável; um domínio de ligação ao DNA e um domínio C-terminal, de ligação ao ligante, além de uma braçadeira entre os dois últimos domínios (MACLEAN; WARNE; ZAJAC, 1997).

A região N-terminal do receptor AR é importante para determinar a extensão da atividade transcricional. Ela contém um número variável de repetições de poliglutaminas e poliglicinas e foi demonstrado em estudos experimentais que uma diminuição do número de poliglutaminas está associada à maior atividade do receptor (CULIG et al., 2003). Isso é refletido em nível de DNA pelo número de repetições (CAG)_n e (GGC)_n. Estudo de Irvine et al. (1995) e do nosso grupo de pesquisa (KUASNE et al., 2010) demonstraram, respectivamente, uma ligação entre repetições curtas e risco aumentado para câncer de próstata em pacientes norte americanos e brasileiros.

O polimorfismo de nucleotídeo único *ARStuI* (G1722A) está localizado no códon 211, entre dois marcadores de microssatélites, poli-Q (CAG) e poli-G (GGC)

no éxon 1 do gene *AR*. Este polimorfismo apresenta dois alelos, S2 (G) que sofre clivagem quando exposto à enzima de restrição *StuI*, e S1 (A) que não é clivado. Um estudo realizado por Medeiros (2003) em caucasianos americanos portadores de câncer de próstata demonstrou que a frequência alélica de G (87,3%) era muito maior que a do alelo A (12,3%). Porém, a frequência do alelo A em pacientes com escore de *Gleason* ≥ 7 era de 70%. Os autores observaram também que a maioria dos pacientes portadores deste alelo não apresentava metástase óssea. No entanto, Lindström et al. (2010) não encontraram associação entre este polimorfismo e câncer de próstata. Estes resultados contrastantes demonstram a necessidade de mais estudos para esclarecer a influência deste polimorfismo no câncer de próstata.

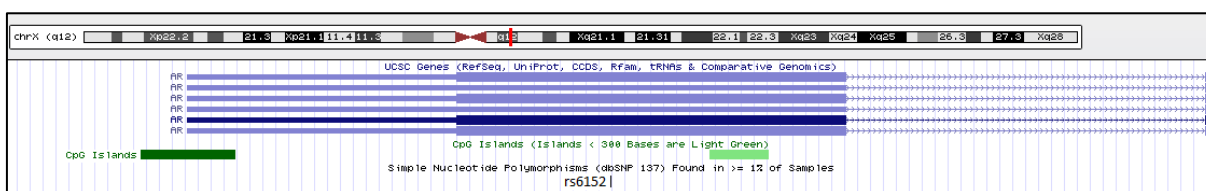


Figura 3: Esquema do gene *AR* contendo sua localização cromossômica, variantes transcricionais, ilhas CpGs e SNP rs6152.

2.6. GENE *VDR* E CÂNCER DE PRÓSTATA

A proliferação celular da próstata não é regulada apenas pelos andrógenos, mas também pela vitamina D. O receptor de vitamina (VDR) para $1\alpha,25\text{-dihidroxitamin D}$ ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$), a forma ativa da vitamina D, é expresso nas células da próstata. Este receptor, quando ativado, forma dímero e recruta outros fatores de transcrição, regulando diversos genes alvos, incluindo os envolvidos na proliferação celular, diferenciação e apoptose (MILLER, 1999; AHN et al., 2009; DONKENA et al., 2011). Vários estudos demonstram que $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ estimula a diferenciação e inibe a proliferação celular, a invasão e a metástase das células da próstata (CHEN; KITAKA, 2011). Estudo realizado por Shui et al. (2012) demonstrou que níveis plasmáticos altos de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ estão ligados a um menor risco de câncer de próstata letal. Contudo, a via do VDR para inibir a progressão do câncer de próstata depende do estado do VDR e não apenas dos níveis de $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ sanguíneos (SWAMI; KRISHNAN; FELDMAN, 2011).

O gene *VDR* localiza-se no cromossomo 12q13 e possui nove éxons (NEJENTSEV et al., 2004; HOLICK et al. 2007). Dentre os cinco polimorfismos mais

estudados deste gene está o *BsmI* (rs1544410) (HOLICK et al., 2007). Este polimorfismo localiza-se no íntron 8 e possui um forte desequilíbrio de ligação ($D' \geq 0,8$) com outros polimorfismos localizados no éxon 9 e região 3' UTR (NEJENTSEV et al., 2004; HOLICK et al., 2007). Como esta região está ligada à estabilidade do mRNA, SNPs situados nestes locais podem resultar em diferenças na expressão do gene *VDR*. (MORRISON et al., 1994 apud HABUCHI et al., 2000). A Figura 4 apresenta um esquema da localização cromossômica deste gene, o SNP rs1544410 e sua ilha CpG.

Cheteri et al. (2004) encontraram associação entre o genótipo GG (prevalente) e aumento de risco de câncer de próstata em populações norte americanas. Contudo, outros estudos em populações também norte americanas não encontraram associação deste polimorfismo com câncer de próstata (HOLICK et al., 2007; LI et al., 2007). Portanto, a realização de outros estudos a fim de esclarecer o verdadeiro efeito deste polimorfismo no câncer de próstata são necessários.

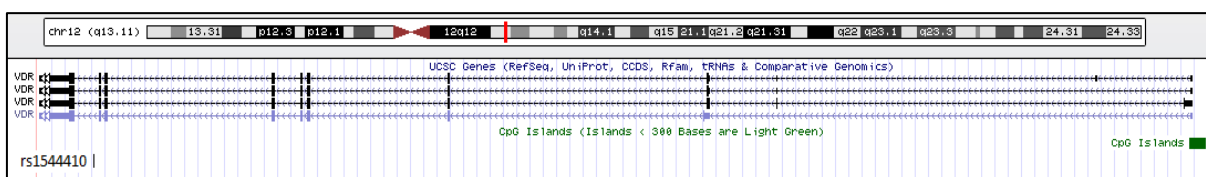


Figura 4: Esquema do gene *VDR* contendo sua localização cromossômica, variantes trancricionais, ilha CpG e SNP rs1544410.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores moleculares genéticos e/ou epigenéticos para suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um estudo do tipo caso-controle para avaliar a possível associação de variantes polimórficas nos genes *GSTP1*, *MGMT*, *AR* e *VDR* com suscetibilidade ao câncer de próstata.
- Correlacionar os dados do estudo de associação com os parâmetros clínicos e histopatológicos para avaliar o potencial da presença de algumas dessas variantes como marcadores moleculares de progressão tumoral.
- Avaliar o padrão de metilação dos genes *MGMT* e *GSTP1* no DNA das amostras obtidas de carcinoma de próstata e de tecido normal de próstata adjacente ao tumor, para avaliar a possível associação com diferentes graus de diferenciação tumoral e estadiamento clínico dos pacientes.
- Realizar uma análise integrada dos dados de genotipagem e metilação.

4. MANUSCRITO I

Polimorfismos genéticos associados com risco e/ou proteção ao desenvolvimento e progressão do câncer de próstata

Marilesia Ferreira de Souza¹, André van Helvoort Lengert¹, Gustavo Rafael Mazzaron Barcelos², Fernando Barbosa Jr²; Helen Kuasne¹, Marcelo Tempesta de Oliveira¹, Paulo Emílio Fuganti⁴, Ilce Mara de Syllos Cólus^{1*}

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

²Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

³Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

⁴Hospital do Câncer de Londrina, Londrina, PR, Brasil

*Correspondência para:

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

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

Londrina, Paraná - Brasil

CEP: 86.057-970

Telefone: 55.43.3371-4608

e-mail: colus@sercomtel.com.br

Artigo a ser submetido à revista *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*

ISSN: 1365-7852

Fator de impacto: 2.421

Resumo

O presente estudo avaliou a associação entre os polimorfismos dos genes *GSTP1* (rs1695), *MGMT* (rs2308321), *AR* (rs6152) e *VDR* (rs1544410) e o câncer de próstata, por meio de genotipagem de 223 pacientes e 223 indivíduos controles utilizando a metodologia de PCR em tempo real. A associação dos genótipos GG (*GSTP1*) e GA (*VDR*) conferiu um aumento de risco para o câncer de próstata de 2,3 vezes (OR=2,34; IC95%=1,10-4,97, p=0,04). Por outro lado, o genótipo AG do gene *GSTP1* conferiu efeito protetor para comprometimento de vesícula seminal (OR=0,22; IC95%=0,07-0,69, p=0,01), e quando associado com o alelo G do gene *AR*, apresentou efeito protetor para o câncer de próstata (OR=0,61; IC95%=0,39-0,96, p=0,04). Portanto, podemos sugerir que no presente estudo os SNPs relacionados com a baixa atividade enzimática de genes de diferentes vias, em conjunto, podem colaborar para o desenvolvimento do câncer de próstata. Por outro lado, a associação dos SNPs estudados dos genes *GSTP1* e *AR* pode levar a um efeito protetor para este câncer.

Palavras-chave: *AR*, *GSTP1*, *MGMT*, *VDR*, câncer de próstata, polimorfismo.

Introdução

O câncer de próstata é o segundo tipo de neoplasia mais diagnosticado em homens e as taxas de incidência podem variar mais de 25 vezes em todo mundo¹. No Brasil, devido ao aumento da expectativa de vida da população, é esperado que os casos desta neoplasia aumentem em cerca de 60% até 2015². Apesar de sua alta incidência, o prognóstico na maioria dos casos é considerado bom, sendo que a taxa de sobrevivência é, em média, de 58% em cinco anos³.

Aproximadamente 81% dos casos de câncer de próstata ocorrem em homens com mais de 65 anos e a proporção do número de casos aumenta de acordo com a idade. Portanto, esta neoplasia é considerada uma doença que acomete homens na terceira idade, sendo rara ou de baixa incidência em faixas etárias menores^{4,5}.

Atualmente a triagem para o câncer de próstata realizada em diversos países, inclusive no Brasil, se constitui de dois exames complementares: nível de antígeno prostático específico (PSA) e toque digital retal (DRE). Estes exames não detectam

todos os carcinomas prostáticos e os níveis de PSA não diferenciam a forma latente da forma agressiva do tumor, fazendo com que homens com a forma não letal da doença não se beneficiem deste diagnóstico e do consequente tratamento. Estudos recentes discutem o custo-benefício do teste e se este deve ser mantido. Portanto, estratégias para melhorar a sensibilidade do exame de PSA e o desenvolvimento contínuo de novos marcadores para o tipo agressivo da doença são necessários⁶⁻⁹.

Dentre os genes candidatos a marcadores moleculares para o câncer de próstata estão os envolvidos na via de andrógenos, na metabolização de carcinógenos, reparo de DNA e o receptor da vitamina D¹⁰⁻¹².

O gene *AR* está localizado no cromossomo X e codifica o receptor de andrógeno que atua, principalmente, como um fator de transcrição nuclear, ativando a transcrição de genes que estimulam o crescimento e sobrevivência das células da próstata¹³⁻¹⁵. Estudos sugerem que o polimorfismo rs6152 (*ARStuI*) (G1722A), localizado no códon 211 deste gene, possui relação com câncer de próstata¹⁶.

O gene *GSTP1* pertence à família das Glutathione S-transferases (GST) e codifica uma proteína que realiza detoxificação intracelular de compostos eletrofílicos da inflamação ou da exposição ambiental^{17,18}. A diminuição da expressão deste gene pode ocasionar um aumento da inflamação e estresse oxidativo nas células da próstata¹⁹. O polimorfismo rs1695 refere-se à transição de A313G, que leva à troca de aminoácido Ile105Val, acarretando em uma enzima com atividade reduzida^{20,21}. A relação entre este polimorfismo e o câncer de próstata tem sido investigada, porém, os resultados ainda não são consistentes^{22,23}.

O gene *MGMT* codifica a proteína O6-metil-guanina-DNA metiltransferase (*MGMT*), uma das mais importantes proteínas de reparo do DNA²⁴. Os polimorfismos rs2308321 e rs2308327 estão em perfeito desequilíbrio de ligação e resultam, respectivamente, na troca de aminoácidos Ile143Val e Lys178Arg. Ambos os polimorfismos estão próximos do centro ativo da enzima e causam alterações funcionais na mesma, levando, assim, a uma diminuição do reparo de DNA e podendo prejudicar o sistema de reparo nas células da próstata^{25,26}. Relatos da associação desses polimorfismos com o câncer de próstata são escassos na literatura^{27,28}.

O gene *VDR* codifica o receptor de vitamina D (*VDR*), que participa da regulação da proliferação celular da próstata. Quando ativado pela $1\alpha,25$ -di-hidroxitamina D ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$), o receptor *VDR* atua como fator de transcrição,

regulando diversos genes alvos²⁹⁻³¹. Está descrito que o polimorfismo rs1544410 (*BsmI*) deste gene apresenta desequilíbrio de ligação ($D' \geq 0,8$) com polimorfismos na região 3'UTR ou próximos a ela. Esta região é importante para a estabilidade do RNAm, e estes polimorfismos podem afetar os níveis de mRNA^{32,33}. No entanto, a associação deste polimorfismo com câncer de próstata permanece não esclarecida³⁰.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar as variantes alélicas nos genes mencionados, buscando uma associação destes com a suscetibilidade e progressão do câncer de próstata.

Material e métodos

Amostras

Os pacientes com câncer de próstata foram recrutados do Hospital do Câncer de Londrina (Londrina-PR, Brasil) no período de 2006 a 2012. Foi realizado um estudo do tipo caso-controle com 223 pacientes pareados com 223 indivíduos sem histórico de neoplasia (controle), seguindo o padrão de idade (+/- 5 anos), grupo étnico, hábito tabagista, etilista e nível de PSA (inferior a 4 ng/mL para os controles). A categorização dos grupos étnicos foi realizada de acordo com as categorias étnico-raciais consideradas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística³⁴.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 0031.0.268.000-10). Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), responderam a um questionário sobre estilo de vida e exposição ocupacional (Anexo 1) e doaram uma amostra de sangue periférico (4 mL).

A coleta de sangue periférico foi realizada por punção intravenosa com agulhas e tubos *BDvacutainer*[®] descartáveis, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 6%). O sangue total foi centrifugado a 850 g por 10 minutos e a camada de leucócitos foi retirada e armazenada a -20°C.

Extração de DNA genômico

Para extração do DNA genômico sanguíneo foi realizada a lise de leucócitos e digestão de proteínas com proteinase k (10 mg/mL). Após a lise completa, o DNA foi

isolado por Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (25:24:1), seguindo as recomendações do fabricante (*Invitrogen*). As amostras foram quantificadas em fluorímetro Qubit (*Invitrogen*), utilizando-se o kit Quanti-T dsDNA (*Invitrogen*).

Genotipagem dos genes *GSTP1*, *MGMT*, *AR* e *VDR*

As genotipagens foram realizadas pela técnica de PCR em tempo real utilizando TaqMan® SNP Genotyping Assays (*Applied Biosystems*), Genotyping Master mix (*Applied Biosystems*) e 5 ng de DNA genômico para cada gene *GSTP1* (rs1695; C_3237198_20), *MGMT* (rs2308321; C_15759332_10), *AR* (rs6152; C_11608716_10) e *VDR* (rs1544410; C_8716062_10). As quantidades dos reagentes e a ciclagem foram realizadas de acordo com recomendações do fabricante.

Análise Estatística

A análise da razão de chance (OR) foi realizada por meio da relação dos genótipos prevalentes, heterozigotos e raros entre pacientes e controles. Os parâmetros etilismo, tabagismo, histórico familiar de câncer, consumo de carne bovina e exposição ocupacional a agroquímicos foram avaliados quanto às suas possíveis associações com as frequências genotípicas obtidas. Também foram avaliadas as associações dos genótipos com os parâmetros clínicos e histopatológicos obtidos dos prontuários.

Para o cálculo de *Odds Ratio* – OR com 95% de intervalo de confiança foi empregado o programa estatístico BioEstat 5.0 (BioEstat, Belém do Pará, Pará, Brasil) e o software estatístico SPSS 20 (IBM, Armonk, NY, EUA). Na análise univariada os fatores com $p < 0,2$ foram inclusos na regressão logística multivariada. O teste do qui-quadrado foi utilizado para verificar se os genótipos estudados estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* nesta amostra. Para todas as análises foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

Resultados

As principais características da amostra estão dispostas na Tabela 1. Os indivíduos eram predominantemente de origem caucasiana (88,8%). A média de idade dos pacientes foi de $65,2 \pm 7,4$ e dos controles de $63,2 \pm 8,8$ anos (Teste t-

student: $p=0,20$). O histórico familiar de câncer mostrou diferenças estatisticamente significativas entre pacientes com câncer de próstata e controles. Outros fatores como exposição ocupacional a agroquímicos, etnia, consumo de carne bovina e hábitos tabagista e etilista não apresentaram diferenças significativas. O teste do qui-quadrado realizado para cada um dos genes mostrou que todos estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As análises alélicas e genotípicas dos genes *GSTP1*, *MGMT*, *VDR* e *AR* mostraram que, individualmente, eles não aumentaram significativamente o risco de câncer de próstata (Tabela 2). Os resultados também não se mostraram significativos quando foram associados os diferentes genótipos com os possíveis fatores de risco: fumo, álcool e exposição ocupacional a agroquímicos (dados não apresentados).

A análise de associação dos diferentes genes em pares indicou que a combinação entre os genótipos GG do gene *GSTP1* e GA do gene *VDR* aumentou o risco em 2,3 vezes ($OR=2,34$; $IC95\%=1,10-4,97$; $p=0,04$) para o câncer de próstata (Tabela 3). A combinação entre o genótipo AG do gene *GSTP1* e o alelo G do gene *AR* apresentou um efeito protetor ($OR=0,61$; $IC95\%=0,39-0,96$; $p=0,04$) para este câncer (Tabela 3). As demais combinações não apresentaram resultados estatisticamente significativos (dados não mostrados).

As análises conjuntas dos parâmetros histopatológicos e genotípicos estão na Tabela 4. Para comprometimento de vesícula seminal, o genótipo AG do gene *GSTP1* mostrou efeito protetor ($OR=0,22$; $IC95\%=0,07-0,69$; $p=0,01$). Os outros parâmetros clínicos e histopatológicos combinados com os genótipos estudados não apresentaram relação com câncer de próstata.

Discussão

O presente estudo avaliou, em pacientes com câncer de próstata e seus respectivos controles, polimorfismos em quatro genes envolvidos nas vias de desenvolvimento e progressão deste câncer, como as de proliferação celular, de crescimento, de metabolismo e reparo de DNA.

Como pode ser observado na tabela 1, 92,8% dos pacientes do presente estudo tinham 55 anos ou mais, sendo que 57,8% dos pacientes apresentavam idade igual ou superior a 65 anos, confirmando dados de estudos anteriores que

também demonstraram que a idade aumentada está diretamente relacionada com a doença^{35,36}. Entre as características epidemiológicas estudadas nesta amostra histórico familiar de câncer mostrou-se relacionado com risco à doença ($p < 0,01$), confirmando dados revistos por Heidenreich et al.³⁷. O histórico familiar de câncer apresenta forte relação com risco de câncer de próstata, sendo que o aumento de risco é decorrente do número de parentes de primeiro grau afetados e idade ao diagnóstico³⁸. Nossos achados corroboram esses dados, pois 53,4% dos pacientes do presente estudo possuíam pelo menos um parente de primeiro grau acometido com câncer e, destes, em 32% dos casos a localização do câncer era na próstata.

Os resultados do presente estudo revelaram que as variantes polimórficas dos genes *GSTP1* (rs1695), *MGMT* (rs2308321), *VDR* (rs1544410) e *AR* (rs6152), quando analisadas isoladamente, não apresentaram um risco significativo para o câncer de próstata (Tabela 2). Este fato corrobora os dados da literatura, que buscaram associar o câncer de próstata com os mesmos genes avaliados no presente estudo: *GSTP1*³⁹⁻⁴¹, *MGMT*^{27,28}, *AR*^{16,42,43} e *VDR*^{29,44-47}. Portanto, esta é mais uma evidência de que estes genótipos, de forma isolada, parecem não contribuir para o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata.

Segundo Yen et al.⁴⁸, polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) isolados podem não apresentar um risco significativo para cânceres, mas quando em associação, tais SNPs podem influenciar no aumento de risco. A análise combinada dos genes estudados no presente trabalho corrobora esta hipótese, pois foi possível observar um aumento de risco de câncer de próstata ao incluir mais de um gene na análise. A associação do genótipo raro GG do gene *GSTP1* com o genótipo heterozigoto GA do gene *VDR* levou a um aumento de risco de 2,3 vezes ($OR=2,34$; $IC95\%=1,10-4,97$; $p=0,04$) para o câncer de próstata (Tabela 3). Dentro do nosso conhecimento, não há relatos da associação desses polimorfismos como indicativo de risco para câncer de próstata. Portanto, esta é, provavelmente, uma primeira evidência da importância da associação desses genótipos para avaliação do risco deste câncer.

A Glutationa-S tranferase P1, codificada pelo gene *GSTP1*, desempenha diversas funções nas células. Ali-Osman et al.²⁰ demonstraram que a transição A313G neste gene gera uma substituição de aminoácido (Ile105Val), que provoca uma redução na atividade da enzima. Watson et al.⁴⁹ verificaram a atividade enzimática dos portadores dos genótipos AA, AG e GG, de *GSTP1*, demonstrando

diferenças significativas entre os alelos A e G, e que os portadores dos genótipos AG apresentavam um nível intermediário (62,1 nmol/mg por min) de enzima em relação aos genótipos AA (74,9 nmol/mg por min) e GG (52,5 nmol/mg por min).

Kanwal et al.¹⁹ demonstraram uma relação entre diminuição da expressão de *GSTP1* em células de carcinoma de próstata e aumento de danos no DNA, sugerindo que a redução da expressão de *GSTP1*, juntamente com o aumento nos níveis de 8-OHdG (8-oxo-20-deoxyguanosine), podem contribuir para a formação de intermediários reativos e lesões oxidativas no DNA. Assim, os autores associaram os baixos níveis da expressão desta enzima, conferidos pelo genótipo raro GG, com uma maior suscetibilidade ao câncer de próstata.

O aumento de risco para o câncer de próstata obtido no presente estudo envolve o genótipo GG do gene *GSTP1*, ou seja, o genótipo que confere uma atividade reduzida da enzima, quando associado ao genótipo GA do polimorfismo rs1544410 (*BsmI*) do gene *VDR*. Este polimorfismo do gene *VDR* possui um forte desequilíbrio de ligação com polimorfismos na região 3' UTR ou próximos a ela, podendo, assim, afetar os níveis do mRNA^{32,33}. O gene *VDR* é expresso nas células da próstata e algumas funções dessas células dependem da capacidade de ligação de ligantes e ativação do receptor, o qual regula a expressão e função de vários genes³⁰. Logo, uma diminuição da expressão do gene *VDR* pode acarretar em uma desregulação de vários genes e, com isso, pode favorecer o processo de carcinogênese. Além disso, Figer et al.⁵⁰ sugeriram que o gene *VDR* pode, ainda, modular algumas substâncias carcinogênicas. Portanto, eventos que levam à desregulação celular via gene *VDR* (rs1544410), juntamente com a diminuição da atividade da enzima codificada pelo gene *GSTP1* (rs1695), culminam em um aumento do risco de câncer de próstata na população estudada.

A análise combinada também apontou efeito protetor da associação do genótipo AG do gene *GSTP1* e do alelo G do gene *AR* (Tabela 3). O gene *AR* codifica o receptor de andrógeno, e o estado funcional deste gene medeia a progressão do câncer de próstata⁵¹. Polimorfismos neste gene podem afetar o estado funcional deste receptor. Estudos do tipo caso-controle mostraram não haver associação entre o polimorfismo rs6152 analisado neste estudo e suscetibilidade ao câncer de próstata^{16,42,43}. Entretanto, ao relacionar progressão do câncer de próstata com esse mesmo polimorfismo, Medeiros¹⁶ encontrou associação entre o alelo A e progressão desta patologia. O efeito protetor encontrado na análise combinada do

presente estudo envolve o alelo G do gene AR, que nos estudos anteriormente citados não foi relacionado com suscetibilidade e progressão do câncer de próstata.

As glutatona S-transferase (GST) possuem diversas funções nas células, realizando, principalmente, conjugação de compostos com a glutatona, mas as GSTs podem participar também da síntese de hormônios esteróides. A testosterona, assim como a progesterona, é originada de um metabólito do colesterol. Entre os diversos passos para formação da testosterona, o intermediário *5 α -pregnane17 α -ol-3,20-dione* é convertido em *5 α -pregnane3 α ,17 α -diol-20-one* pela enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase. A função desta enzima pode ser substituída pelas glutatona e estudos demonstram que provavelmente a maioria das GSTs pode catalisar este processo *in vivo*⁵²⁻⁵⁴. Logo, uma grande quantidade de GSTs possibilitaria uma maior síntese hormonal e, com isso, uma maior probabilidade de ativação do receptor de andrógeno. Já a diminuição da atividade de glutatona poderia prejudicar a síntese hormonal, além de influenciar as demais funções essenciais de detoxificação.

O efeito protetor observado no presente estudo da análise combinada entre os genes *GSTP1* e *AR* envolve o genótipo AG do gene *GSTP1*, que como mencionado anteriormente, refere-se a uma produção intermediária desta enzima. Portanto, os dados apresentados permitem-nos postular que a quantidade intermediária de enzima determinada pelo genótipo AG do gene *GSTP1* pode promover um melhor equilíbrio entre a síntese hormonal para ativação do receptor de andrógeno, podendo levar a uma diminuição do risco de câncer de próstata, visto que este câncer é hormônio dependente. Essas hipóteses explicariam, também, o efeito protetor observado no presente estudo do genótipo AG (OR=0,22; IC95%=0,07-0,69; p=0,01) do gene *GSTP1* para invasão de vesícula seminal.

Além disso, na literatura há estudos que demonstram que o alelo A do gene *GSTP1* apresenta uma redução significativa do risco de câncer de próstata^{55,56} e, também, há indícios de que o genótipo GG pode modular o risco deste câncer, aumentando-o⁵⁷. Os achados do presente estudo para o gene *GSTP1* fortalecem ambas evidências, pois foi observado efeito protetor associado ao genótipo AG, o qual contém o alelo A, provável responsável por tal efeito e também foi demonstrado efeito de risco para o genótipo GG.

Os genes envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata são diversos e polimorfismos nesses genes podem colaborar para o

desenvolvimento deste câncer^{10,58}. O presente estudo demonstrou que SNPs relacionados com a baixa atividade enzimática de genes de diferentes vias podem colaborar para o desenvolvimento do câncer de próstata. Além disso, foi demonstrado que o genótipo AG do gene *GSTP1* isolado ou em combinação com o alelo G do gene *AR* pode favorecer um equilíbrio entre as vias da proliferação celular prostática das quais participam, gerando um efeito protetor a estas células.

Tabela 1: Características epidemiológicas de pacientes com câncer de próstata e indivíduos controles.

Características		Pacientes n (%)	Controles n (%)	p valor
Idade (X±DP) ^a (Anos)		65,2±7,4	63,2±8,8	0,20
	42 a 54	16 (7,2)	45 (20,2)	
	55 a 64	78 (35,0)	76 (34,1)	
	≥ 65	129 (57,8)	102 (45,7)	
Etnia	Caucasiano	198 (88,8)	198 (88,8)	1,00
	Afrodescendente ^b	25 (11,2)	25 (11,2)	
Hábito tabagista	Sim	55 (24,7)	55 (24,7)	1,00
	Não	168 (75,3)	168 (75,3)	
Hábito etilista	Sim	106 (47,5)	106 (47,5)	1,00
	Não	117 (52,5)	117 (52,5)	
Exposição ocupacional a agroquímicos	Sim	133 (59,6)	114 (51,1)	0,07
	Não	90 (40,4)	109 (48,9)	
Histórico familiar de câncer	Sim	119 (53,4)	93 (41,7)	0,01*
	Não	104 (46,6)	130 (58,3)	
Consumo de carne bovina ^c	1 a 4	125 (56,1)	108 (48,4)	0,11
	5 a 7	98 (43,9)	115 (51,6)	

^aX±DP = média ± desvio padrão

^bAfrodescendentes, negros e pretos

^cNúmero de vezes que o indivíduo consome carne bovina na semana

*Resultados estatisticamente significativos (p<0,05).

Tabela 2: Frequências alélicas e genotípicas dos genes *GSTP1*, *MGMT*, *VDR* e *AR* em pacientes e controles e análise de risco para câncer de próstata.

Genes	Pacientes		Controles		OR (IC95%) ^a	p valor	OR (IC95%) Multivariada ^b	p valor
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)				
<i>GSTP1</i>								
A/A	91 (40,8)	85 (38,1)	1,00 (Referência)		1,00 (Referência)			
A/G	96 (43,0)	111 (49,8)	0,81 (0,54 - 1,21)	0,35	0,85 (0,56-1,29)	0,44		
G/G	36 (16,1)	27 (12,1)	1,25 (0,70 - 1,31)	0,55	1,53 (0,83 - 2,84)	0,18		
A/G e G/G	132 (59,2)	138 (57,4)	0,89 (0,61 - 1,31)	0,63	-			
A	230 (65,7)	225,5 (67,3)	1,00 (Referência)		-			
G	120(34,3)	109,5 (32,7)	1,08 (0,78 - 1,48)	0,71	-			
<i>MGMT</i>								
A/A	190 (85,2)	187 (83,9)	1,00 (Referência)		1,00 (Referência)			
A/G	28 (12,6)	35 (15,7)	0,79 (0,46 - 1,35)	0,46	0,62 (0,35 - 1,10)	0,10		
G/G	5 (2,2)	1 (0,4)	4,92 (0,57- 42,52)	0,79	4,67 (0,51 - 42,32)	0,17		
A/G e G/G	33 (14,8)	36 (16,1)	0,90 (0,54 - 1,50)	0,79	-			
A	394 (94,3)	391,5 (95,3)	1,00 (Referência)		-			
G	24 (5,7)	19,5 (4,7)	1,25 (0,68 - 2,33)	0,57	-			
<i>VDR</i>								
G/G	79 (35,4)	91 (40,8)	1,00 (Referência)		1,00 (Referência)			
G/A	144 (64,6)	132 (59,2)	1,26 (0,86 - 1,84)	0,28	1,28 (0,86 - 1,91)	0,23		
A/A	0 (0,0)	0 (0,0)	-		-			
G/A e A/A	144 (64,6)	132 (59,2)	1,26 (0,86 - 1,84)	0,28	-			
G	230 (76,2)	248 (79,0)	1,00 (Referência)		-			
A	72 (23,8)	66 (21,0)	1,18 (0,81 - 1,72)	0,46	-			
<i>AR</i>								
G	173 (77,6)	179 (80,3)	1,00 (Referência)		1,00 (Referência)			
A	50 (22,4)	44 (9,7)	1,18 (0,74 - 1,85)	0,56	1,13 (0,70 - 1,83)	0,62		

^aValor de Odds Ratio com intervalo de confiança 95% não corrigidos.

^bValor de Odds Ratio com intervalo de confiança 95% corrigidos por idade, exposição ocupacional a agroquímicos, histórico familiar e consumo de carne bovina.

Tabela 3: Associação entre os genótipos dos genes *GSTP1*, *VDR* e *AR* em pacientes com câncer de próstata e seus controles.

Genes	Genótipos	Pacientes	Controles	OR (IC95%)	p valor
		n (%)	n (%)		
<i>GSTP1+VDR</i>					
	A/A + G/G	34 (15,2)	41 (18,4)	1,00 (referencia)	
	A/A + G/A	57 (25,6)	44 (19,7)	1,56 (0,86 - 2,85)	0,19
	A/G + G/G	40 (17,9)	39 (17,5)	1,24 (0,66 - 2,33)	0,62
	A/G + G/A	56 (25,1)	72 (32,3)	0,94 (0,53 - 1,66)	0,94
	G/G + G/G	5 (2,2)	11 (4,9)	0,55 (0,17 - 1,73)	0,45
	G/G + G/A	31 (13,9)	16 (7,2)	2,34 (1,10 - 4,97)	0,04*
<i>GSTP1+AR</i>					
	A/A + G	75 (33,6)	62 (27,8)	1,00 (referencia)	
	A/A + A	16 (7,2)	23 (10,3)	0,56 (0,28 - 1,18)	0,18
	A/G + G	70 (31,4)	95 (42,6)	0,61 (0,39 - 0,96)	0,04*
	A/G + A	26 (11,7)	16 (7,2)	1,34 (0,66 - 2,73)	0,52
	G/G + G	28 (12,6)	22 (9,9)	1,05 (0,55 - 2,02)	0,99
	G/G + A	8 (3,6)	5 (2,2)	1,32 (0,41 - 4,25)	0,86

*Resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Tabela 4: Relação entre as frequências genotípicas e dados histopatológicos dos pacientes com câncer de próstata.

Característica	n (%)	GSTP1			MGMT			VDR		AR		
		AA	AG	GG	AA	AG	GG	GG	AG	G	A	
Níveis de PSA (ng/ml)	> 10	130 (60,7)	53	58	19	111	17	2	44	86	103	27
	10 -- 20	65 (30,4)	24	28	11	56	5	2	26	37	48	15
	>20	19 (8,9)	12	4	5	17	3	1	5	16	15	6
<i>p</i>			0,25			0,68			0,31		0,69	
Escore de Gleason	3 - 7 (3+4)	187 (86,6)	77	79	31	162	21	4	62	125	146	41
	7 (4+3) - 9	29 (13,4)	13	11	5	25	3	1	14	15	21	8
<i>p</i>			0,71		0,98	0,86		0,79	0,13		0,38	
Estenção Extracapsular	P	85 (39,7)	39	29	17	76	8	1	33	52	65	20
	A	129 (60,3)	50	61	18	111	14	4	42	87	100	29
<i>p</i>			0,14		0,53	0,56		0,43	0,28		0,81	
Invasão de vesícula seminal	P	25 (11,7)	15	4	6	21	4	0	11	14	19	6
	A	189 (88,3)	74	86	29	166	18	5	64	125	146	43
<i>p</i>			0,01*		0,83	0,37			0,23		0,80	
Invasão perineural	P	44 (20,6)	19	17	8	37	6	1	19	25	32	12
	A	170 (79,4)	70	73	27	150	16	4	56	114	133	37
<i>p</i>			0,84		0,91	0,17		0,71	0,44		0,61	
Bilateralidade	P	111 (51,6)	50	42	19	98	11	2	38	73	85	26
	A	104 (48,4)	39	49	16	89	12	3	38	66	81	23
<i>p</i>			0,16		0,91	0,66		0,60	0,80		0,83	
Invasão de linfonodo	P	4 (1,9)	2	0	2	4	0	0	2	2	4	0
	A	202 (98,1)	84	88	30	176	22	4	73	129	154	48
<i>p</i>												
Grau de estadiamento	pT1, pT2 e 2a	46 (21,8)	18	21	7	38	7	1	13	33	37	9
	pT2b e c	80 (37,9)	28	41	11	71	6	3	29	51	60	20
	pT3 a pT4	85 (40,3)	40	28	17	76	8	1	31	54	66	19
<i>p</i>			0,21			0,54			0,59		0,78	

PSA = Antígeno próstático específico; P = Presente; A = Ausente.

*Resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná. Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PQ), ao Hospital do Câncer de Londrina, ao Consórcio Intermunicipal de Saúde do Médio Paranapanema (CISMEPAR), à Irmandade Santa Casa de Londrina (ISCAL) e à União de Ensino do Sudoeste do Paraná.

Referências Bibliográficas

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; **61**(2): 69-90.
2. INCA. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. INCA, 2011.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; **55**(2): 74-108.
4. Bracarda S, de Cobelli O, Greco C, Prayer-Galetti T, Valdagni R, Gatta G *et al.* Cancer of the prostate. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; **56**(3): 379-396.
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; **62**(1): 10-29.
6. Strobe SA, Andriole GL. Prostate cancer screening: current status and future perspectives. *Nat Rev Urol* 2010; **7**(9): 487-493.
7. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR *et al.* Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst* 2012; **104**(2): 125-132.
8. Miller AB. New data on prostate-cancer mortality after PSA screening. *N Engl J Med* 2012; **366**(11): 1047-1048.
9. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V *et al.* Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med* 2012; **366**(11): 981-990.
10. Coughlin SS, Hall IJ. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Ann Epidemiol* 2002; **12**(3): 182-196.

11. Rebbeck TR. Inherited genotype and prostate cancer outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; **11**(10 Pt 1): 945-952.
12. Zhong Y, Huang Y, Zhang T, Ma C, Zhang S, Fan W *et al.* Effects of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) polymorphisms on cancer: a meta-analysis. *Mutagenesis* 2010; **25**(1): 83-95.
13. Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Steiner H, Hobisch A. Androgen receptors in prostate cancer. *J Urol* 2003; **170**(4 Pt 1): 1363-1369.
14. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; **1**(1): 34-45.
15. Gelmann EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol* 2002; **20**(13): 3001-3015.
16. Medeiros R, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Morais A, Oliveira J *et al.* Steroid hormone genotypes ARStul and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; **141**(2): 91-96.
17. Pickett CB, Lu AY. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 743-764.
18. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS *et al.* Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**(24): 11733-11737.
19. Kanwal R, Pandey M, Bhaskaran N, Maclennan GT, Fu P, Ponsky LE *et al.* Protection against oxidative DNA damage and stress in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Mol Carcinog* 2012.
20. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 1997; **272**(15): 10004-10012.
21. Zimniak P, Nanduri B, Piķuła S, Bandorowicz-Piķuła J, Singhal SS, Srivastava SK *et al.* Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994; **224**(3): 893-899.

22. Mao GE, Morris G, Lu QY, Cao W, Reuter VE, Cordon-Cardo C *et al.* Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism, cigarette smoking and prostate cancer. *Cancer Detect Prev* 2004; **28**(5): 368-374.
23. Catsburg C, Joshi AD, Corral R, Lewinger JP, Koo J, John EM *et al.* Polymorphisms in carcinogen metabolism enzymes, fish intake, and risk of prostate cancer. *Carcinogenesis* 2012; **33**(7): 1352-1359.
24. Daniels DS, Mol CD, Arvai AS, Kanugula S, Pegg AE, Tainer JA. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J* 2000; **19**(7): 1719-1730.
25. Bugni JM, Han J, Tsai MS, Hunter DJ, Samson LD. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. *DNA Repair (Amst)* 2007; **6**(8): 1116-1126.
26. Pegg AE, Fang Q, Loktionova NA. Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA Repair (Amst)* 2007; **6**(8): 1071-1078.
27. Ritchey JD, Huang WY, Chokkalingam AP, Gao YT, Deng J, Levine P *et al.* Genetic variants of DNA repair genes and prostate cancer: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**(7): 1703-1709.
28. Loh YH, Mitrou PN, Bowman R, Wood A, Jeffery H, Luben RN *et al.* MGMT Ile143Val polymorphism, dietary factors and the risk of breast, colorectal and prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk study. *DNA Repair (Amst)* 2010; **9**(4): 421-428.
29. Ahn J, Albanes D, Berndt SI, Peters U, Chatterjee N, Freedman ND *et al.* Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 2009; **30**(5): 769-776.
30. Donkena KV, Young CY. Vitamin d, sunlight and prostate cancer risk. *Adv Prev Med* 2011; **2011**: 281863.
31. Swami S, Krishnan AV, Feldman D. Vitamin D metabolism and action in the prostate: implications for health and disease. *Mol Cell Endocrinol* 2011; **347**(1-2): 61-69.
32. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW *et al.* Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**(2): 166-170.

33. Habuchi T, Suzuki T, Sasaki R, Wang L, Sato K, Satoh S *et al.* Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population. *Cancer Res* 2000; **60**(2): 305-308.
34. IBGE. **Características Étnico-raciais da População: um estudo das categorias de classificação de cor ou raça 2008**. IBGE: Rio de Janeiro, 2011.
35. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet* 2003; **361**(9360): 859-864.
36. Bechis SK, Carroll PR, Cooperberg MR. Impact of age at diagnosis on prostate cancer treatment and survival. *J Clin Oncol* 2011; **29**(2): 235-241.
37. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V *et al.* [EAU guidelines on prostate cancer. Part I: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease]. *Actas Urol Esp* 2011; **35**(9): 501-514.
38. Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 2002; **168**(3): 906-913.
39. Beer TM, Evans AJ, Hough KM, Lowe BA, McWilliams JE, Henner WD. Polymorphisms of GSTP1 and related genes and prostate cancer risk. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002; **5**(1): 22-27.
40. Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, Oliveira J, Bento MJ, Silva C *et al.* I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; **11**(5): 445-450.
41. Shepard TF, Platz EA, Kantoff PW, Nelson WG, Isaacs WB, Freije D *et al.* No association between the I105V polymorphism of the glutathione S-transferase P1 gene (GSTP1) and prostate cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; **9**(11): 1267-1268.
42. Hayes VM, Severi G, Eggleton SA, Padilla EJ, Southey MC, Sutherland RL *et al.* The E211 G>A androgen receptor polymorphism is associated with a decreased risk of metastatic prostate cancer and androgenetic alopecia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**(4): 993-996.
43. Lindström S, Ma J, Altshuler D, Giovannucci E, Riboli E, Albanes D *et al.* A large study of androgen receptor germline variants and their relation to sex hormone levels and prostate cancer risk. Results from the National Cancer

- Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; **95**(9): E121-127.
44. Hayes VM, Severi G, Padilla EJ, Eggleton SA, Southey MC, Sutherland RL *et al*. Genetic variants in the vitamin D receptor gene and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**(4): 997-999.
 45. Holick CN, Stanford JL, Kwon EM, Ostrander EA, Nejentsev S, Peters U. Comprehensive association analysis of the vitamin D pathway genes, VDR, CYP27B1, and CYP24A1, in prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16**(10): 1990-1999.
 46. Li H, Stampfer MJ, Hollis JB, Mucci LA, Gaziano JM, Hunter D *et al*. A prospective study of plasma vitamin D metabolites, vitamin D receptor polymorphisms, and prostate cancer. *PLoS Med* 2007; **4**(3): e103.
 47. Oakley-Girvan I, Feldman D, Eccleshall TR, Gallagher RP, Wu AH, Kolonel LN *et al*. Risk of early-onset prostate cancer in relation to germ line polymorphisms of the vitamin D receptor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; **13**(8): 1325-1330.
 48. Yen CY, Liu SY, Chen CH, Tseng HF, Chuang LY, Yang CH *et al*. Combinational polymorphisms of four DNA repair genes XRCC1, XRCC2, XRCC3, and XRCC4 and their association with oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2008; **37**(5): 271-277.
 49. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; **19**(2): 275-280.
 50. Figer A, Friedman T, Manguoglu AE, Flex D, Vazina A, Novikov I *et al*. Analysis of polymorphic patterns in candidate genes in Israeli patients with prostate cancer. *Isr Med Assoc J* 2003; **5**(10): 741-745.
 51. Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 2002; **16**(10): 2181-2187.
 52. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; **45**: 51-88.
 53. Green SM, Mostaghel EA, Nelson PS. Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **360**(1-2): 3-13.

54. Johansson AS, Mannervik B. Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J Biol Chem* 2001; **276**(35): 33061-33065.
55. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 1997; **18**(4): 641-644.
56. Kote-Jarai Z, Easton D, Edwards SM, Jefferies S, Durocher F, Jackson RA *et al.* Relationship between glutathione S-transferase M1, P1 and T1 polymorphisms and early onset prostate cancer. *Pharmacogenetics* 2001; **11**(4): 325-330.
57. Sivonová M, Waczulíková I, Dobrota D, Matáková T, Hatok J, Racay P *et al.* Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1, T1, P1 and the risk of prostate cancer: a case-control study. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; **28**: 32.
58. Luo JH, Yu YP. Genetic factors underlying prostate cancer. *Expert Rev Mol Med* 2003; **5**(12): 1-26.

5. MANUSCRITO II

Hipermetilação e polimorfismo do gene *GSTP1* associados à agressividade em câncer de próstata

Marilesia Ferreira de Souza¹, André van Helvoort Lengert¹, Marina Okuyama Kishima², Marcelo Tempesta de Oliveira¹, Hellen Kuasne¹, Amauri Alcindo Alfieri³, Paulo Emilio Fuganti⁴, Ilce Mara de Syllos Cólus^{1*}

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

²Departamento de Patologia Aplicada, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

⁴Hospital do Câncer de Londrina, Londrina, PR, Brasil

*Correspondência para:

Profa. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus

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

Londrina, Paraná - Brasil

CEP: 86.057-970

Telefone: 55.43.3371-4608

e-mail: colus@sercomtel.com.br

Artigo a ser submetido à revista *The Prostate*

ISSN: 1097-0045

Fator de impacto: 3.485

Resumo

BACKGROUND: A hipermetilação de promotores gênicos vem sendo cada vez mais relacionada ao desenvolvimento do câncer. Este estudo teve como objetivo avaliar os níveis de metilação e polimorfismos funcionais nos genes *GSTP1* e *MGMT* em tecidos tumorais e adjacentes normais de próstata, relacionando-os com fatores clínicos e histopatológicos.

MÉTODOS: A pesquisa consistiu de 76 pacientes com carcinoma prostático, dos quais foram obtidas amostras de DNA de tecido tumoral e adjacente normal de próstata, que foram modificadas por bissulfato de sódio e utilizadas para mensuração dos níveis de metilação dos genes *GSTP1* e *MGMT* pela técnica de *MS-HRM*. Também foi obtida de cada paciente uma amostra de sangue periférico, das quais os DNAs foram extraídos e utilizados para a genotipagem dos mesmos genes por PCR em tempo real, utilizando sondas *Taqman*[®].

RESULTADOS: O gene *MGMT* apresentou níveis baixos de metilação tanto para tecido tumoral quanto para tecido adjacente normal de próstata. Já o gene *GSTP1* mostrou níveis altos de metilação no tecido tumoral em relação ao tecido adjacente normal ($p < 0,0001$). Amostras que possuíam metilação superior a 50% neste gene apresentaram relação com agressividade da doença ($p = 0,004$). Encontramos associação significativa entre altos níveis de metilação no promotor do gene *GSTP1* e o polimorfismo rs1695 deste gene.

CONCLUSÕES: O presente estudo demonstrou que a hipermetilação do gene *GSTP1* é um bom marcador preditivo do câncer de próstata e de sua agressividade, e que pode estar relacionada com polimorfismo neste gene.

Palavras-chave: Hipermetilação, câncer de próstata, *MS-HRM*, polimorfismo, *GSTP1*, *MGMT*.

Introdução

O câncer de próstata é a neoplasia mais prevalente em homens no Brasil e a segunda no mundo [1,2]. A introdução do exame do Antígeno prostático Específico (PSA) no final da década de 80 propiciou a detecção precoce destas neoplasias antes não identificadas, desencadeando um conseqüente aumento da incidência

deste tipo de câncer [3]. Entretanto, estudos recentes demonstram que o índice de mortalidade não foi beneficiado [4] ou teve um benefício moderado [5], devido à baixa especificidade e sensibilidade deste exame [6,7].

Um dos problemas do exame do PSA é que ele não faz a diferenciação entre as forma agressiva e não agressiva da doença, além de ser incapaz de diferenciar câncer de próstata de hiperplasia prostática benigna e inflamações da glândula [3,8]. Esses fatores favorecem o aparecimento de muitos resultados falso-positivos, fazendo com que muitos homens sejam encaminhados para a biópsia desnecessariamente. Nos Estados Unidos há uma estimativa de que apenas 22% dos homens indicados para biópsia realmente apresentam câncer de próstata [9]. O diagnóstico deste câncer, quando realizado precocemente, aumenta as chances de cura dos pacientes [10]. Portanto, estudos buscam diferentes formas para detectar esta neoplasia de forma precoce e específica e em seu estágio passível de cura [11].

Eventos epigenéticos, assim como os genéticos, influenciam no desenvolvimento do câncer de próstata e podem vir a serem utilizados como marcadores da doença [12,13]. O gene *GSTP1* codifica uma proteína que possui função de detoxificação intracelular. A hipermetilação da região promotora deste gene, assim como a presença do polimorfismo rs1695 (A313G) levam, respectivamente, ao silenciamento gênico e à troca de um aminoácido na posição Ile105Val na proteína e, como consequência, a uma redução na atividade desta enzima [14-16]. A relação entre câncer de próstata e hipermetilação da região promotora foi relatada pela primeira vez por Lee et al. [16] e, desde então, vários estudos mostram a hipermetilação de seu promotor como um potencial marcador para o câncer de próstata [9,13,17].

O gene *MGMT* codifica uma das principais proteínas de reparo de DNA, a O6-metil-guanina-DNA metiltransferase [18]. O polimorfismo rs2308321 deste gene gera a troca de um aminoácido na posição Ile143Val na proteína, próximo ao centro ativo da enzima, reduzindo a atividade da mesma [19]. Há relatos controversos quanto à consequência da metilação na região promotora do gene *MGMT* [13,20]. Portanto, há necessidade de investigações para se esclarecer a relação entre metilação neste gene e o câncer de próstata.

A hipermetilação de regiões promotoras pode ser mensurada por diversas técnicas, entre elas a *Methylation-sensitive High-Resolution Melting (MS-HRM)*,

descrita por Wojdacz et al. [21]. Esta metodologia apresenta vantagens em relação às técnicas que analisam apenas as regiões dos *primers* e/ou sondas, como a MSP e Q-MSP, pois analisa toda a extensão do *amplicon*, o que possibilita a análise de amostras parcialmente metiladas e também detecta metilação heterogênea [22].

Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar os níveis de metilação dos promotores dos genes *GSTP1* e *MGMT* em tecidos de próstata pela técnica de *MS-HRM* e realizar a genotipagem de SNPs funcionais para estes mesmos genes, buscando avaliar a relação entre fatores genéticos e epigenéticos com o câncer de próstata.

Material e métodos

Amostras e Controles

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE 0031.0.268.000-10). Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário referente ao estilo de vida (Anexo 1).

As amostras de tecido de próstata fixado em parafina foram provenientes do Hospital do Câncer de Londrina (Londrina – Pr, Brasil). Foram analisados 76 pacientes com carcinoma de próstata, cujas amostras foram obtidas de blocos contendo tecidos tumorais e seus respectivos tecidos adjacentes normais.

Foram coletados de cada paciente 4 ml de sangue periférico por punção intravenosa com agulhas e tubos *BDvacuntainer*[®] descartáveis, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 6%). A camada de leucócitos foi retirada após centrifugação do sangue total a 850 g por 10 minutos e posteriormente armazenada a -20°C.

Como controles em cada placa foi adicionada uma curva padrão com DNA genômico humano metilado e não metilado (*Millipore*) modificados, diluídos nas devidas proporções para obtenção das diferentes porcentagens de metilação para os genes *GSTP1* (100%, 75%, 50%, 25% e 0%) e *MGMT* (100%, 50%, 25%, 10% e 0%).

Extração de DNA genômico

As regiões correspondentes ao tecido tumoral de próstata e ao tecido adjacente normal foram determinadas por um patologista a partir da análise citológica de lâminas permanentes coradas com HE (hematoxilina-eosina). Os blocos referentes a estas lâminas foram selecionados e obtidos cerca de 10 cortes de 5 µm de espessura de cada bloco em micrótomo (*American Optical*). Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro para microscopia e desparafinizados em xilol absoluto por 5 minutos, seguido de lavagem com etanol absoluto por 5 minutos a temperatura ambiente. As lâminas contendo os cortes foram secas em temperatura ambiente e, em seguida, foram submetidas à macrodissecção de acordo com indicação do patologista para a retirada das regiões de interesse do tecido. Em seguida foi realizada a extração do DNA genômico utilizando-se o kit High Pure PCR Template Preparation Kit (*Roche*[®]), seguindo recomendações do fabricante.

A extração do DNA genômico das amostras de sangue foi realizada por lise de leucócitos com solução de proteinase K (*Invitrogen*) (10 mg/ml), seguida por isolamento dos ácidos nucleicos por Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1) (*Invitrogen*), seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras de DNA foram quantificadas em fluorímetro Qubit (*Invitrogen*), utilizando-se o kit Quanti-T dsDNA (*Invitrogen*), seguindo as recomendações do fabricante.

Genotipagem dos genes GSTP1 e MGMT

Para cada um dos genes investigados foi selecionado um SNP funcional: *GSTP1* (rs1695; C_3237198_20) e *MGMT* (rs2308321; C_15759332_10). A genotipagem foi realizada a partir do DNA genômico extraído de sangue periférico pela técnica de PCR em tempo real, utilizando-se TaqMan® SNP Genotyping Assays (*Applied Biosystems*) e Genotyping Master mix (*Applied Biosystems*), seguindo as recomendações do fabricante.

Conversão por bissulfito de sódio e quantificação relativa de metilação por MS-HRM

As amostras de DNA obtidas a partir dos tecidos tumorais e normais de próstata foram submetidas à conversão por bissulfito de sódio utilizando-se o kit Epitect Bisulfite Kit (*Qiagen*), seguindo instruções do fabricante. O DNA modificado eluído (20 ng/µL) foi utilizado para as análises de metilação, que foram realizadas

pela técnica de *Methylation-sensitive High Resolution Melting (MS-HRM)*. Os primers utilizados foram previamente descritos por Wojdacz et al. [21] e Wojdacz et al. [22] para os genes *GSTP1* e *MGMT*, respectivamente. A reação teve volume final de 20 µl contendo MeltDoctor™ HRM Master Mix (*Applied Biosystems*) (1x), 5 µM de cada primer e 20 ng de DNA genômico. A amplificação consistiu em um passo inicial de 95°C por 10 minutos, seguido por 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Após a ciclagem iniciou-se o passo do HRM consistindo em 95°C por 10 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto com curva de dissociação contínua até 95°C, com uma leitura de fluorescência a cada variação de 0,01°C. Em cada placa uma curva padrão foi adicionada. Todas as reações foram realizadas em triplicata no equipamento ABI 7500 Fast (*Applied Biosystems*).

Análise estatística

Para a análise dos dados de metilação foram utilizados os programas 7500 Software v2.0.4 (*Applied Biosystems*) e High Resolution Melting v2.0.1 (*Applied Biosystems*). O programa estatístico BioEstat 5.0 (Ayres, 2007) foi utilizado para realizar os testes de Qui-quadrado e teste exato de Fisher para comparar os níveis de metilação entre os tecidos adjacente normal e tumoral, para avaliar associação entre níveis de metilação e dados clínicos e histopatológicos, e para verificar a possível relação entre níveis de metilação e genótipos. Para todas as análises foi considerado estatisticamente significativo valor de $p < 0,05$.

Resultados

Sensibilidade da MS-HRM

A Figura 1 mostra as curvas padrão normalizadas para cada gene estudado, comprovando que a técnica de *Methylation-sensitive High Resolution Melting* foi eficiente para as análises de metilação, pois permitiu a detecção de baixos níveis de metilação. Observou-se também que as triplicatas foram consistentes. Em adição, algumas amostras foram incluídas em diferentes reações em dias diferentes e foram obtidos resultados semelhantes, confirmando os relatos de que, além de sensível, esta técnica é reprodutível [21,23].

Análise de Metilação por MS-HRM

A Tabela 1 apresenta as principais características dos 76 pacientes com câncer de próstata estudados. Estes eram predominantemente caucasianos, com idade média de 66,3 anos. Cerca de 84% dos pacientes apresentaram escores de *Gleason* baixo a moderado (2-7(3+4)) e 47,4% apresentaram tumores classificados como pT3 e pT4 de estadiamento.

Os níveis de metilação para os genes estudados estão dispostos na Tabela 2 e Figura 2. Para o gene *GSTP1* foi detectada metilação parcial ou total em 97,3% das amostras de tecido tumoral, sendo que 65,3% destas apresentaram nível de metilação superior a 25%. Já aproximadamente 55% das amostras de tecido adjacente normal apresentaram-se totalmente desmetiladas, e mais de 98% apresentaram metilação inferior a 25%. O nível de metilação do gene *GSTP1* diferiu significativamente ($p < 0,0001$) quando comparadas amostras de tecido tumoral e adjacente normal de próstata.

O gene *MGMT* apresentou-se majoritariamente desmetilado nas amostras de tecido adjacente normal (96%) e tumoral (90,5%), sendo observados níveis de metilação entre 0% e 10% somente em 4% das amostras de tecido adjacente normal e 9,5% do tecido tumoral (Tabela 2), não havendo assim, diferença significativa entre níveis de metilação entre os diferentes tipos de tecidos avaliados.

Para avaliar como diferentes níveis de metilação podem influenciar características de agressividade e progressão tumoral, os dados histopatológicos foram confrontados com os diferentes níveis de metilação da amostra. Esta foi estratificada em duas classes: (i) indivíduos com nível de metilação de 0 a 25% e indivíduos com nível de metilação de 25% a 100%, comparados entre si e (ii) Indivíduos com nível de metilação de 0 a 25% e indivíduos com metilação de 50 a 100%, comparados entre si.

A comparação dos parâmetros clínicos e histopatológicos com os níveis de metilação dispostos na primeira classe, não apresentou diferenças estatisticamente significativas. Contudo, quando os mesmos parâmetros foram comparados com os níveis de metilação da segunda classe, foram detectadas diferenças estatisticamente significativas. Amostras com metilação acima de 50% apresentaram escores de *Gleason* mais altos em relação às amostras com metilação inferior a 25% ($p = 0,004$). O mesmo ocorreu para invasão de linfonodos ($p = 0,03$) (Tabela 3). Para o

gene *MGMT* não foi possível realizar esta análise devido aos baixos níveis de metilação detectadas no promotor deste gene.

Genotipagem versus porcentagem de metilação

A análise dos genótipos do gene *GSTP1* foi realizada em relação aos diferentes níveis de metilação do tecido tumoral, utilizando-se as mesmas classes de estratificação de amostras citadas anteriormente. A distribuição dos genótipos em relação aos níveis de metilação dispostos na primeira classe (0-25% versus 25-100%) não diferiram estatisticamente entre si. O mesmo tipo de análise associando-se os genótipos em relação aos níveis de metilação dispostos na segunda classe (0-25% versus 50-100%) mostrou que os indivíduos com metilação superior a 50% apresentaram uma maior proporção dos genótipos AG e GG do que os indivíduos com metilação inferior a 25% ($p=0,02$) (Tabela 4). Para o gene *MGMT* não foi possível avaliar a relação entre os genótipos e metilação devido aos baixos níveis de metilação do gene.

Discussão

Alterações epigenéticas possuem um papel fundamental no desenvolvimento do câncer de próstata, sendo essas alterações importantes ferramentas para o entendimento da progressão desta doença e potenciais marcadores de diagnóstico e prognóstico [13].

O presente estudo avaliou os promotores dos genes *MGMT* e *GSTP1* em amostras de tecidos tumoral e adjacente normal de próstata fixada em parafina. Segundo Mikeska et al. [24], esse tipo de amostra possui um grande valor para pesquisas científicas, pois permite a identificação e enriquecimento de áreas de tecido tumoral por micro ou macrodissecção. Esta última foi realizada no presente estudo para reduzir os contaminantes, tanto em tecido tumoral quanto em tecido adjacente normal.

As amostras de DNA extraídas de materiais fixados em parafina podem ter sua utilização dificultada devido ao seu alto nível de degradação. Entretanto, Kristensen et al. [25] afirmaram que a técnica de *MS-HRM* possui alta especificidade e sensibilidade para detecção de metilação de DNA extraído de amostras de tecido fixado em parafina com mais de 30 anos. As amostras do presente estudo estavam

fixadas em parafina por 4 a 6 anos e os níveis de metilação obtidos para os genes *GSTP1* e *MGMT* em cada amostra por meio da técnica de *MS-HRM*, comprovaram a sensibilidade da técnica (Figura 2).

O gene *GSTP1* é um *caretaker* que realiza detoxificação intracelular por conjugação com a glutatona [16,26]. A hipermetilação do promotor deste gene leva à diminuição da expressão do mesmo, propiciando acúmulo de metabólitos intermediários e aumentando a probabilidade de ocorrer danos no DNA e, conseqüentemente, aumento na incidência de câncer [27]. No presente estudo observamos que 97,3% das amostras apresentaram-se parcialmente ou totalmente metiladas (Tabela 2), o que está de acordo com dados da literatura revistos por Jerónimo et al. [13], que encontraram variações de 79 a 95% nos níveis de metilação do promotor deste gene.

Dentro do nosso conhecimento não há estudos que utilizaram a técnica de *MS-HRM* para determinar e comparar a metilação no promotor do gene *GSTP1* em tecidos tumoral e adjacente normal de próstata. Foi possível observar que 65,3% das amostras tumorais apresentaram metilação superior a 25%. Em contrapartida, 98,6% das amostras adjacentes normais apresentaram metilação abaixo de 25%, sendo que destas, mais de 50% apresentaram-se totalmente desmetiladas (Tabela 2). Esses resultados foram altamente significativos ($p < 0,0001$) e demonstraram a sensibilidade da técnica em detectar baixos níveis de metilação, assim como a especificidade da hipermetilação do promotor do gene *GSTP1* como potencial marcador para câncer de próstata.

No presente estudo apenas 2,7% das amostras tumorais encontravam-se desmetiladas; outras pesquisas usando diferentes técnicas, como MSP e Q-MSP, obtiveram índices que variaram de 5-20% [13]. Tais diferenças observadas provavelmente se devem às técnicas utilizadas para as análises. A *MS-HRM*, empregada no presente estudo, é mais sensível e consegue detectar níveis intermediários de metilação, diferentemente das mensurações realizadas com MSP e Q-MSP, onde amostras pouco metiladas podem ser incorretamente classificadas como totalmente desmetiladas.

A análise de dados histopatológicos em relação aos níveis de metilação do gene *GSTP1* demonstrou associação significativa entre as amostras que apresentavam metilação superior a 50% com escore de *Gleason* ($p = 0,004$) e com invasão de linfonodos ($p = 0,03$). Estudos utilizando a técnica de Q-MSP não

encontraram associação entre metilação do gene *GSTP1* e escore de *Gleason* [18,28]. Em contrapartida, um estudo realizado por Delgado-Cruzata et al. [29] determinou a quantificação de metilação do promotor do gene *GSTP1* em amostras de carcinoma de próstata por pirosequenciamento, e observaram que amostras com cerca de 50% de metilação estavam associadas a escores de *Gleason* maiores que 7. Hashad et al. [27] também encontraram relação entre escores de *Gleason* e metilação do gene *GSTP1*. Nossos resultados estão de acordo com estes estudos e corroboram a hipótese de que a hipermetilação de *GSTP1* pode ser usada como marcador de agressividade da doença, se utilizada uma metodologia adequada para a quantificação. Sendo assim, sugerimos que tumores com mais de 50% de metilação tendem a ser mais agressivos que tumores com níveis de metilação mais baixos. Outro fator que fortalece esta hipótese é que, de acordo com Balic et al. [23], níveis baixos de metilação parecem não exercer funções biológicas importantes

O presente estudo também avaliou o promotor do gene *MGMT*, o qual apresentou baixos níveis de metilação, tanto em amostras de tecido tumoral quanto de tecido adjacente normal (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com estudos que apontam metilação entre 0 e 2% das amostras para este gene [30-33]. Portanto, esta é mais uma evidência de que a hipermetilação do gene *MGMT* parece não estar relacionada com câncer de próstata. Contudo, outros estudos utilizando a técnica de MSP encontraram de 30 a 75% das amostras de tecido tumoral de próstata metiladas [34,35].

Sabendo-se que polimorfismos nos genes *GSTP1* e *MGMT* podem levar à diminuição da atividade das enzimas por eles codificadas, também foi avaliada a relação entre polimorfismos funcionais (*GSTP1* rs1695 e *MGMT* rs2308321) e níveis de metilação nos dois genes (Tabela 4). Para o gene *MGMT* não foi possível comparar estatisticamente os diferentes níveis de metilação em relação aos genótipos, devido aos baixos níveis de metilação detectados neste gene.

Para o gene *GSTP1*, foi analisado o polimorfismo rs1695 em relação às diferentes classes de metilação (Tabela 4). A metilação do promotor deste gene causa seu silenciamento e, conseqüentemente, a diminuição da expressão do mesmo. A partir deste fato, Jerónimo et al. [36] postularam que a metilação poderia neutralizar a diferença de atividade enzimática ocasionada pelo polimorfismo rs1695, ou então, o próprio polimorfismo poderia influenciar a metilação do promotor do gene. No entanto, os dados de Jerónimo et al. [36] não lhes permitiram confirmar

essas hipóteses. Os dados do presente estudo para as classes de 0-25% e 25-100% de metilação também não confirmaram tais hipóteses.

Quando comparamos a frequência dos genótipos entre as classes de metilação de 0-25% e 50-100% encontramos diferenças estatisticamente significativas. Todas as amostras com níveis de metilação superiores a 50% apresentaram os genótipos de risco ao câncer de próstata (AG/GG). Como já mencionado, metilação superior a 50% no promotor deste gene possui relação com tumores mais agressivos. O alelo G deste polimorfismo está descrito na literatura como sendo ligado a um maior risco de câncer de próstata [37]. O efeito de risco deste alelo, antes conferido apenas ao distúrbio que ele provoca na proteína, pode estar relacionado a uma possível influência do mesmo nos eventos epigenéticos. Este resultado, ao contrário do obtido anteriormente, fornece diferentes possibilidades para que as hipóteses postuladas por Jerónimo et al. [36] sejam discutidas. Desta maneira estudos futuros poderão elucidar estas hipóteses confirmando a influência deste polimorfismo nos eventos de metilação.

Conclusões

A busca de marcadores moleculares mais específicos e sensíveis para o câncer de próstata é vital para elucidar as problemáticas clínicas ocasionadas pela doença. O presente estudo mostrou por meio da técnica de *MS-HRM* baixos níveis de metilação no promotor do gene *MGMT* em tecido tumoral e adjacente normal de próstata. Este resultado é mais uma evidência de que a metilação no promotor do gene *MGMT* não é um bom marcador para o câncer de próstata. Em relação ao gene *GSTP1*, diferenças significativas foram obtidas entre níveis de metilação de tecido tumoral de próstata e em relação a seus tecidos adjacentes normais, sendo esta mais uma evidência da sensibilidade e especificidade desse marcador para câncer de próstata.

O presente estudo corrobora a hipótese proposta em outras investigações, de se utilizar a hipermetilação do gene *GSTP1* como auxiliar no prognóstico e diagnóstico do câncer de próstata [9,13]. Adicionalmente, também foi demonstrado que níveis de metilação aumentados estão relacionados à agressividade do tumor e, também, foi obtida associação entre os genótipos de risco do polimorfismo rs1695 do gene *GSTP1* e níveis de metilação superiores a 50% no mesmo gene. Esta

relação permanece não esclarecida e estudos futuros são necessários para definir se este genótipo pode realmente exercer influência nos níveis de metilação do promotor deste gene.

Tabela 1: Características epidemiológicas e clínicas da amostra.

Características	Pacientes	
	n (%)	
Idade (anos) (X±DP)	66,3 ± 8,0	
Etnia*	Caucasianos	67(88,2)
	Negros e pardos	9 (11,8)
Níveis de PSA (ng/ml)	≤ 10	46 (60,5)
	10,1-20	23 (30,3)
	>20	7(9,2)
Escore de <i>Gleason</i>	3 - 7(3+4)	64 (84,2)
	7(4+3) - 9	12 (15,8)
Estadiamento	pT1,pT2 e 2a	12 (15,8)
	pT2b e c	28 (36,8)
	pT3 e pT4	36 (47,4)

X±DP= média e desvio padrão; PSA= Antígeno Prostático Específico.

*Os grupos étnicos foram categorizados de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2011.

Tabela 2: Distribuição dos níveis de metilação para os genes *GSTP1* e *MGMT*.

Gene	Nível de Metilação (%)	Tecido		p
		Normal n (%)	Tumoral n (%)	
<i>GSTP1</i>	0	39 (54,9)	2 (2,7)	< 0,0001*
	0-25	31 (43,7)	24 (32,0)	
	25-50	1 (1,4)	36 (48,0)	
	50-75	0 (0,0)	11 (14,6)	
	75-100	0 (0,0)	2 (2,7)	
<i>MGMT</i>	0	72 (96,0)	67 (90,5)	0,16#
	0-10	3 (4,0)	7 (9,5)	

*Resultado estatisticamente significativo

Teste exato de Fisher

Tabela 3: Níveis de metilação do gene *GSTP1* comparados com dados clínicos e histopatológicos.

Características		Metilação (%)		p	Metilação (%)		p
		0-25	25-100		0-25	50-100	
Níveis de PSA (ng/ml)	≤ 10	15	31	0,58	15	8	0,58
	10.1-20	9	13		9	5	
	>20	2	5		2	0	
Escore de Gleason	3 - 7(3+4)	21	42	0,74 [#]	21	4	0,004 ^{##}
	7(4+3) - 9	5	7		5	9	
Extensão extracapsular	P	11	23	0,70	11	4	0,48 [#]
	A	15	26		15	9	
Comprometimento de vesícula seminal	P	2	7	0,40 [#]	2	2	0,45
	A	24	42		24	11	
Invasão perineural	P	7	15	0,73	7	5	0,46
	A	19	34		19	8	
Bilateralidade	P	16	31	0,88	16	6	0,36
	A	10	18		10	7	
Invasão de linfonodo	P	1	5	0,33 [#]	1	4	0,03 ^{##}
	A	25	44		25	9	
Estadiamento	pT2 e 2a	5	7	0,43	5	1	0,53
	pT2b e c	10	18		10	7	
	pT3 e pT4	11	24		11	5	

P = Presente; A = Ausente; PSA = Antígeno Prostático Específico.

[#] Teste de exato de Fisher

* Resultados estatisticamente significativos.

Tabela 4: Distribuição dos níveis de metilação em relação aos genótipos do gene *GSTP1*.

<i>GSTP1</i>	Metilação		p [§]	Metilação		p [#]
	0-25%	25-100%		0-25%	50-100%	
AA	10	17	0,82	10	0	0,02 [*]
AG+GG	16	32		16	13	

[§]Teste Q-Quadrado; [#]Teste de exato de Fisher;

* Resultado estatisticamente significativo.

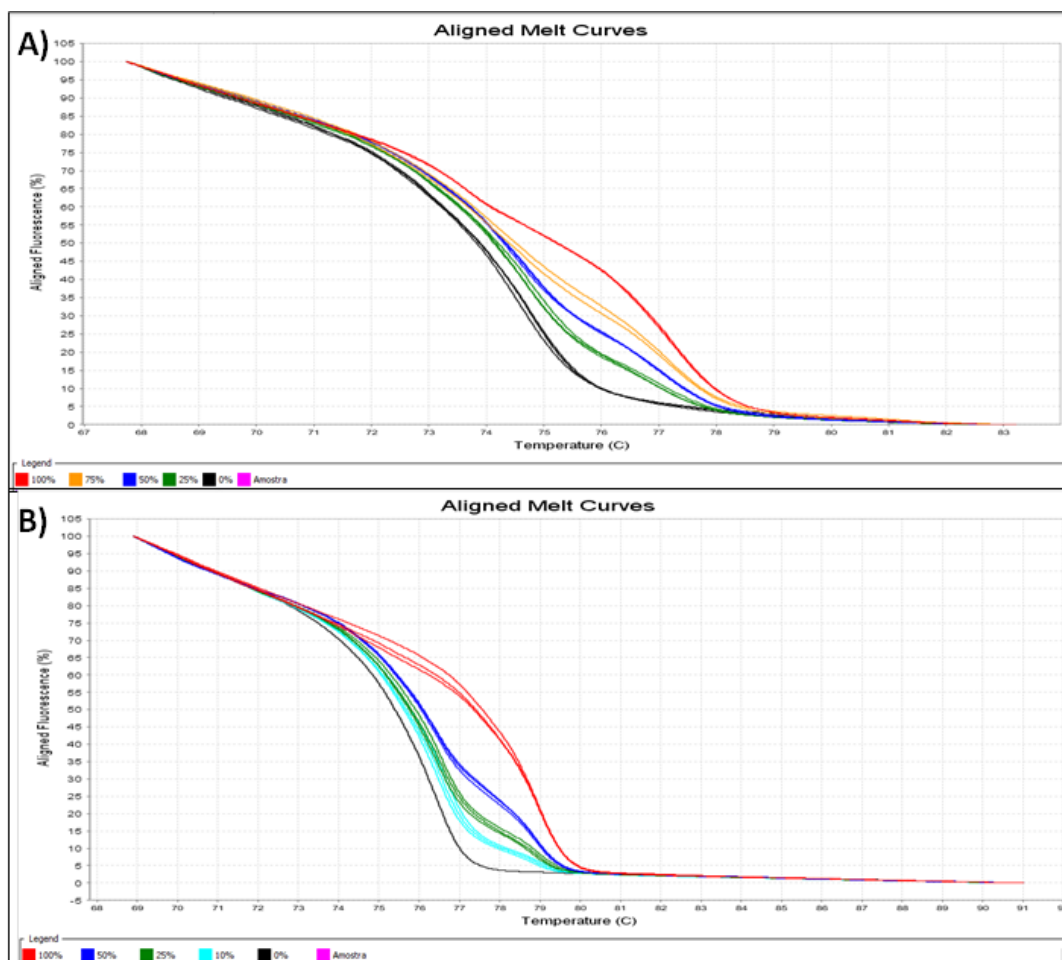


Figura 1: Sensibilidade da técnica de MS-HRM, curvas obtidas com DNA padrão nas seguintes concentrações: 100% (vermelho), 75%(laranja), 50% (azul), 25% (verde), 10% (azul claro) e 0% (preto). **A)** Curva de *melting* normalizada referente ao gene *GSTP1*. **B)** Curva de *melting* normalizada referente ao gene *MGMT*.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná. Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PQ) e ao Hospital do Câncer de Londrina.

Referências bibliográficas

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90.
2. INCA. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. INCA; 2011.
3. Baade PD, Youlten DR, Krnjacki LJ. International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends. *Mol Nutr Food Res* 2009;53(2):171-184.
4. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR, Fouad MN, Isaacs C, Kvale PA, Reding DJ, Weissfeld JL, Yokochi LA, O'Brien B, Ragard LR, Clapp JD, Rathmell JM, Riley TL, Hsing AW, Izmirlian G, Pinsky PF, Kramer BS, Miller AB, Gohagan JK, Prorok PC, Team PP. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst* 2012;104(2):125-132.
5. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Páez A, Mänttinen L, Bangma CH, Aus G, Carlsson S, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Kujala PM, Blijenberg BG, Stenman UH, Huber A, Taari K, Hakama M, Moss SM, de Koning HJ, Auvinen A, Investigators E. Prostate-cancer mortality at 11 years of follow-up. *N Engl J Med* 2012;366(11):981-990.
6. Postma R, Schröder FH. Screening for prostate cancer. *Eur J Cancer* 2005;41(6):825-833.
7. Trock BJ, Brotzman MJ, Mangold LA, Bigley JW, Epstein JI, McLeod D, Klein EA, Jones JS, Wang S, McAskil T, Mehrotra J, Raghavan B, Partin AW. Evaluation of GSTP1 and APC methylation as indicators for repeat biopsy in a high-risk cohort of men with negative initial prostate biopsies. *BJU Int* 2012;110(1):56-62.
8. Stroppe SA, Andriole GL. Prostate cancer screening: current status and future perspectives. *Nat Rev Urol* 2010;7(9):487-493.
9. Van Neste L, Herman JG, Otto G, Bigley JW, Epstein JI, Van Criekinge W. The epigenetic promise for prostate cancer diagnosis. *Prostate* 2012;72(11):1248-1261.
10. Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC. Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am* 2001;28(3):555-565.
11. Harden SV, Sanderson H, Goodman SN, Partin AA, Walsh PC, Epstein JI, Sidransky D. Quantitative GSTP1 methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(21):1634-1637.

12. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21(35):5427-5440.
13. Jerónimo C, Bastian PJ, Bjartell A, Carbone GM, Catto JW, Clark SJ, Henrique R, Nelson WG, Shariat SF. Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. *Eur Urol* 2011;60(4):753-766.
14. Zimniak P, Nanduri B, Piłkuła S, Bandorowicz-Piłkuła J, Singhal SS, Srivastava SK, Awasthi S, Awasthi YC. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994;224(3):893-899.
15. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 1997;272(15):10004-10012.
16. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(24):11733-11737.
17. Phé V, Cussenot O, Rouprêt M. Methylated genes as potential biomarkers in prostate cancer. *BJU Int* 2010;105(10):1364-1370.
18. Daniels DS, Mol CD, Arvai AS, Kanugula S, Pegg AE, Tainer JA. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding. *EMBO J* 2000;19(7):1719-1730.
19. Bugni JM, Han J, Tsai MS, Hunter DJ, Samson LD. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. *DNA Repair (Amst)* 2007;6(8):1116-1126.
20. Schulz WA, Hatina J. Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. *J Cell Mol Med* 2006;10(1):100-125.
21. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc* 2008;3(12):1903-1908.
22. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 2007;35(6):e41.
23. Balic M, Pichler M, Strutz J, Heitzer E, Ausch C, Samonigg H, Cote RJ, Dandachi N. High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis. *J Mol Diagn* 2009;11(2):102-108.
24. Mikeska T, Bock C, Do H, Dobrovic A. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;12(5):473-487.
25. Kristensen LS, Wojdacz TK, Thestrup BB, Wiuf C, Hager H, Hansen LL. Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM. *BMC Cancer* 2009;9:453.
26. Pickett CB, Lu AY. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu Rev Biochem* 1989;58:743-764.
27. Hashad DI, Hashad MM, Talaat IM, Ibrahim MA. Role of glutathione-S-transferase P1 hypermethylation in molecular detection of prostate cancer. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15(10):667-670.

28. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Müller SC, von Ruecker A. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin Cancer Res* 2005;11(11):4097-4106.
29. Delgado-Cruzata L, Hruby GW, Gonzalez K, McKiernan J, Benson MC, Santella RM, Shen J. DNA methylation changes correlate with Gleason score and tumor stage in prostate cancer. *DNA Cell Biol* 2012;31(2):187-192.
30. Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E, Ribeiro FR, Varzim G, Oliveira J, Teixeira MR, Lopes C, Sidransky D. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8472-8478.
31. Yamanaka M, Watanabe M, Yamada Y, Takagi A, Murata T, Takahashi H, Suzuki H, Ito H, Tsukino H, Katoh T, Sugimura Y, Shiraishi T. Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer* 2003;106(3):382-387.
32. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zöchbauer-Müller S, Farinas AJ, Minna JD, McConnell J, Frenkel EP, Gazdar AF. Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 2002;8(2):514-519.
33. Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB, Nelson WG. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64(6):1975-1986.
34. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2004;202(2):233-240.
35. Alumkal JJ, Zhang Z, Humphreys EB, Bennett C, Mangold LA, Carducci MA, Partin AW, Garrett-Mayer E, DeMarzo AM, Herman JG. Effect of DNA methylation on identification of aggressive prostate cancer. *Urology* 2008;72(6):1234-1239.
36. Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, Oliveira J, Bento MJ, Silva C, Lopes C, Sidransky D. I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(5):445-450.
37. Lavender NA, Benford ML, VanCleave TT, Brock GN, Kittles RA, Moore JH, Hein DW, Kidd LC. Examination of polymorphic glutathione S-transferase (GST) genes, tobacco smoking and prostate cancer risk among men of African descent: a case-control study. *BMC Cancer* 2009;9:397.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

- os polimorfismos dos genes *GSTP1* (rs1695), *MGMT* (rs2308321), *VDR* (rs1544410) e *AR* (rs6152), quando analisados de forma isolada, não conferiram um risco significativo para o câncer de próstata;
- a combinação dos genótipos GG do gene *GSTP1* e GA do gene *VDR* levaram ao aumento de risco de 2,3 vezes para o câncer de próstata (OR=2,34; IC95%=1,10-4,97; p=0,04);
- o genótipo AG do gene *GSTP1* em combinação com o alelo G do gene *AR* conferiu um efeito protetor a esta neoplasia (OR=0,61; IC95%=0,39-0,96; p=0,04);
- em relação aos dados histopatológicos, o genótipo AG do gene *GSTP1* conferiu um efeito protetor para invasão de vesícula seminal (OR=0,22; IC95%=0,07-0,69; p=0,01);
- os baixos níveis de metilação encontrados no promotor do gene *MGMT* demonstram que a metilação deste gene não parece estar associada ao câncer de próstata e, sendo assim, este não é um bom marcador para esta neoplasia;
- os níveis de metilação do gene *GSTP1* apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre tecido tumoral e adjacente normal de próstata, e níveis superiores a 50% de metilação estão relacionados à agressividade do tumor;
- a integração entre os dados de metilação e genotipagem demonstraram uma relação entre níveis aumentados de metilação no promotor do gene *GSTP1* e os genótipos AG/GG do polimorfismo rs1695 do mesmo gene;
- Portanto, nossos dados demonstram que determinadas combinações alélicas são importantes fatores de risco e proteção ao câncer de próstata e que a hipermetilação

do gene *GSTP1* é um bom candidato a marcador para diagnóstico e agressividade deste câncer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J.; ALBANES, D.; BERNDT, S. I.; PETERS, U.; CHATTERJEE, N.; FREEDMAN, N. D.; ABNET, C. C.; HUANG, W.; KIBEL, A. S.; CRAWFORD, E. D.; WEINSTEIN, S. J.; CHANOCK, S. J.; SCHATZKIN, A.; HAYES, R. B. Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 5, p.769–776, mar. 2009.

ALI-OSMAN, F.; AKANDE, O.; ANTOUN, G.; MAO, J. X.; BUOLAMWINI, J.; Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 5, p. 10004–10012, abr. 1997.

ALUMKAL, J. J.; ZHANG, Z.; HUMPHREYS E. B.; BENNETT, C.; MANGOLD L. A.; CARDUCCI, M. A.; PARTIN, A. W.; GARRETT-MAYER, E.; DE MARZO, A. M.; HERMAN, J. G. Effect of DNA methylation on identification of aggressive prostate cancer. **Urology**, v. 72, n. 5, p. 1234-1239, dez. 2008.

ANDRIOLE, G. L.; CRAWFORD, E. D.; GRUBB, R. L.; BUYS, S. S.; CHIA, D.; CHURCH, T. R.; MONA, N.; FOUAD, M. N.; ISAACS, C.; KVALE, P. A.; REDING, D. J.; WEISSFELD, J. L.; YOKOCHI, L. A.; O'BRIEN, B.; RAGARD, L. R.; CLAPP, J. D.; RATHMELL, J. M.; RILEY, T. L.; HSING, A. W.; IZMIRLIAN, G.; PINSKY, P. F.; KRAMER, B. S.; MILLER, A. B.; GOHAGAN, J. K.; PROROK, P. C. Prostate Cancer Screening in the Randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: Mortality Results after 13 Years of Follow-up. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, p. 125-132, jan. 2012.

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

BALIC, M.; PICHLER, M.; STRUTZ, J.; HEITZER, E.; AUSCH, C.; SAMONIGG, H.; COTE, R. J.; DANDACHI N. High quality assessment of DNA methylation in archival tissues from colorectal cancer patients using quantitative high-resolution melting analysis. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 11, n. 2, p.102-108, mar. 2009.

BASTIAN, P. J.; ELLINGER, J.; WELLMANN, A.; WERNERT, N.; HEUKAMP, L. C.; MÜLLER, S. C.; VON RUECKER, A. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 11, p. 4097-4106, jun 2005.

BECHIS, S. K.; PETER, R.; CARROLL, P. R.; COOPERBERG, M. R. Impact of Age at Diagnosis on Prostate Cancer Treatment and Survival. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, p. 235-241, jan. 2011.

BEER, T. M.; EVANS, A. J.; HOUGH, K. M.; LOWE, B. A.; MCWILLIAMS, J. E.; HENNER, W. D. Polymorphisms of *GSTP1* and related genes and prostate cancer risk. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 5, p. 22–27, 2002.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World cancer report 2008**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.

BRATT O. Hereditary Prostate Cancer: Clinical Aspects. **Journal of Urology**, v. 168, p. 906-913, set. 2002.

BRACARDA, S.; COBELLI, O.; GRECO, C.; PRAYER-GALETTI, T.; VALDAGNI, R.; GATTA, G.; BRAUD, F.; BARTSCH, G. Cancer of the prostate. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 56, p. 379–396, dez. 2005.

BUGNI, J. M. HANC, J.; TSAID, M.; HUNTERB, D. J.; SAMSONA, L. D. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of *MGMT*. **Dna repair**, v. 6, p. 1116–1126, jun. 2007.

CAIRNS, P.; ESTELLER, M.; HERMAN, J. G.; SCHOENBERG, M.; JERONIMO, C.; SANCHEZ-CESPEDES, M.; CHOW, N. H.; GRASSO, M.; WU, L.; WESTRA, W. B.; SIDRANSKY, D. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. **Clinical Cancer Research**, v. 7, n. 9, p. 2727-2730, set. 2001.

CATSBURG, C.; JOSHI, A. D.; CORRAL, R.; LEWINGER, J. P.; KOO, J.; JOHN, E. M.; INGLES, S. A.; STERN, M. C. Polymorphisms in carcinogen metabolism enzymes, fish intake, and risk of prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 7 pp.1352–1359, maio 2012.

CHEN, T. C.; KITTAKA, A. Novel Vitamin D Analogs for Prostate Cancer Therapy. **ISRN Urology**, 2011.

CHETERI, M. B.; STANFORD, J. L.; FRIEDRICHSEN, D. M.; PETERS, M. A.; IWASAKI, L.; LANGLOIS, M. C.; FENG, Z.; OSTRANDER, E. A. Vitamin D receptor gene polymorphisms and prostate cancer risk. **The Prostate**, v. 4, n. 59, p. 409-418, jun. 2004.

CHIAM, K.; RICCIARDELLI, C.; BIANCO-MIOTTO, T. Epigenetic biomarkers in prostate cancer: current and future uses. **Cancer Letter**, mar. 2012.

COHEN, J. H.; KRISTAL, A. R.; STANFORD, J. L. Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 1, p. 61-68, jan 2000.

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

CRAWFORD, E. D. Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. **Urology**, v. 76, p. 4-10, maio 2009.

CULIG, Z.; KLOCKER, H.; BARTSCH, G.; STEINER, H.; HOBISCH, A. Androgen receptors in prostate cancer. **The Journal of Urology**, v. 170, p. 1363–1369, out. 2003.

DAMBER, J.; AUS, G. Prostate cancer. **Lancet**, v. 371, p. 1710–1721, maio 2008.

DANIELS, D. S. ; MOL, C. D.; ARVAI, A. S.; KANUGULA, S.; PEGG, A. E.; TAINER, J. A. Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical binding. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 1719–1730, abr. 2000.

DE MARZO, A. M.; MARCHI, V. L.; EPSTEIN, J. I.; NELSON, W. G. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 6, p. 1985 – 1997, dez. 1999.

DEHM, S. M.; TINDALL, D. J. Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 2, p. 333–344, out. 2006.

DELGADO-CRUZATA, L.; HRUBY, G. W.; GONZALEZ, K.; MCKIERNAN, J.; BENSON, M. C.; SANTELLA, R. M.; SHEN, J. DNA methylation changes correlate with Gleason score and tumor stage in prostate cancer. **DNA and Cell Biology**, v. 31, n. 2, p. 187-192, fev. 2012

DONKENA, K. V.; YOUNG, C. Y. F. Vitamin D, Sunlight and Prostate Cancer Risk. **Advances in Preventive Medicine**, 2011.

ESTELLER, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene**, v. 21, p. 5427 – 5440, ago. 2002.

ESTELLER, M. HAMILTON, S. R.; BURGER, P. C.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-primary human neoplasia. **Cancer Research**, v. 59, p. 793–797, fev. 1999.

FELDMAN B. J.; FELDMAN, D. The development of androgen-independent prostate cancer. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 10, p. 2181–2187, out. 2002.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. **GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10**. France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponivel em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 05 de ago. 2011.

FIGER, A.; FRIEDMAN, T.; MANGUOGLU, A. E.; FLEX, D.; VAZINA, A.; NOVIKOV, I.; SHTRIEKER, A.; AMI SIDI, A.; TICHLER, T.; SAPIR, E. E.; BANIEL, J.; FRIEDMAN, E. Analysis of Polymorphic Patterns in Candidate Genes in Israeli Patients with Prostate Cancer. **Israel Medical Association Journal**, v. 5, p. 741-745, out. 2003.

FRIEDENREICH, C. M.; ORENSTEIN, M. R. Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms. **The Journal Nutrition**, v. 132, p. 3456S–3464S, nov. 2002.

GELMANN, E. P. Molecular Biology of the Androgen Receptor. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 13, p. 3001-3015, jul. 2002.

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

GOLL, M. G.; BESTOR, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, p. 481–514, mar. 2005.

GREEN, S. M.; MOSTAGHEL, E. A.; NELSON, P. S. Androgen action and metabolism in prostate cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 360, p. 3–13, set. 2012.

GRÖNBERG, H. Prostate cancer epidemiology. **Lancet**, v. 361, p. 859–864, 2003.

HABUCHI, T.; SUZUKI, T.; SASAKI, R.; WANG, L.; SATO, K.; SATOH, S.; AKAO, T.; TSUCHIYA, N.; SHIMODA, N.; WADA, Y.; KOIZUMI, A.; CHIHARA, J.; OGAWA, O.; KATO, T. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in a Japanese population. **Cancer Research**, v. 60, p. 305-308, jan. 2000.

HAN, M.; PARTIN, A. W.; POUND, C. R.; EPSTEIN, J. I.; WALSH, P. C. Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. **Urologic Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 555-565, ago. 2001.

HARDEN, S. V.; SANDERSON, H.; GOODMAN, S. N.; PARTIN, A. A. W.; WALSH, P. C.; EPSTEIN, J. I.; SIDRANSKY, D. Quantitative *GSTP1* methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 21, p. 1634-1637, nov. 2003.

HARRIES, L. W.; STUBBINS, M. J.; FORMAN, D.; HOWARD G. C. W.; WOLF, C. R. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 4, p. 641–644, abr. 1997.

HASHAD, D. I.; HASHAD, M. M.; TALAAT, I. M.; IBRAHIM, M. A. Role of glutathione-S-transferase P1 hypermethylation in molecular detection of prostate cancer. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 15, n. 10, p. 667-670, out. 2011.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, R. Glutathione transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 51-88, ago. 2005.

HAYES, V. M.; SEVERI, G.; EGGLETON, S. A.; PADILLA, E. J. D.; SOUTHEY, M. C.; SUTHERLAND, R. L.; HOPPER, J. L.; GILES, G. G. The E211 G>A androgen receptor polymorphism is associated with a decreased risk of metastatic prostate cancer and androgenetic alopecia. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 51-88, ago. 2005.

HAYES, V. M.; SEVERI, G.; PADILLA, E. J. D.; EGGLETON, S. A.; SOUTHEY, M. C.; SUTHERLAND, R. L.; HOPPER, J. L.; GILES, G. G. Genetic Variants in the Vitamin D Receptor Gene and Prostate Cancer Risk. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 997-999, abr. 2005.

HEIDENREICH, A.; BELLMUNT, J.; BOLLA, M.; JONIAU, S.; MASON, M.; MATVEEV, V.; MOTTET, N.; SCHMID, H.; KWAST, T.; WIEGEL, T.; ZATTONI F.

EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. **European Urology**, v. 59, p. 61-71, jan. 2011.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 2., p. 276–308, abr. 2004.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 10, p. 2181–2187, out. 2002.

HOLICK, C. N.; STANFORD, J. L.; KWON, E. M.; OSTRANDER, E. A.; NEJENTSEV, S.; PETERS, U. Comprehensive Association Analysis of the Vitamin D Pathway Genes, *VDR*, *CYP27B1*, and *CYP24A1*, in Prostate cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, p. 1990-1999, 2007.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Características Étnico-raciais da População: um estudo das categorias de classificação de cor ou raça 2008**. Rio de Janeiro: IBGE, 2011.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

INGLES, S. A.; ROSS, R. K.; YU, M. C.; IRVINE, R. A.; LA PERA, G.; HAILE, R. W.; COETZEE G. A. Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, p. 166-170, jan. 1997.

IRVINE, R. A.; YU, M. C.; ROSS, R. K.; COETZEE, G. A. The CAG and GGC Microsatellites of the Androgen Receptor Gene Are in Linkage Disequilibrium in Men with Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 55, p. 1937-1940, maio 1995.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **CA – A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, p. 69–90, mar./abr. 2011.

JERÓNIMO, C.; HENRIQUE, R.; HOQUE, M. O., MAMBO. E.; RIBEIRO, F. R.; VARZIM, G.; OLIVEIRA, J.; TEIXEIRA, M. R.; LOPES, C.; SIDRANSKY, D. A Quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 8472–8478, dez. 2004.

JERÓNIMO, C.; VARZIM, G.; HENRIQUE, R.; OLIVEIRA, J.; BENTO, M. J.; SILVA, C.; LOPES, C.; SIDRANSKY, D. I105V Polymorphism and Promoter Methylation of the *GSTP1* Gene in Prostate Adenocarcinoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 445–450, maio 2002.

JERÓNIMO, C.; BASTIAN, P. J.; BJARTELL, A.; CARBONE, G. M.; CATTO, J. W.; CLARK, S. J.; HENRIQUE, R.; NELSON, W. G.; SHARIAT, S. F. Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. **European Urology**, v. 60, n. 4, p. 753-766, out. 2011.

JOHANSSON, A.; MANNERVIK, B. Human Glutathione Transferase A3-3, a Highly Efficient Catalyst of Double-bond Isomerization in the Biosynthetic Pathway of Steroid Hormones. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 35, p. 33061-65, 2001.

JONES, B. A.; LIU, W.; ARAUJO, A. B.; KASL, S. V.; SILVERA, S. N.; SOLER-VILA, H.; CURNEN, M. G. M.; DUBROW, R. Explaining the race difference in prostate cancer stage at diagnosis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.17, n. 10, p. 2825-2834, out. 2008.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The Epigenomics of Cancer. **Cell**, v. 128, p. 683–692, fev. 2007.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, p. 415-428, jun. 2002.

JORDÀ, M; PEINADO, M. A. Methods for DNA methylation analysis and applications in colon cancer. **Mutation Research**, v. 693, p. 84–93, jun. 2010.

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

KANG, G H.; LEE, S.; LEE, H. J.; HWANG, K. S. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. **Journal of Pathology**, v. 202, p. 233–240, fev. 2004.

KANWAL, R.; PANDEY, M.; BHASKARAN,N.; MACLENNAN, G. T.; FU, P.; PONSKY, L. E.; GUPTA, S. Protection against oxidative DNA damage and stress in human prostate by Glutathione S-Transferase P1. **Molecular Carcinogenesis**, p. 1-11, jul 2012.

KOLONEL, L. N.; ALTSHULER, D.; HENDERSON, B. E. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 7, p. 519-527, jul. 2004.

KOTE-JARAIA, Z.; EASTONB, D.; EDWARDSA, S. M.; JEFFERIESA, S.; DUROCHERB, F.; JACKSONA, R. A.; SINGHA, R.; ARDERN-JONESA, A.; MURKINA, A.; DEARNALEYA, D. P.; SHEARERA, R.; KIRBYC R. Relationship between glutathione S-transferase M1, P1 and T1 polymorphisms and early onset prostate cancer. **Pharmacogenetics**, v. 11, p. 325-330, jun. 2001.

KRISTENSEN, L. S.; WOJDACZ, T. K.; THESTRUP, B. B.; WIUF, C.; HAGER, H.; HANSEN, L. L. Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM. **BMC Cancer**, v. 21, n. 9, p. 1-11, 2009.

KUASNE, H.; RODRIGUES, I. S.; FUGANTI, P. E.; LOSI-GUEMBAROVSKI, R.; ITO, K.; KISHIMA, M. O.; RODRIGUES, M. A. F.; ROGATTO, S. R.; SANTOS, R. M.; CÓLUS, I. M. S. Polymorphisms in the AR and PSA Genes as Markers of

Susceptibility and Aggressiveness in Prostate Cancer. **Cancer Investigation**, p. 1–8, 2010.

LATTOUF, J. B.; SAAD, F. Gleason score on biopsy: is it reliable for predicting the final grade on pathology? **BJUI International**, v. 90, n. 7, p. 694-698, nov. 2002.

LAVENDER, N. A.; BENFORD, M. L.; VANCLEAVE, T. T.; BROCK, G. N.; KITTLES, R. A.; MOORE, J. H.; HEIN, D. W.; KIDD, L. C. Examination of polymorphic glutathione S-transferase (GST) genes, tobacco smoking and prostate cancer risk among men of African descent: a case-control study. **BMC Cancer**, v. 9, p. 397, nov. 2009.

LEE, W.; MORTON, R. A.; EPSTEIN, J. I.; BROOKS, J. D.; CAMPBELL, P. A.; BOVA, G. S.; HSIEH, W.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Cytidine methylation of regulatory sequences near the a-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 11733-11737, nov. 1994.

LEEUWEN, P. J.; CONNOLLY, D.; GAVIN, A.; ROOBOL, M. J.; BLACK, A.; BANGMA, C. H.; SCHRÖDER, F. H. Prostate cancer mortality in screen and clinically detected prostate cancer: Estimating the screening benefit. **European Journal of Cancer**, v. 46, p. 377-383, jan. 2010.

LEWIN, B. **Genes IX**. 9. ed. Porto alegre: Artmed, 2009.

LI, H.; STAMPFER, M. J.; HOLLIS, J. B. W.; MUCCI, L. A.; GAZIANO, J. M.; HUNTER, D.; GIOVANNUCCI, E. L.; MA, J. A Prospective Study of Plasma Vitamin D Metabolites, Vitamin D Receptor Polymorphisms, and Prostate Cancer. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 3, p. 562-571, mar. 2007.

LI, L.; OKINO, S. T.; DAHIYA, R. DNA methylation in prostate cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1704, p. 87-102, jul. 2004.

LINDSTRÖM, S.; MA, J.; ALTSHULER, D.; GIOVANNUCCI, E.; RIBOLI, E.; ALBANES, D.; ALLEN, N. E.; BERNDT, S. I.; BOEING, H.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; CHANOCK, S. J.; DUNNING, A. M.; FEIGELSON, H. S.; GAZIANO, J. M.; HAIMAN, C. A.; HAYES, R. B.; HENDERSON, B. E.; HUNTER, D. J.; KAAKS, R.; KOLONEL, L. N.; LE MARCHAND, L.; MARTÍNEZ, C.; OVERVAD, K.; SIDDIQ, A.; STAMPFER, M.; STATTIN, P.; STRAM, D. O.; THUN, M. J.; TRICHOPOULOS, D.; TUMINO, R.; VIRTAMO, J.; WEINSTEIN, S. J.; YEAGER, M.; KRAFT, P.; FREEDMAN, M. L. A Large Study of Androgen Receptor Germline Variants and Their Relation to Sex Hormone Levels and Prostate Cancer Risk. Results from the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 9, p. E121–E127, set. 2010.

LIPPMAN, S. M.; KLEIN, E. A.; GOODMAN, P. J.; LUCIA, M. S.; THOMPSON, I. M.; FORD, L. G.; PARNES, H. L.; MINASIAN, L. M.; GAZIANO, J. M.; HARTLINE, J. A.; PARSONS, J. K.; BEARDEN, J. D.; CRAWFORD, E. D.; GOODMAN, G. E.; CLAUDIO, J.; WINQUIST, E.; COOK, E. D.; KARP, D. D.; WALTHER, P.; LIEBER,

M. M.; KRISTAL, A. R.; DARKE, A. K.; ARNOLD, K. B.; GANZ, P. A.; SANTELLA, R. M.; ALBANES, D.; TAYLOR, P. R.; PROBSTFIELD, J. L.; JAGPAL, T. J.; CROWLEY, J. J.; MEYSKENS, F. L.; BAKER, L. H.; COLTMAN, C. A. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial. **JAMA**, v. 301, n. 1, p. 39-51, jan. 2009.

LOH, Y. H.; MITROUA, P. N.; BOWMAN, R.; WOODD, A.; JEFFERY, H.; LUBENE, R. N.; LENTJESA, M. A. H.; KHAWA, K.; RODWELLA, S. A. *MGMT* Ile143Val polymorphism, dietary factors and the risk of breast, colorectal and prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk study. **DNA Repair**, v. 9, p. 421–428, jan. 2010.

LOPHATANANON, A.; ARCHER, J.; EASTON, D.; POCOCK, R.; DEARNALEY, D.; GUY, M.; KOTE-JARAI, Z.; O'BRIEN, L.; WILKINSON, R. A.; HALL, A. L.; SAWYER, E.; PAGE, E.; LIU, J. F.; BARRATT, S.; RAHMAN, A. A. Dietary fat and early-onset prostate cancer risk. **British Journal of Nutrition**, v. 103, n. 9, p. 1375-1380, maio 2010.

LUO, J.; YU, P. Y. Genetic factors underlying prostate. **Cancer Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 5, p. 1-26, abr. 2003.

MACLEAN, H.E.; WARNE, G. L.; ZAJAC, J. D. Localization of functional domains in the androgen receptor. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 62, n. 4, p. 233–242, abr. 1997.

MANNERVIK, B.; AWASTHI, Y. C.; BOARD, P. G.; HAYES, J. D.; DI ILIO, C.; KETTERER, B.; LISTOWSKY, I.; MORGENSTERN, R.; MURAMATSU, M.; PEARSON, W. R.; PICKETTII, C. B.; SATO, K.; WIDERSTEN, M.; WOLF, C. R. Nomenclature for human glutathione transferases. **Biochemical Journal**, v. 282, p. 305-308, fev. 1992.

MAO, G. E.; MORRIS, G.; LU, Q.; CAO, W.; REUTER, V. E.; CORDON-CARDO, C.; DALBAGNI, G.; SCHER, H. I.; DEKERNION, J. B.; ZHANG, Z. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism, cigarette smoking and prostate cancer. **Cancer Detection and Prevention**, v. 28, p. 368–374, jul. 2004.

MARGISON, G. P. POVEY, A. C.; KAINA, B.; KOREF, M. F. S. Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **Carcinogenesis**, v. 24, n. 4, p. 625-635, abr. 2003.

MARUYAMA, R.; TOYOOKA, S.; TOYOOKA, K. O.; VIRMANI, A. K.; ZÖCHBAUER-MÜLLER, S.; FARINAS, A. J.; MINNA, J. D.; MCCONNELL, J.; FRENKEL, E. P.; GAZDAR, A. F. Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 514–519, fev. 2002

MEDEIROS, R. Steroid hormone genotypes ARStu1 and ER325 are linked to the progression of human prostate cancer. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 141, n. 2, p. 91–96, mar. 2003.

MIKESKA, T.; BOCK, C.; DO, H.; DOBROVIC, A. DNA methylation biomarkers in cancer: progress towards clinical implementation. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 5, p. 473-487, jun. 2012

MILLER, A. B. New Data on Prostate-Cancer Mortality after PSA Screening. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 11, p. 1047-1048, 2012.

MILLER, G. J. Vitamin D and prostate cancer: Biologic interactions and clinical potentials **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 17, p. 353–360, 1999.

MILLER, M. C.; MOHRENWEISER, H.W.; BELL, D. A. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. **Toxicology Letters**, v. 120, p. 269–280, mar. 2001.

MORRISON, N. A.; QI, J. C.; TOKITA, A.; KELLY, P. J.; NGUYEN, T. V.; SAMBROOK, P. N.; EISMAN, J. A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. **Nature** (Lond.), v. 367, p. 284–287, 1994. Apud HABUCHI, T.; SUZUKI, T.; SASAKI, R. et al. Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism with Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia in a Japanese Population. **Cancer Research**, v. 60, p. 305-308, jan. 2000.

MURATA, M.; SHIRAISHI, T.; FUKUTOME, K.; WATANABE, M.; NAGA, M.; KUBOTA, Y.; IT, H.; KAWAMURA, J.; YATANI, R. Cytochrome P4501A1 and Glutathione S-Transferase M1 Genotypes as Risk Factors for Prostate Cancer in Japan. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n.11, p. 657-660, nov. 1998.

NATARAJAN, A. T.; VERMEULEN, S.; DARROUDI, F.; VALENTINE, M. B.; BRENT, T. P.; MITRA, S.; TANO, K. Chromosomal localization of human O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) gene by in situ hybridization. **Mutagenesis**, v. 7, p. 83–85, 1992 Apud ZHONG, Y.; HUANG, Y.; HUANG, Y.; ZHANG, T.; MA, C.; ZHANG, S.; FAN, W.; CHEN, H.; QIAN, J.; LU, D. Effects of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) polymorphisms on cancer: a meta-analysis. **Mutagenesis**, v. 25, p. 83–95, nov. 2010.

NEJENTSEV, S.; GODFREY, L.; SNOOK, H.; RANCE, H.; NUTLAND, S.; WALKER, N. M.; LAM, A. C.; GUJA, C.; TIRGOVISTE, C.; UNDLIEN, D. E.; RONNINGEN, K. S.; TUOMILEHTO-WOLF, E.; TUOMILEHTO, J.; NEWPORT, M. J.; CLAYTON, D. G.; TODD, J. A. Comparative high-resolution analysis of linkage disequilibrium and tag single nucleotide polymorphisms between populations in the vitamin D receptor gene. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 15, p. 1633–1639, ago. 2004.

OAKLEY-GIRVAN, I.; FELDMAN, D. T.; ECCLESHALL, R.; GALLAGHER, R. P.; WU, A. H.; KOLONEL, L. N.; HALPERN, J.; BALISE, R. R.; WEST, D. W.; PAFFENBARGER JR., R. S.; WHITTEMORE, A. S. Risk of Early-Onset Prostate Cancer in Relation to Germ Line Polymorphisms of the Vitamin D Receptor. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 8, ago. 2004.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 74-108, dez. 2005.

PEGG, A. E.; FANG, Q.; LOKTIONOVA, N. A. Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. **DNA Repair**, v. 6, p. 1071–1078, maio 2007.

PEGG, A. E.; BYERS, T. L. Repair of DNA containing O6- alkylguanine. **The FASEB Journal**, v. 6, p. 2302–2310, mar. 1992.

PENTYALA S. N.; LEE, J.; HSIEH, K.; WALTZER, W. C.; TROCCHIA, A.; MUSACCHIA, L.; REBECCHI, M. J.; KHAN S. A. Prostate cancer: a comprehensive review. **Medical Oncology**, v. 17, p. 85-105, maio 2000.

PHÉ, V.; CUSSENOT, O.; ROUPRÊT, M. Methylated genes as potential biomarkers in prostate cancer. **BJUI International**, v. 105, n. 10, p. 1364-1370, maio 2010.

PICKETT, C. B. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 743 -764, 1989.

PLASKON LA, PENSON DF, VAUGHAN TL, STANFORD JL. Cigarette smoking and risk of prostate cancer in middle-aged men. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 12, n. 7, p. 604-609, jul. 2003.

PLASS, C. Cancer epigenomics. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 20, p. 2479-2488, out. 2002.

POSTMA, R, SCHRÖDER, S. H. Screening for prostate cancer. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 825-833, abr. 2005.

QIAN, X. C.; BRENT, T. P. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. **Cancer Research**, v. 57, p. 3672–3677, set. 1997.

REBBECK, T. R. Inherited Genotype and Prostate Cancer Outcomes. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 945-952, out. 2002.

REYNOLDS, M. A.; KASTURY, K.; GROSKOPF, J.; SCHALKEN, J. A.; RITTENHOUSE, H. Molecular markers for prostate cancer. **Cancer Letters**, v. 249, p. 5–13, abr. 2007.

RITCHEY, J. D.; HUANG, W.; CHOKKALINGAM, A. P.; GAO, Y.; DENG, J.; LEVINE, P.; STANCZYK, F. Z.; HSING, A. Genetic variants of DNA repair genes and prostate cancer: a population-based study. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 1703–1709, jul. 2005.

ROBERTSON, K.D. DNA methylation and human disease. **Nature**, v. 6, p. 597-610, ago. 2005.

RUSHMORE, T. H.; PICKETT, C. B.; Glutathione S-Transferases, Structure, Regulation, and Therapeutic Implications. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 16, p. 11475-11478, jun. 1993.

SCHAID, D. J. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 13, p. 103-121, jan. 2004.

SCHROEDER, F. H. S30. Review of best markers for prostate cancer. **Cancer Prevention**, v. 6, n. 2, p 1-40, 2008.

SCHRÖDER, F. H.; HUGOSSON, J.; ROOBOL, M. J.; TAMMELA, T. L. J.; CIATTO, S.; NELEN, V.; KWIATKOWSKI, M.; LUJAN, M.; LILJA, H.; ZAPPA, M.; DENIS, L. J.; RECKER, F.; PÁEZ, A.; MÄÄTTÄNEN, L.; BANGMA, C. H.; AUS, G.; CARLSSON, S.; VILLERS, A.; REBILLARD, X.; KWAST, T.; KUJALA, P. M.; BLIJENBERG, B. G.; STENMAN, H.; UBER, A.; TAARI, K.; HAKAMA, M.; MOSS, S. M.; KONING, H. J.; AUVINEN, A. Prostate-Cancer Mortality at 11 Years of Follow-up. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, p. 981-90, mar. 2012.

SCHULZ, W. A.; HATINA, J. Epigenetics of prostate cancer: beyond DNA methylation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 1, p. 100-125, jan/mar. 2006.

SHEPARD, T. F.; PLATZ, E. A.; KANTOFF, P. W.; NELSON, W. G.; ISAACS, W. B.; FREIJE, D.; FEBBO, P. G.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E. No association between the I105V polymorphism of the Glutathione S-Transferase P1 gene (*GSTP1*) and prostate cancer risk: a prospective study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 9, p. 1267-1268, nov. 2000.

SHUI, I. M.; MUCCI, L. A.; KRAFT, P.; TAMIMI, R. M.; LINDSTROM, S.; PENNEY, K. L.; NIMPTSCH, K.; HOLLIS, B. W.; DUPRE, N.; PLATZ, E. A.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E. Vitamin D-related genetic variation, plasma vitamin D, and risk of lethal prostate cancer: a prospective nested case-control study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 9, p.690-699, maio 2012.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2012. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, n. 1, p. 10-29, jan/fev. 2012.

SIMÕES, J. C. et al. **Câncer estadiamento e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Editora Marina, 2008.

SIVOŇOVÁ, M.; WACZULÍKOVÁ, I.; DOBROTA, D.; MATÁKOVÁ, T.; HATOK, J.; RAČAY, P; KLIMENT, J. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1, T1, P1 and the risk of prostate cancer: a case-control study. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 28, p. 32, mar. 2009.

STRONG, L. C.; AMOS, C. I. Inherited susceptibility. In: SCHOTTENFELD, D.; FRAUMENI, J. F. **Cancer epidemiology and prevention**, 2. Ed. edition. New York: Oxford, 1996. Apud COUGHLIN, S. S.; HALL, I. J. A Review of Genetic Polymorphisms and Prostate Cancer Risk. **Annals of Epidemiology**, v. 12, p. 182–196, abr. 2002.

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

SWAMI, S.; KRISHNAN, A. V.; FELDMAN, D. Vitamin D metabolism and action in the prostate: Implications for health and disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 347, p. 61–69, dez. 2011.

TABY, R.; ISSA, J. P. Cancer Epigenetics. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 60, n. 6, p. 376-92, nov. 2010.

TAKAI, D.; JONES, P. A. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **PNAS**, v. 99, n. 6, p. 3740–3745, mar. 2002

THOMPSON, I.; THRASHER, J. B.; AUS, G.; BURNETT, A. L.; CANBY-HAGINO, E. D.; COOKSON, M. S.; D'AMICO, A. V.; DMOCHOWSKI, R. R.; ETON, D. T.; FORMAN, J. D.; GOLDENBERG, S. L.; HERNANDEZ, J.; HIGANO, C. S.; KRAUS, S. R.; MOUL, J. W.; TANGEN, C. M. Guideline for the Management of Clinically Localized Prostate Cancer: 2007 Update. **The Journal of Urology**, v. 177, p. 2106-2131, jun. 2007.

TROCK, B. J.; BROTZMAN, M. J.; MANGOLD, L. A.; BIGLEY, J. W.; EPSTEIN, J. I.; MCLEOD, D.; KLEIN, E. A.; JONES, J. S.; WANG, S.; MCASKILL, T.; MEHROTRA, J.; RAGHAVAN, B.; PARTIN, A. W. Evaluation of *GSTP1* and APC methylation as indicators for repeat biopsy in a high-risk cohort of men with negative initial prostate biopsies. **BJUI International**, v. 10, n. 1, p. 56-62, jul. 2011.

VAN NESTE, L.; HERMAN, J. G.; OTTO, G.; BIGLEY, J. W.; EPSTEIN, J. I.; VAN CRIEKINGE, W. The epigenetic promise for prostate cancer diagnosis. **The Prostate**, v. 72, p. 1248-1261, ago. 2012

YAMANAKA, M. WATANABE, M.; YAMADA, Y.; TAKAGI, A.; MURATA, T.; TAKAHASHI, H.; SUZUKI, H.; ITO, H.; TSUKINO, H.; KATOH, T.; SUGIMURA, Y.; SHIRAISHI, T. Altered methylation of multiple genes in carcinogenesis of the prostate. **International Journal of Cancer**, v. 106, p. 382–387, 2003.

YEGNASUBRAMANIAN, S.; KOWALSKI, J.; GONZALGO, M. L.; ZAHURAK, M.; PIANTADOSI, S.; WALSH, P. C.; BOVA, G. S.; DE MARZO, A. M.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. **Cancer Research**, v. 64, n. 6, p. 1975-1986, mar. 2004.

YEN, C. Y.; LIU, S. Y.; CHEN, C. H.; TSENG, H. F.; CHUANG, L. Y.; YANG, C. H.; LIN, Y. C.; WEN, C. H.; CHIANG, W. F.; HO, C. H.; CHEN, H. C.; WANG, S. T.; LIN, C. W.; CHANG, H. W. Combinational polymorphisms of four DNA repair genes XRCC1, XRCC2, XRCC3, and XRCC4 and their association with oral cancer in Taiwan. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 37, p. 271–277, maio 2008.

YONDER, J. A.; WALSH, C. P.; BESTOR, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends in Genetics**, v. 13, n. 8, p. 335–340, ago. 1997.

YOON, H. Y.; KIM, Y. W.; KANG, H. W.; KIM, W. T.; YUN, S. J.; LEE, S. C.; KIM, W. J.; KIM, Y. J. DNA methylation of *GSTP1* in human prostate tissues: pyrosequencing analysis. **Korean Journal of Urology**, v. 53, n. 3, p. 200-205, mar. 2012.

WATSON, M. A.; STEWART, R. K.; SMITH, G. B. J.; MASSEY, T. E.; BELL, D. A. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 275–280, fev. 1998.

WCRF/AICR, World Cancer Research Fund / American Institute for Cancer Research. **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective**. Washington DC: AICR, 2007

WOJDACZ, T. K.; DOBROVIC, A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 6, e41, fev. 2007.

WOJDACZ, T. K.; DOBROVIC, A.; HANSEN, L.L. Methylation-sensitive high-resolution melting. **Nature Protocols**, v. 3, n. 12, p. 1903-1908, nov. 2008.

ZIMNIAK, P.; NANDUR, B.; PIKULA, S.; BANDOROWICS-PIKULA, J.; SINGHAL, S.; SRIVASTAVA, S.; AWASHTHI, S.; AWASTHI, Y. Naturally occurring human glutathione S-transferase *GSTP1-1* isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymatic properties. **European Journal of Biochemistry**, v. 224, p. 893–899, jul. 1994.

ZHONG, Y.; HUANG, Y.; HUANG, Y.; ZHANG, T.; MA, C.; ZHANG, S.; FAN, W.; CHEN, H.; QIAN, J.; LU, D. Effects of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) polymorphisms on cancer: a meta-analysis. **Mutagenesis**, v. 25, p. 83–95, nov. 2010.

Código nº _____

HISTÓRICO PESSOAL

- 1- Registro hospitalar: _____
- 2- Sexo: () masculino () feminino
- 3- Qual a cor da sua pele?
 Negro () Branco () Amarelo () Outros ()
- 4- Idade: a) 35 –50 anos. b) mais que 50 anos.
- 5- Local de nascimento: Paraná ? () SIM () NÃO
 Se NÃO: Que região brasileira ? Norte () Sul () Nordeste () Centro-Oeste () Sudeste
 ()
- 6- Sua moradia é na zona rural ou urbana? () Rural () Urbana
- 7- Quanto tempo vive neste local? _____anos _____meses
- 8- Qual o seu grau de instrução?
 () analfabeto () 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 de Saúde

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

SIM NÃO não sabe

Se SIM

- Hormônio
- Antiinflamatório
- Analgésicos
- Antipertensivos
- Anabolizantes
- Outros

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

SIM NÃO não sabe

24 – Você já foi submetido a cirurgia nos testículos?

SIM NÃO

Qual? _____

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

Qual? _____

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

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

Pai Mãe Irmão Filho Tio Primo Outro

28- Qual foi a localização do tumor?

Próstata Mama Bexiga Outro (qual?) _____

29 – Você já teve alguma doença sexualmente transmissível?

SIM NÃO

Se sim, qual? _____

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

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

31- Você come carne? () SIM () NÃO

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

Dias/Semana

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

Histórico genético

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


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

ANEXO 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná.



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
Registro CONEP 268

<p>Parecer de Aprovação Nº 024/10 CAAE Nº 0031.0.268.000-10 FOLHA DE ROSTO Nº 320706</p>	<p>Londrina, 12 de maio de 2010.</p>
<p>PESQUISADORA: ILCE MARA DE SYLLOS COLUS CCB/DEPTO BIOLOGIA GERAL</p>	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (<u>Registro CONEP 268</u>)— de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p>"POLIMORFISMOS GENÉTICOS E MARCADORES EPIGENÉTICOS COMO MARCADORES PROGNÓSTICOS EM TUMORES UROTÉLIAIS"</p>	
<p>Situação do Projeto: APROVADO</p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Atenciosamente,</p>  <p>Profª. Dra. Alexandrina Apãrecida Maciel Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL</p>	

ANEXO 3: Autorização do Hospital do Câncer de Londrina para a utilização das amostras dos pacientes do Serviço de Urologia.



DECLARAÇÃO

Declaro para devidos fins que o Hospital de Câncer de Londrina autoriza a utilização de amostras dos pacientes do Serviço de Urologia desta instituição, no projeto de pesquisa intitulado “Polimorfismos genéticos e marcadores epigenéticos como marcadores prognósticos em tumores uroteliais”, realizado em parceria com o - Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, sob coordenação da pesquisadora Ilce Mara de Syllos Cólus.

Londrina, 15 de março de 2010.


Cassio José de Abreu
Diretor Clínico