



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÔMICAS NOS GENES
FMOD, *GSTP1*, *KLK3*, *RNASEL*, *SRD5A2*, *XRCC1* E *CASC8* NO CÂNCER DE
PRÓSTATA**

Caroliny Pinto Gomes

Rio de Janeiro
2020



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caroliny Pinto Gomes

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÔMICAS NOS GENES
FMOD, GSTP1, KLK3, RNASEL, SRD5A2, XRCC1 E *CASC8* NO CÂNCER DE
PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Pedro Hernan Cabello Acero

Rio de Janeiro
2020

Pinto Gomes, Caroliny.

Caracterização das Alterações Genômicas nos Genes FMOD, GSTP1, KLK3, RNASEL, SRD5A2, XRCC1 e CASC8 no Câncer de Próstata / Caroliny Pinto Gomes. - Rio de Janeiro, 2020.

146 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientador: Pedro Hernan Cabello Acero.

Bibliografia: f. 102-122

1. Câncer de próstata. 2. Polimorfismo. 3. Expressão gênica. 4. Biomarcador. 5. Risco. I. Título.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caroliny Pinto Gomes

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES GENÔMICAS NOS GENES
FMOD, GSTP1, KLK3, RNASEL, SRD5A2, XRCC1 E *CASC8* NO CÂNCER DE
PRÓSTATA**

Orientador: Dr. Pedro Hernan Cabello Acero

Aprovada em: 31/01/2020

Examinadores:

Dr^a. Mariana Caldas Waghbi (Presidente) – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Dr. Fernando Regla Vargas (Titular) – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira (Titular) – Instituto Nacional de Câncer/INCA

Dr^a. Luciana Lopes Ribeiro Garzoni (Suplente) – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Dr^a. Ana Paula Dinis Ano Bom (Suplente) – Biomanguinhos/Fiocruz

Dr^a. Adriana Cesar Bonomo (Revisora) – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Rio de Janeiro, 31 de janeiro de 2020

*Dedico este trabalho aos amores da minha vida: meus pais,
Luiz e Suzy, minha avó, Celia e meu namorado, Gabriel.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à minha mãe Nossa Senhora Aparecida por ter me guiado, protegido e me concedido saúde e força para superar todas as dificuldades.

Aos meus pais, Luiz e Suzy, por todo apoio, dedicação, incentivo e amor incondicional, pois sem eles nada disso seria possível.

À minha amada avó Celia (*in memoriam*) que sempre soube as palavras certas para me incentivar e me fazer continuar lutando pelos meus sonhos.

Ao meu namorado, Gabriel, por todo carinho, amor e paciência nesse processo. Agradeço por todas as palavras de conforto e por sempre me fazer acreditar em mim.

Aos meus avós, Luiz, Cida e Ivan, a minha família e aos meus amigos por todo apoio e amor que sempre me deram nessa difícil jornada.

Ao meu orientador, Dr. Pedro Cabello, que me acolheu desde a iniciação científica e permitiu que eu concluísse mais esta etapa da minha formação. Obrigada por todos os ensinamentos, sou muito honrada por ter um profissional tão qualificado e inspirador para me guiar.

À minha orientadora, Dr^a. Tatiana Tilli, que conheci a tão pouco tempo, mas pode neste período se tornar essencial para a elaboração deste projeto e para a minha construção de conhecimentos. Me sinto feliz e inspirada por ter iniciado essa colaboração.

À Dr^a. Vivianne Galante que me acolheu como sua aluna e acreditou em meu potencial desde o início. Obrigada por todas as conversas, os ensinamentos e por sempre ser uma inspiração profissional e pessoal para mim.

A todos os amigos e companheiros do LabGen que sempre foram extremamente acolhedores e incentivadores. Agradeço a vocês por sempre estarem comigo nos momentos de tensão e nos de descontração. Vocês são uma verdadeira família e em especial, agradeço à: Tamara Silva, Danielle Voigt, Karoline de Medeiros, Nicole Cosentino, Ritiele Bastos, Danielle Rodrigues, Juliana Rosa e Alessandra Lima.

A todos do Laboratório de Genética Humana (Fiocruz) que me acolheram e me auxiliaram neste projeto particularmente as queridas Gabriella Medeiros e Ana Carolina.

À Policlínica de Duque de Caxias e ao Banco de Tumores do INCA que puderam tornar este projeto possível com sua colaboração, especialmente ao Dr. Enrique Covarrubias da PDC, a Dr^a. Maria Thereza Accioly e ao Dr. Martin Bonamino do INCA.

A todos os pacientes que aceitaram participar deste trabalho e aos seus familiares por apoiarem esse processo.

À Dr^a. Aline Moreira e às técnicas da plataforma de sequenciamento da Fiocruz (PDTIS), pela disponibilidade e presteza em sequenciar as amostras, sempre com muito zelo e rapidez.

A todos do corpo docente do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, por suas aulas empolgantes e engrandecedoras, obrigada por todos os ensinamentos transmitidos.

A todos que, com boa intenção, colaboraram para a realização e finalização deste trabalho.

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro na forma de projetos e bolsas.

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende”.*

Leonardo da Vinci



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Caracterização das alterações genômicas nos genes *FMOD*, *GSTP1*, *KLK3*, *RNASEL*, *SRD5A2*, *XRCC1* e *CASC8* no câncer de próstata

Dissertação de Mestrado

Caroliny Pinto Gomes

O câncer de próstata (CaP) e a hiperplasia prostática benigna (HPB) são as patologias mais agressivas e frequentes em relação a próstata. Elas possuem etiologia multifatorial com ênfase para idade e fatores genéticos e têm altos índices de morbidade e mortalidade. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a associação de alterações em genes candidatos com o risco de desenvolvimento do CaP e da HPB em amostra da população do Rio de Janeiro, além de avaliar o perfil de expressão *in silico* desses genes no CaP. As análises moleculares foram realizadas através do sequenciamento do gene *FMOD* e da análise de polimorfismos rs1695 (*GSTP1*), rs1058205 (*KLK3*), rs486907 (*RNASEL*), rs523349 (*SRD5A2*), rs25487 (*XRCC1*) e rs1447295 (*CASC8*) por meio das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e da PCR *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Para a execução dessas análises foram extraídas amostras de sangue periférico de 100 indivíduos saudáveis, 49 pacientes com CaP e 135 com HPB. Nas análises *in silico* foram utilizados dados clínicos e de RNAseq de 496 amostras teciduais presentes no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). O rastreamento do *FMOD* revelou seis variantes presentes na amostra que incluem: três *missense* (rs139299015, rs115908597 e rs145901742), sendo duas dessas patogênicas, além de duas sinônimas (rs7543148 e rs77856193) e uma intrônica (rs1891180). As análises dos polimorfismos indicaram associações significativas entre o genótipo conjunto AG+GG do rs1695 (*GSTP1*) e o aumento do risco de CaP, tanto quando comparado com o controle quanto com a HPB (*odds ratio*= 2,30; intervalo de confiança 95%= 1,12–4,73 e OR= 3,36; IC 95%= 1,68–6,71, respectivamente). Além disso, o alelo mutante G aumenta o risco de CaP em relação a HPB (OR= 1,80; IC 95%= 1,11–2,94). O genótipo conjunto AA+AG do rs25487 (*XRCC1*) revelou estar associado com maior risco de HPB quando comparado com o controle (OR= 2,29; IC 95%= 1,31–4,00) e o genótipo GG mostrou maior risco para CaP em relação a HPB (OR= 2,61; IC 95%= 1,33–5,12). Para o rs1447295 (*CASC8*) encontramos associação significativa com o aumento do peso da próstata em indivíduos com HPB ($p=0,04$). Nas análises *in silico*, todos os genes apresentaram diferenças significativas no perfil de expressão entre os tecidos não-tumorais e tumorais de próstata. E nas comparações com os dados clínicos, o *FMOD* apresentou resultados interessantes, no qual a expressão se mostrou diminuída nos estágios mais avançados de CaP avaliados através dos parâmetros do antígeno específico da próstata (PSA) e do score de Gleason. Todos esses achados destacam a importância da contribuição da variação da linhagem germinativa do *GSTP1* e do *XRCC1* para o aumento do risco do CaP. Além de ter revelado informações pertinentes ao comportamento do perfil de expressão tecidual do *FMOD* e as características clínicas do CaP. Vale ressaltar que apesar das associações encontradas direcionando esses genes como fortes candidatos de suscetibilidade ao CaP, outros estudos são necessários para melhorar a compreensão do impacto das variações genômicas nessas doenças complexas.

Palavras-chave: câncer de próstata, polimorfismo, expressão gênica, biomarcador, risco.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Characterization of genomic alterations in *FMOD*, *GSTP1*, *KLK3*, *RNASEL*, *SRD5A2*, *XRCCI* and *CASC8* in prostate cancer

Master Dissertation

Caroliny Pinto Gomes

Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are the most aggressive and frequent prostate pathologies. They have multifactorial etiology with emphasis on age and genetic factors and have high rates of morbidity and mortality. The main objective of this work was to evaluate the association of alterations in candidate genes with the risk of developing PCa and BPH in a sample of the population of Rio de Janeiro, besides evaluating the *in silico* expression profile of these genes in PCa. Molecular analyzes were performed by sequencing the *FMOD* gene and by analyzing the rs1695 (*GSTP1*), rs1058205 (*KLK3*), rs486907 (*RNASEL*), rs523349 (*SRD5A2*), rs25487 (*XRCCI*) and rs1447295 (*CASC8*) using real-time polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques. To perform these analyzes, peripheral blood samples were extracted from 100 healthy individuals, 49 patients with PCa and 135 with BPH. *In silico* analyzes were used clinical and RNAseq data from 496 tissue samples present in The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. *FMOD* screening revealed six variants present in the sample that include: three missense (rs139299015, rs115908597 and rs145901742), two of these pathogens, and two synonyms (rs7543148 and rs77856193) and one intronic (rs1891180). Polymorphism analyzes indicated significant associations between the rs1695 (*GSTP1*) joint AG + GG genotype and the increased risk of PCa, when compared with control and BPH (odds ratio= 2.30; 95% confidence interval= 1.12–4.73 and OR= 3.36, 95% CI= 1.68–6.71, respectively). In addition, mutant G allele increases the risk of PCa relative to BPH (OR= 1.80; 95% CI= 1.11–2.94). The rs25487 (*XRCCI*) joint AA + AG genotype was found to be associated with a higher risk of BPH compared to the control (OR= 2.29; 95% CI= 1.31–4.00) and the GG genotype showed a higher risk for PCa compared to the BPH (OR= 2.61; 95% CI= 1.33–5.12). For rs1447295 (*CASC8*) we found significant association with increased prostate weight in individuals with BPH ($p=0.04$), we also found significant difference in color / race distribution of individuals with PCa and this polymorphism ($p = 0.04$). *In silico* analyzes, all genes showed significant differences in expression profile between non-tumor and tumor prostate tissues. And in comparisons with the clinical data, the *FMOD* presented interesting results, in which the expression was decreased in the most advanced stages of PCa evaluated through the prostate specific antigen (PSA) and Gleason score parameters. All these findings highlight the importance of the contribution of *GSTP1* and *XRCCI* germline variation to the increased risk of PCa. In addition to revealing information pertinent to the behavior of the *FMOD* tissue expression profile and the clinical characteristics of PCa. It is noteworthy that despite the associations found directing these genes as strong candidates for susceptibility to PCa, further studies are needed to improve understanding of the impact of genomic variations on these complex diseases.

Keywords: prostate cancer, polymorphism, gene expression, biomarker, risk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Principais características dos tumores.....	15
Figura 1.2 – Microambiente tumoral	20
Figura 1.3 – Heterogeneidade tumoral.....	22
Figura 1.4 – Estimativa de novos casos e de mortes por câncer no mundo	22
Figura 1.5 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil.....	23
Figura 1.6 – Disposição anatômica da próstata e suas zonas.....	25
Figura 1.7 – Histologia da próstata.....	26
Figura 1.8 – Próstata normal <i>versus</i> próstata hiperplásica	27
Figura 1.9 – Representação geográfica das taxas brutas de incidência de câncer de próstata no Brasil	29
Figura 1.10 – Composição celular do ácino prostático normal e do tumoral.....	30
Figura 1.11 – Estágios do CaP	31
Figura 1.12 – Classificação do câncer de próstata através score de Gleason.....	35
Figura 1.13 – Funções fisiológicas da fibromodulina.....	38
Figura 4.1 – Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do gene <i>FMOD</i>	49
Figura 4.2 – Discriminação dos genótipos do rs1695 (<i>GSTP1</i>) pela eletroforese.....	50
Figura 4.3 – Discriminação dos genótipos do rs25487 (<i>XRCC1</i>) pela eletroforese	51
Figura 4.4 – Gráficos multicomponentes da discriminação genotípica.....	52
Figura 5.1 – Eletroferogramas da alteração rs139299015 do <i>FMOD</i>	60
Figura 5.2 – Eletroferogramas da alteração rs115908597 do <i>FMOD</i>	60
Figura 5.3 – Eletroferogramas da alteração rs145901742 do <i>FMOD</i>	61
Figura 5.4 – Eletroferogramas da alteração rs7543148 do <i>FMOD</i>	61
Figura 5.5 – Eletroferogramas da alteração rs77856193 do <i>FMOD</i>	63
Figura 5.6 – Eletroferogramas da alteração rs1891180 do <i>FMOD</i>	63
Figura 5.7 – Perfil de expressão dos genes candidatos em amostras tumorais e não-tumorais de próstata	80
Figura 5.8 – Correlação entre a expressão dos genes candidatos e os níveis de PSA de pacientes com CaP	82
Figura 5.9 – Correlação entre o perfil de expressão dos genes candidatos e o score de Gleason de pacientes com CaP	84
Figura 5.10 – Correlação do perfil de expressão dos genes candidatos e o subtipo molecular de pacientes com CaP	86
Figura 5.11 – Análise do perfil de expressão dos genes candidatos no PAN-Câncer ...	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Desenho dos <i>primers</i> do gene <i>FMOD</i>	46
Tabela 4.2 – Condições de ciclagem para o sequenciamento do gene <i>FMOD</i>	48
Tabela 4.3 – Desenho dos <i>primers</i> para PCR-RFLP	49
Tabela 4.4 – Desenho das sondas TaqMan	52
Tabela 5.1 – Comparação das variáveis quantitativas em relação aos grupos amostrais	57
Tabela 5.2 – Comparação das variáveis qualitativas em relação aos grupos amostrais	58
Tabela 5.3 – Variantes evidenciadas na análise molecular do gene <i>FMOD</i>	59
Tabela 5.4 – Análise de predição das variantes <i>missense</i> evidenciadas no <i>FMOD</i>	59
Tabela 5.5 – Distribuição alélica e genotípica do rs7543148 (<i>FMOD</i>) entre os grupos	62
Tabela 5.6 – Distribuição alélica e genotípica do rs1891180 (<i>FMOD</i>) entre os grupos amostrais.....	64
Tabela 5.7 – Distribuição genotípica e alélica do rs1695 (<i>GSTP1</i>) entre os grupos	65
Tabela 5.8 – Análise de risco entre os grupos amostrais (Modelo Mutante Dominante)	66
Tabela 5.9 – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1695 (<i>GSTP1</i>)...	67
Tabela 5.10 – Distribuição genotípica e alélica do rs1058205 (<i>KLK3</i>) entre os grupos	68
Tabela 5.11 – Distribuição genotípica e alélica do rs486907 (<i>RNASEL</i>) entre os grupos	69
Tabela 5.12 – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs486907 (<i>RNASEL</i>).....	70
Tabela 5.13 – Distribuição alélica e genotípica do rs523349 (<i>SRD5A2</i>) entre os grupos	70
Tabela 5.14 – Distribuição genotípica e alélica do rs25487 (<i>XRCCI</i>) entre os grupos.	72
Tabela 5.15 – Análise de risco entre os grupos amostrais (Modelo Mutante Recessivo)	73
Tabela 5.16 – Distribuição genotípica e alélica do rs1447295 (<i>CASC8</i>) entre os grupos	73
Tabela 5.17 – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs1447295 (<i>CASC8</i>)	75
Tabela 5.18 – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1447295 (<i>CASC8</i>)	76
Tabela 5.19 – Regressão Logística Multivariada.....	77
Tabela 5.20 – Caracterização das coortes de CaP do TCGA	78
Tabela 5.21 – Compilado das alterações genômicas observadas no estudo.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitros
µM	Micromolar
A	Adenina
aa	Aminoácidos
Ala/A	Alanina
AMACR	Alfa metilacil CoA racemase
AR	Receptores de Androgênio
Arg/R	Arginina
ATP	Adenosina Trifosfato
C	Citosina
c.DNA	Referência para Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CAFs	Fibroblastos Associados ao Tumor
CaP	Câncer de Próstata
CASC8	Gene de Suscetibilidade ao câncer 8 (<i>cancer susceptibility 8</i>)
CK	Citoqueratinas
CN	Controle Negativo
CSCs	Células Tronco Tumorais (<i>cancer stem cells</i>)
DHT	Di-hidrotestosterona
DHT-AR	Complexo di-hidrotestosterona e receptor de androgênios
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DRE	Exame retal digital
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EFMA	Estroma Fibromuscular Anterior da Próstata
EMT	Transição Epitélio-Mesenquimal
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FMOD	Gene ou proteína Fibromodulina (<i>Fibromodulin</i>)
G	Guanina
g	Gramma
Gln/Q	Glutamina
GSTP1	Gene ou proteína Glutationa S-transferase pi 1 (<i>Glutathione S-transferase pi 1</i>)
HCP1	Região gênica relacionada ao câncer de próstata hereditário (1)
HF	Histórico familiar
HPB	Hiperplasia prostática benigna
H-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC 95%	Intervalo de Confiança de 95%
Ile/I	Isoleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
I-PSS	Score Internacional de Sintomas Prostáticos
kg	Quilogramas
KLK3	Gene Caliceína relacionada a peptidase 3 (<i>Kallikrein related peptidase 3</i>)
LabGen	Laboratório de Genética da Unigranrio
Leu/L	Leucina
LGH	Laboratório de Genética Humana da Fiocruz
lncRNA	<i>Long Non-Coding RNA</i>
LUTS	Sintomas do Trato Urinário Inferior
m	Metros
MEC	Matriz Extracelular
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar

Mpb	Marcador de Pares de Base
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
N	Número de indivíduos
n.DNA	Referência para Ácido Desoxirribonucleico Nuclear
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OR	<i>Oddis Rattio</i>
p	Braço curto de um cromossomo
p.	Referência para proteína
PCA3	Antígeno do câncer de próstata 3
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDTIS	Plataforma de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
Pro/P	Prolina
PSA	Antígeno Específico da Próstata
q	Braço longo de um cromossomo
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNASEL	Gene ou proteína Ribonuclease L
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por Minuto
s	Segundo
Ser/S	Serina
SNP ID	Identificador de Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SRD5A2	Gene ou proteína Esteróide 5-alfa redutase tipo 2 (<i>Steroid 5-alpha reductase type 2</i>)
T	Timina
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β1	Fator de Crescimento Transformador Beta 1
T_m	Temperatura de <i>Melting</i> (pareamento)
TNM	Sistema de classificação de tumores (T: tumor primário, N: linfonodos, M: metástase a distância)
TPM	Transcritos por Milhão
TRUS	Ultrassonografia transretal
TS	<i>Training Set</i>
Tyr/Y	Tirosina
Unigranrio	Universidade do Grande Rio José de Souza Herdy
Val/V	Valina
VS	<i>Validation Set</i>
XRCC1	Gene ou proteína Complementação Cruzada de Reparo de Raios-X 1 (<i>X-Ray repair cross complementing 1</i>)
ZC	Zona Central da próstata
ZP	Zona Periférica da próstata
ZT	Zona de Transição da próstata
ηg	Nanogramas
ηg/mL	Nanogramas por mililitros

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
+	Mais ou positivo
-	Não avaliado ou não informado
±	Mais ou menos
≥	Maior ou igual
>	Maior que
X	Vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Câncer	15
1.1.2 Epidemiologia do Câncer.....	22
1.2 Fisiopatologias da Próstata.....	24
1.2.1 Próstata	24
1.2.2 Hiperplasia Prostática Benigna	27
1.2.3 Câncer de Próstata	28
1.2.4 Fatores de Risco	36
1.3 Genes Candidatos	37
1.3.1 Gene <i>FMOD</i>	37
1.3.2 Gene <i>GSTP1</i>	39
1.3.3 Gene <i>KLK3</i>	39
1.3.4 Gene <i>RNASEL</i>	40
1.3.5 Gene <i>SRD5A2</i>	40
1.3.6 Gene <i>XRCC1</i>	41
1.3.7 Gene <i>CASC8</i>	41
2 JUSTIFICATIVA.....	42
3 OBJETIVO.....	43
3.1 Objetivo Geral.....	43
3.2 Objetivos Específicos	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 Casuística	44
4.1.1 Critério de Inclusão e Exclusão.....	44
4.2 Coleta de Material Biológico	45
4.3 Extração de DNA Genômico.....	45
4.4 Quantificação do DNA Genômico	45
4.5 Sequenciamento Automático	45
4.5.1 Construção dos Primers	46
4.5.2 PCR.....	46
4.5.3 Purificação dos Produtos de PCR.....	47
4.5.4 Reação de Sequenciamento.....	47
4.5.5 Análise das Sequências.....	48
4.6 Análise dos Polimorfismos Genéticos.....	49
4.6.1 PCR RFLP	49
4.6.2 PCR em Tempo Real	51
4.7 Análise <i>in Silico</i>	53
4.7.1 Análise de Predição	53
4.7.2 Amostra TCGA	54
4.7.3 Análise de Expressão e Dados Clínicos/Patológicos	55
4.8 Análise Estatística	55

4.8.1 Regressão Logística Multivariada	56
5 RESULTADOS	57
5.1 Análise Descritiva dos Grupos.....	57
5.2 Análise das Variantes Encontradas no Gene <i>FMOD</i>.....	58
5.2.1 Análise das Variantes <i>Missense</i> do <i>FMOD</i>	59
5.2.2 Análise das Variantes Sinônimas do <i>FMOD</i>	61
5.2.3 Análise da Variante Intrônica do <i>FMOD</i>	63
5.3 Análise dos Polimorfismos dos Genes Candidatos.....	65
5.3.1 <i>GSTP1</i> (rs1695).....	65
5.3.2 <i>KLK3</i> (rs1058205).....	67
5.3.3 <i>RNASEL</i> (rs486907)	68
5.3.4 <i>SRD5A2</i> (rs523349).....	70
5.3.5 <i>XRCC1</i> (rs25487)	71
5.3.6 <i>CASC8</i> (rs1447295).....	73
5.3.7 Análise da Regressão Logística Multivariada.....	76
5.4 Análise do Perfil de Expressão dos Genes Candidatos (<i>in silico</i>).....	78
5.4.1 Análise do Perfil de Expressão Gênica em Tecido de Próstata	79
5.4.2 Correlação entre o Perfil de Expressão dos Genes e os Dados Clínicos/Patológicos.....	81
5.4.3 Análise do PAN-Câncer	87
5.5 Compilado das Alterações Genômicas.....	90
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÃO.....	101
8 REFERÊNCIAS.....	102
9 APÊNDICES	123
Apêndice A – Questionário de histórico clínico e familiar do paciente	123
Apêndice B - Descrição das amostras da análise PAN-Câncer.....	126
Apêndice C - Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs1695 (<i>GSTP1</i>)	127
Apêndice D – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1695 (<i>GSTP1</i>)	128
Apêndice E – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs1058205 (<i>KLK3</i>)	129
Apêndice F – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1058205 (<i>KLK3</i>)	130
Apêndice G – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs486907 (<i>RNASEL</i>).....	132
Apêndice H – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs486907 (<i>RNASEL</i>).....	133

Apêndice I - Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs523349 (SRD5A2).....	134
Apêndice J – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs523349 (SRD5A2)	135
Apêndice K – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs25487 (XRCCI).....	137
Apêndice L – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs25487 (XRCCI)	138
Apêndice M – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1447295 (CASC8).....	140
10 ANEXOS	141
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	141
Anexo B – Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Unigranrio)	143
Anexo C – Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (INCA)....	144

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento descontrolado e pela disseminação de células com fenótipo transformado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Em suma, qualquer célula do corpo humano tem o potencial para se transformar em uma tumoral, sendo o início do processo de carcinogênese marcado por alterações genéticas e/ou epigenéticas no DNA (ácido desoxirribonucleico) da célula e assim, levando a desregulação da expressão de diversos genes essenciais para o correto funcionamento dos tecidos (HOLLSTEIN *et al.*, 2017). Posteriormente a essas alterações, as células adquirem capacidades e características (figura 1.1), que as permitem sobreviver, propagar e disseminar para outros órgãos (HANAHAN; WEINBERG, 2000; 2011).

Figura 1.1 – Principais características dos tumores



Imagem representativa das dez principais capacidades/características funcionais adquiridas pelas células tumorais, conhecidas como *hallmarks* do câncer. **Fonte:** Adaptada de HANAHAN; WEINBERG, 2011.

Os *hallmarks* do câncer descrevem uma base sólida para a compreensão da patogênese tumoral e eles são categorizados de acordo com as funções fisiológicas que modificam:

(I) *Autossuficiência em sinais de crescimento*: as células normais necessitam de sinais mitogênicos para alterar seu estado quiescente para proliferativo, esses sinais são mediados por fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular (MEC) e até por moléculas de adesão célula-célula. As células normais controlam cuidadosamente esse processo para manter a arquitetura e homeostase tecidual, enquanto as tumorais, além de receberem estímulos das células do microambiente tumoral, são capazes de sintetizar seus próprios sinalizadores (estimulação autócrina), mantendo autônoma grande parte da sinalização proliferativa (PENNATI *et al.*, 2016). Os proto-oncogenes são responsáveis por regular o crescimento e a diferenciação celular, logo, alterações neles estão intimamente relacionadas a sustentação desse *hallmark*. Essas alterações resultam em ganho de função para esses genes, sendo então denominados oncogenes, a exemplo podemos citar o *c-Myc*, *CDK*, *K-Ras*, *HER-2* e diversos outros (VICENTE-DUEÑAS *et al.*, 2013).

(II) *Evasão aos supressores tumorais*: em contraponto aos sinais proliferativos, existe o *feedback* negativo dessa sinalização, coordenado pelos supressores tumorais que tem por função inibir o crescimento e a proliferação exacerbada das células. Alterações nos genes que codificam esses supressores levam à perda de função e os mais conhecidos são o retinoblastoma 1 (*RBI*), que traduz sinais inibidores de crescimento, e a proteína tumoral 53 (*TP53*), que interrompe a progressão do ciclo celular em condições de estresse ou anormalidades como danos no DNA (DYSON, 2016; KASTENHUBER; LOWE, 2017).

(III) *Evasão à morte celular*: a apoptose é um mecanismo natural para eliminar células velhas ou defeituosas do organismo, naturalmente seria uma ótima barreira contra o desenvolvimento tumoral, porém mecanismos complexos atuam para que as células escapem desse programa e proliferem anormalmente (MOHAMMAD *et al.*, 2015). Alguns dos mecanismos incluem a desregulação de proteínas envolvidas na maquinaria apoptótica, principalmente da família Bcl-2 que é composta por proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak) e anti-apoptóticas (Bcl-2, Mcl-1) (CZABOTAR *et al.*, 2014; ASHKENAZI *et al.*, 2017). Além da apoptose, outros tipos de morte celular podem atuar para favorecer a sobrevivência das células cancerígenas. Por exemplo, a autofagia, que consiste na degradação lisossomal controlada de organelas em resposta à deficiência nutricional, tem apresentado diversas evidências de que favoreça a adaptação das células tumorais a terapias, mostrando ser um potencial alvo terapêutico (CHAACHOUAY *et al.*, 2011; AMARAVADI; KIMMELMAN; DEBNATH, 2019). O

outro tipo de morte é a necrose, que é caracterizada pela perda progressiva da integridade da membrana citoplasmática e extravasamento de diversos componentes para o meio extracelular, ela favorece a tumorigênese ao promover um ambiente pró-inflamatório (KARSCH-BLUMAN *et al.*, 2018).

(IV) *Potencial replicativo ilimitado*: para que tumores macroscópicos sejam gerados, as células tumorais necessitam romper duas limitações associadas a replicação. A primeira é a senescência, processo em que as células param de se reproduzir, e a segunda é a crise, que envolve a morte celular por apoptose das células envelhecidas, caso essas limitações sejam superadas a célula é levada a imortalização (GREENBERG, 2005; HAYASHI *et al.*, 2017). Diferentemente das células normais, nas células imortalizadas há alta expressão da telomerase, que é uma enzima responsável por adicionar segmentos de repetição em *tandem* nos telômeros e dessa forma combater a erosão progressiva dessa região do DNA, evitando assim a indução da senescência (ZVEREVA; SHCHERBAKOVA; DONTSOVA, 2010).

(V) *Indução de angiogênese*: assim como as células normais, os tumores necessitam atender suas necessidades nutricionais de crescimento, além de eliminar dióxido de carbono e resíduos metabólicos. Porém, com o aumento da massa tumoral, essa troca de metabólicos só é possível devido à angiogênese que é induzida, basicamente, por VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), angiopoietina e FGF1/2 (fator de crescimento de fibroblastos) que são produzidas pelas próprias células tumorais e pelas células imunes recrutadas (STONE *et al.*, 2017). Os novos vasos sanguíneos gerados ao longo da tumorigênese têm características morfológicas atípicas, bem diferentes e desorganizados em relação aos vasos normais, apresentando brotamento capilar precoce, ramificação excessiva dos vasos, vasos distorcidos, fluxo sanguíneo irregular e vazamentos (FARNSWORTH *et al.*, 2014; VIALARD; LARRIVÉE, 2017).

(VI) *Ativação de invasão e metástase*: no processo de carcinogênese ocorrem diversas alterações a nível regulatório que culminam com a diminuição da expressão de proteínas responsáveis pela manutenção da adesão célula-célula (por exemplo a E-caderina) e aumentam daquelas que regulam a migração celular (N-caderina) (VAN ROY, 2014). Essas alterações são normalmente encontradas nas células da borda do tumor e fazem parte da cascata de invasão-metástase. Essa cascata prevê uma sucessão de modificações biológicas que tem início na invasão local, no intravasamento seguido de migração das células cancerígenas pelos vasos sanguíneos e/ou linfáticos próximos,

depois segue para o extravasamento dessas células dos vasos para outros tecidos, favorecendo a formação de micrometástases, que podem proliferar e formar tumores macroscópicos (colonização) (VALASTYAN; WEINBERG, 2011). A transição epitélio-mesenquimal (EMT) é um programa regulatório de desenvolvimento, orquestrado por fatores de transcrição como Snail, Slug, Twist e Zeb 1/2, e tem sido implicado nos processos metastáticos, principalmente nas etapas invasivas da cascata (MITTAL, 2018). Na EMT, as células epiteliais perdem a adesão com as células vizinhas e adquirem propriedades mesenquimais, ou seja, elas passam a ter um perfil mais invasivo e resistente, marcado pela expressão de vimentina, fibronectina e miosina (NIETO *et al.*, 2016; KRÖGER *et al.*, 2019).

(VII) *Instabilidade genômica e mutação*: para que grande parte dos *hallmarks* sejam adquiridos, é necessário que as células acumulem uma sucessão de alterações em seu genoma, como as mutações pontuais, os rearranjos cromossômicos e as modificações epigenéticas (CRASTA *et al.*, 2012; BAKHOUM; LANDAU, 2017). Essas transformações se estabelecem apesar da extraordinária capacidade dos sistemas de manutenção para detectar defeitos no DNA, isso se dá em parte pela habilidade das células cancerígenas de aumentar as taxas de mutabilidade ao se tornarem mais sensíveis aos agentes mutagênicos e por apresentarem defeitos em componentes do mecanismo de reparo do DNA, conhecidos como os cuidadores do genoma – genes *caretaker* (CICCIA; ELLEDGE, 2010; NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010). A instabilidade genômica combinada a hiperproliferação celular favorece a heterogeneidade intratumoral, que é fundamental para a sobrevivência das células tumorais e evolução do quadro patológico ao resultar na seleção de subclones mais resistentes à morte celular programada e às terapias anti-câncer (BURRELL *et al.*, 2013; ASATRYAN; KOMAROVA, 2016; DAGOGO-JACK; SHAW, 2018).

(VIII) *Inflamação promotora de tumores*: o tecido tumoral, em geral, encontra-se altamente infiltrado por células do sistema imune que promovem um ambiente favorável para a sobrevivência e proliferação das células cancerígenas. Isso ocorre devido a liberação de fatores de sobrevivência que limitam a morte celular, de fatores pró-angiogênicos, de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são ativamente mutagênicas, de enzimas modificadoras da MEC que facilitam a angiogênese e a cascata invasão-metástase, além de liberar sinais que induzem à EMT (DENARDO; ANDREU; COUSSENS, 2010; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Dessa forma, a inflamação atua, por diversos mecanismos, para facilitar a aquisição dos outros

hallmarks, estando envolvida em praticamente todas as etapas do desenvolvimento tumoral.

(IX) *Desregulação do metabolismo*: as células cancerígenas apresentam peculiaridades em relação ao seu metabolismo. Mesmo na presença de oxigênio, elas se reprogramam para produzir adenosina trifosfato (ATP) através da glicólise (aeróbia) ao invés da fosforilação oxidativa mitocondrial, fenômeno conhecido como efeito Warburg. Esse efeito produz ao final da cascata altas taxas de lactato, ROS e ativação da sinalização de MAPK, contribuindo para o ambiente ácido dos tumores (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; RIEMANN *et al.*, 2011). Essa troca metabólica é paradoxal, visto que as células precisam de algum modo compensar a baixa eficiência de produção de ATP gerado por esta via, que são 4 moléculas de ATP em comparação a 36 da fosforilação. Contudo, foi demonstrado que o aumento da glicólise, resultante da regulação positiva dos transportadores de glicose (GLUTs), permite o desvio de intermediários glicolíticos para servir de base para a biossíntese de macromoléculas e organelas necessárias na montagem de novas células. Além disso, o efeito Warburg já foi evidenciado em tecidos embrionários que estão em rápida divisão, suportando ainda mais a ideia da necessidade dessa modificação metabólica para embasar a proliferação celular exacerbada das células tumorais (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011).

(X) *Evasão ao sistema imune*: linfócitos citotóxicos CD8 e CD4, linfócitos T *helper* (T_h) e células *natural killer* (NK) são fundamentais no processo de vigilância imunológica dos tumores e na sua erradicação (FRIDMAN *et al.*, 2012). A importância do sistema imune no controle da tumorigênese parece ser crucial, sendo reforçado pelo notável aumento de câncer em indivíduos imunocomprometidos como no caso de infecções por HIV, HPV e HBV (ONONOGBU *et al.*, 2013; PLUMMER *et al.*, 2016; BERMAN; SCHILLER, 2017). Mesmo com o funcionamento normal do sistema imune, as células cancerígenas podem adquirir mecanismos para fugir da vigilância, um deles é pela diminuição do reconhecimento dos antígenos tumorais devido a perda do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I (FRIEDRICH *et al.*, 2019). Outro recurso é adquirir maior resistência pela expressão aumentada de citocinas proliferativas e anti-apoptóticas (Bcl-2, STAT3), além de induzir um ambiente tumoral imunossupressor através da liberação de moléculas imunorreguladoras que paralisam a infiltração das células imunes (SHARMA *et al.*, 2017; TAURIELLO *et al.*, 2018).

A fisiopatologia do câncer engloba ainda a formação de um microambiente tumoral arquitetado pelas próprias células tumorais, pela MEC e por diferentes células

que são recrutadas e que contribuem para a manutenção da rigidez e dão suporte ao crescimento contínuo e descontrolado do tumor (figura 1.2). Algumas das células já descritas no estroma tumoral são os fibroblastos associados ao tumor (CAFs), as células endoteliais, os pericitos, as células tronco tumorais (CSCs) e as células inflamatórias que incluem células imunes inatas e adaptativas como os macrófagos associados ao tumor (TAM), os linfócitos CD8, CD4 e T_h, as células NK e os granulócitos (YANG; LIN, 2017; DENTON; ROBERTS; FEARON, 2018; TANIGUCHI; SUZUKI; NATORI, 2019). O recrutamento dessas células associadas ao tumor pode se dar por diferentes origens, seja a partir do tecido normal adjacente, derivadas de células saudáveis que sofrem subseqüentes mutações, ou ainda advindas da medula óssea, que tem sido cada vez mais implicadas neste contexto (YUAN *et al.*, 2016).

Figura 1.2 – Microambiente tumoral

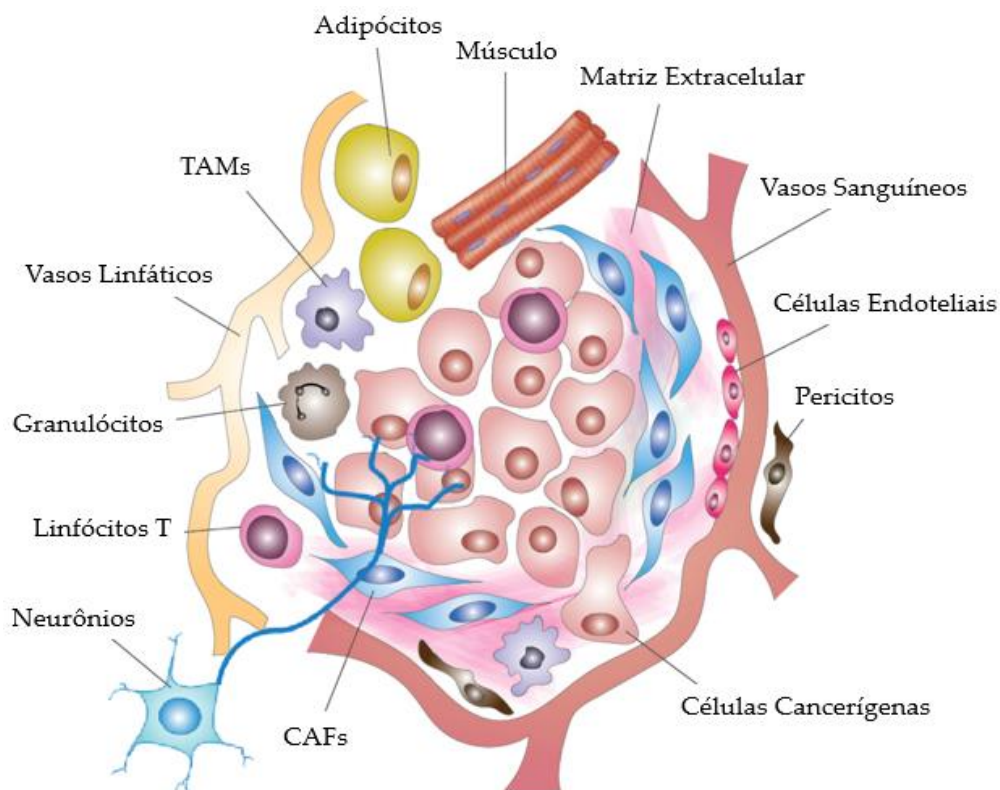


Diagrama esquemático descrevendo os principais componentes do microambiente tumoral. **CAFs:** fibroblastos associados ao tumor; **TAM:** macrófagos associados ao tumor. **Fonte:** Adaptada de PRAJAPATI; LAMBERT, 2016.

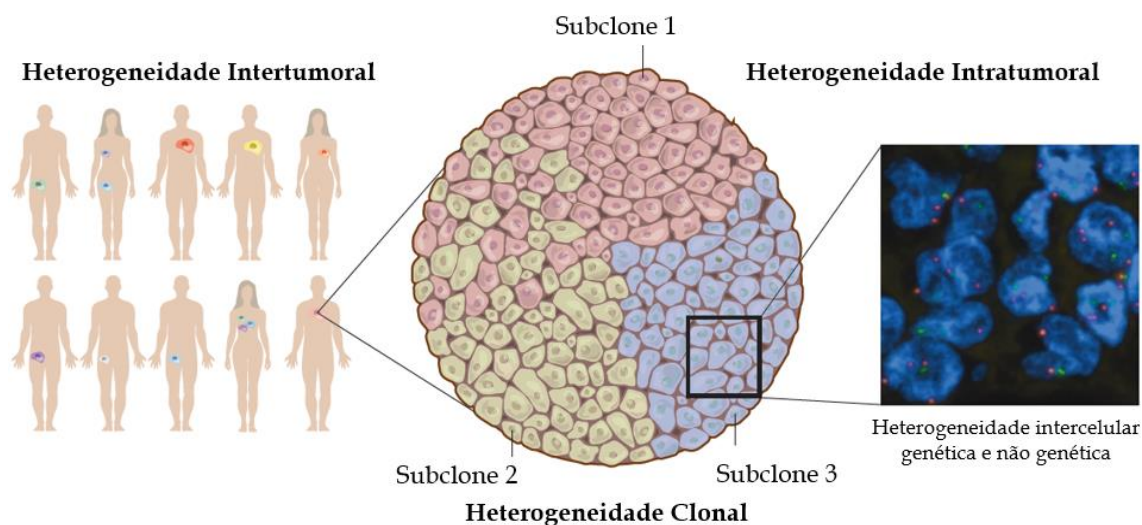
As CSCs, importante componente do microambiente, possuem a capacidade de se diferenciar e se autorrenovar dependendo da via de sinalização ativada. A origem das CSCs não está bem compreendida, mas os estudos a respeito desse fato giram entorno do acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas em células diferenciadas que se

tornam indiferenciadas (de-diferenciação), além disso já demonstraram que elas possuem plasticidade fenotípica entre os estados diferenciados e não-diferenciados, contribuindo para a heterogeneidade tumoral (HERREROS-VILLANUEVA *et al.*, 2013; CABRERA; HOLLINGSWORTH; HURT, 2015). Essas células já mostraram intervir na resistência à quimioterapia e à radioterapia possuindo resistência natural e maior adaptabilidade aos insultos externos, além de estarem fortemente relacionadas a recidiva e a formação de metástases, principalmente, pela capacidade proliferativa persistente para gerar macrotumores a partir de um pequeno número de células (SHIOZAWA *et al.*, 2016; PEITZSCH *et al.*, 2017).

Os CAFs são encontrados sob diferentes aspectos dentro do estroma tumoral e pelo menos dois tipos podem ser claramente descritos, um constituído por células semelhantes aos fibroblastos normais que formam a base estrutural do estroma, e outro, os miofibroblastos, que possuem alta expressão de α -SMA (actina do músculo liso α) e são raros em tecidos epiteliais saudáveis (DENTON; ROBERTS; FEARON, 2018). O envolvimento desses subtipos de CAFs tem se mostrado crítico no remodelamento da MEC, na promoção do crescimento tumoral e da angiogênese, além de influenciar diretamente no prognóstico de certos tipos tumorais (RÄSÄNEN; VAHERI, 2010; BRECHBUHL *et al.*, 2017).

Além dessa complexidade de tipos celulares que formam o microambiente tumoral, outras contribuições são necessárias para se estabelecer a heterogeneidade observada nos tumores. É esperado que as próprias células cancerígenas, após várias replicações e eventos mutacionais, criem subpopulações com características fenotípicas distintas que tornam as células mais adeptas a alterações do ambiente, estando essa característica relacionada a letalidade do câncer e ao obstáculo na busca de uma cura efetiva (MCGRANAHAN; SWANTON, 2017; DAGOGO-JACK; SHAW, 2018). A heterogeneidade tumoral não está restrita as diferentes células e tecidos do organismo, podendo ser visualizada entre indivíduos com o mesmo tipo de tumor (heterogeneidade intertumoral) e mesmo dentro de um tumor pode ser observada diversidade entre os subclones celulares (heterogeneidade intratumoral), característica que é exacerbada pela instabilidade genômica (figura 1.3) (BURRELL *et al.*, 2013).

Figura 1.3 – Heterogeneidade tumoral

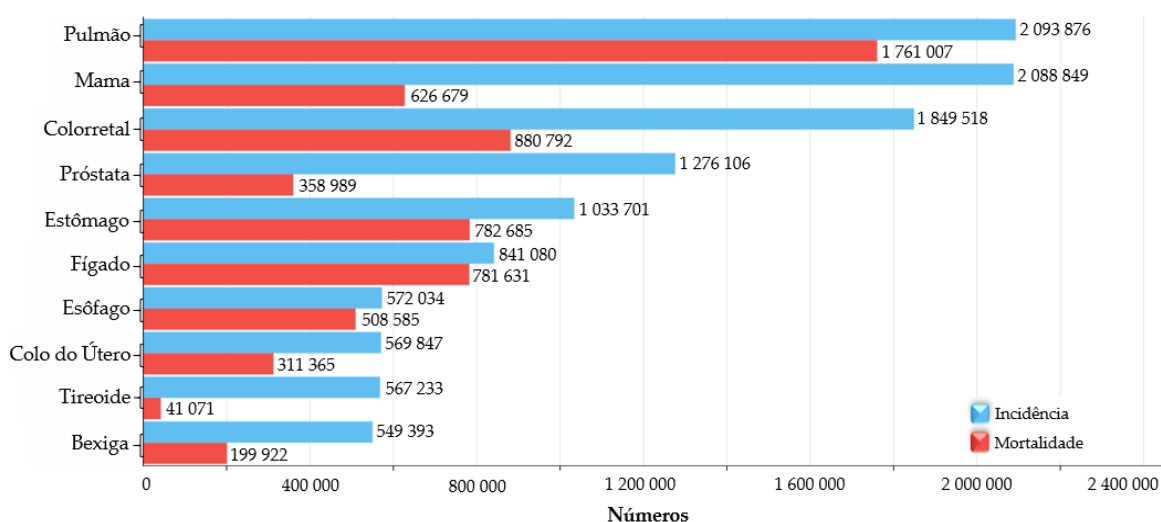


Representação da heterogeneidade encontrada nos tumores, tanto entre os indivíduos (intertumoral) quanto entre as próprias células de um único tumor (intratumoral), representada pelos subclones celulares. **Fonte:** Adaptada de BURRELL *et al.*, 2013.

1.1.2 Epidemiologia do Câncer

O câncer é uma das principais causas de óbito no mundo, dados da *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN) (figura 1.4) estimam que ele foi responsável por cerca de 9,5 milhões de mortes em 2018, sendo pulmão a principal delas (18,4%) e colorretal a segunda (9,2%). Ainda, foi estimado que tenham surgido mais de 18 milhões de novos casos nesse período e os tecidos primários mais incidentes tenham sido pulmão (11,6%), mama (11,6%), colorretal (10,2%), próstata (7,1%) e estômago (5,7%).

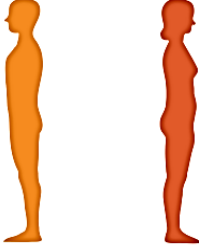
Figura 1.4 – Estimativa de novos casos e de mortes por câncer no mundo



Estimativa de câncer a respeito do número de novos casos (barra azul) e do número de mortes (barra vermelha), englobando ambos os sexos e todas as idades, no mundo no ano de 2018. **Fonte:** Adaptada de GLOBOCAN, 2018.

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) publica dados estimados de incidência de câncer no Brasil a cada biênio; e, para cada ano do biênio 2018/2019 foi estimado 583 mil novos casos de câncer, sendo 68.220 casos de câncer de próstata (CaP), com risco estimado de 66,12/100 mil homens, e 59.700 casos de câncer de mama, com risco estimado de 56,33/100 mil mulheres, fazendo com que esses sejam os tipos mais incidentes em homens e mulheres, respectivamente, com exceção do câncer de pele não melanoma (figura 1.5).

Figura 1.5 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
			Homens	Mulheres			
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Estimativa de novos casos de câncer no Brasil para cada ano do biênio 2018/2019, com exceção do câncer de pele não melanoma. **Fonte:** INCA, 2018.

Por esses números alarmantes, o câncer é um dos maiores problemas de saúde pública da atualidade, causando grande impacto econômico para os familiares e para o sistema de saúde devido aos custos relacionados ao diagnóstico e tratamento. Além disso, quando avaliado o impacto gerado pelos óbitos prematuros de pessoas economicamente ativas (entre 15 e 65 anos), há uma perda de produtividade anual equivalente a 15 bilhões de reais no Brasil, número que tende a crescer caso não haja mudanças dramáticas no estilo de vida da população (CANCELA; ALMEIDA, 2018).

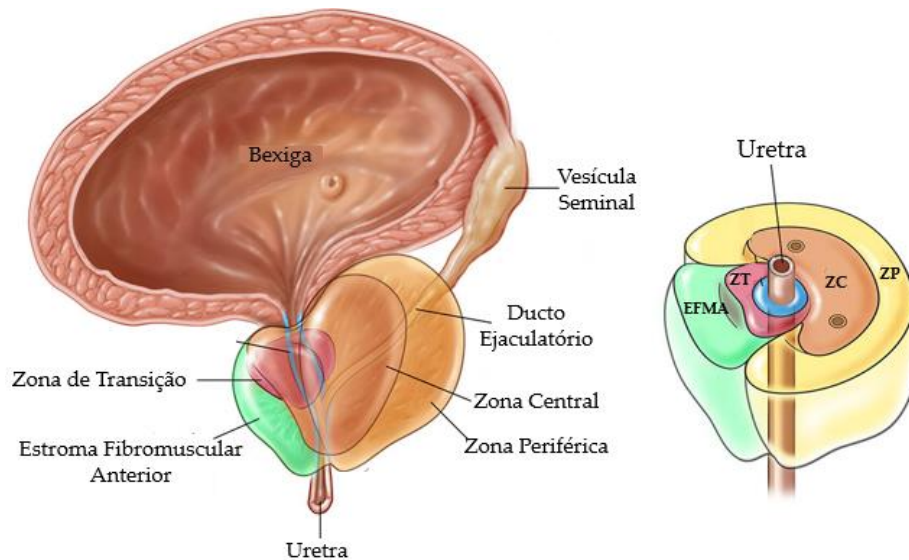
1.2 Fisiopatologias da Próstata

1.2.1 Próstata

A próstata é uma glândula exócrina masculina que pesa aproximadamente 20g e mede cerca de 4 cm de comprimento por 4–5 cm de largura. Está localizada na cavidade pélvica, mais precisamente na base da bexiga urinária e é atravessada em toda sua extensão pela uretra (figura 1.6) (UMBREIT; SHIMKO; GETTMAN, 2011). Ela não é essencial para a vida, mas tem importante papel na reprodução, já que produz secreções que se unem às das vesículas seminais para formar o líquido seminal, que auxilia na nutrição e na sobrevivência dos espermatozoides (VERZE; CAI; LORENZETTI, 2016).

Anatomicamente, a próstata é dividida em quatro distintas regiões (figura 1.6) como descrito por John McNeal (1988). A zona central (ZC) representa cerca de 25% da glândula e nela se originam grande parte dos processos inflamatórios e aproximadamente 5–10% das neoplasias; a zona periférica (ZP) corresponde a 70% da próstata, aqui encontram-se a maior parte das glândulas prostáticas e, mais frequentemente, é o local de origem da neoplasia intraepitelial prostática (PIN) e dos adenocarcinomas da próstata; a zona de transição (ZT) rodeia a uretra prostática e corresponde a cerca de 5% da próstata, além de ser a região de desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna (HPB); por fim, o estroma fibromuscular anterior (EFMA) que corresponde ao principal tecido não glandular da próstata e é composto por músculo liso e tecido fibroso (SELMAN, 2011; UMBREIT; SHIMKO; GETTMAN, 2011; YACOUB; OTO, 2018).

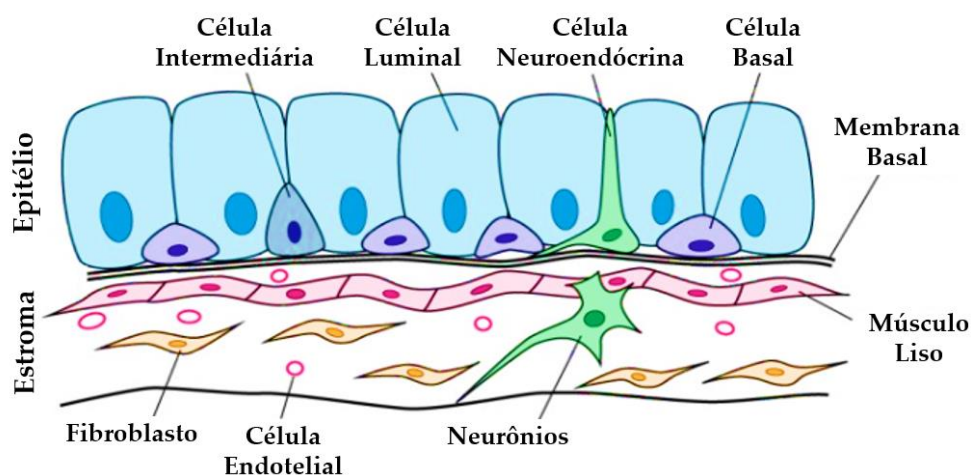
Figura 1.6 – Disposição anatômica da próstata e suas zonas



Esquema da localização anatômica da próstata: logo abaixo da bexiga e recobrimdo a uretra; além da representação das quatro zonas da próstata. **ZC:** zona central; **ZP:** zona periférica; **ZT:** zona de transição; **EFMA:** estroma fibromuscular anterior. **Fonte:** Adaptada de www.urologyhealth.org.

Analisando a histologia da próstata é visível a presença de pelo menos duas estruturas básicas, o epitélio glandular e o estroma (figura 1.7) (OMABE; EZEANI, 2011; ITTMANN, 2017; TOIVANEN; SHEN, 2017). O componente glandular da próstata é formado por células luminiais, basais e neuroendócrinas que se organizam para compor os ductos e os ácinos. As células luminiais apresentam formato colunar, com citoplasma eosinofílico e núcleo redondo, e elas são especializadas em secretar uma variedade de produtos no lúmen como o antígeno específico da próstata (PSA), o zinco, o ácido cítrico, a fosfatase ácida, além de expressar as citoqueratinas (CK) 8 e 18. As basais se apresentam com núcleo ovoide e citoplasma imperceptível, elas expressam altas quantidades de CK5, CK14 e p63 e estão intercaladas entre a membrana basal e as células secretoras. As células neuroendócrinas possuem alta expressão de cromogranina e sinafosina e estão localizadas na camada de células basais. O estroma prostático é fibromuscular composto por fibroblastos, células dendríticas, endoteliais, imunes e neuronais, além de feixes de células musculares lisas com alta capacidade contrátil para expelir as secreções produzidas pelos ácinos.

Figura 1.7 – Histologia da próstata



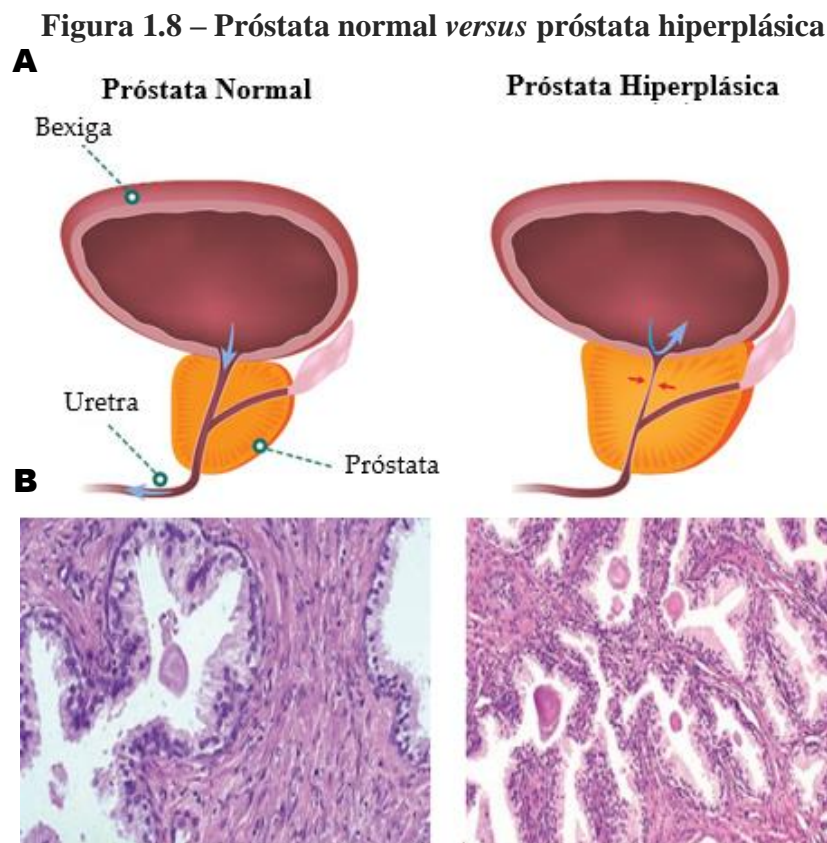
Representação esquemática das células da próstata, mostrando o componente epitelial glandular (células luminiais, basais e neuroendócrinas) e o estromal (fibroblastos, células musculares, endoteliais e neuronais). **Fonte:** Adaptada de TOIVANEN; SHEN, 2017.

O desenvolvimento prostático é controlado sob ação hormonal dos androgênios, como a testosterona e a androstenediona, que são responsáveis pelos processos de morfogênese, citodiferenciação, proliferação e produção de secreções específicas da próstata (NIU *et al.*, 2010; WALTERS; SIMANAINEN; HANDELSMAN, 2010). A testosterona é sintetizada nas células de Leydig nos testículos por estímulo do hormônio luteinizante da hipófise, ela entra nas células prostáticas por difusão simples e é rapidamente metabolizada pela enzima 5-alfa redutase, que a converte irreversivelmente em um subproduto mais ativo, a di-hidrotestosterona (DHT) (WILSON, 2001; HEINLEIN; CHANG, 2002). A DHT se liga aos receptores de androgênio (AR) que estão no citoplasma das células prostáticas e então, ocorre fosforilação, dimerização e translocação do complexo para o núcleo. O complexo DHT-AR promove a transcrição de genes que contenham elementos responsivos aos androgênios (AREs) e eles possuem diversas funções no desenvolvimento e manutenção da glândula (GROSSE; BARTSCH; BANIAHMAD, 2012). Além da participação fisiológica, o DHT-AR também atua em eventos associados ao câncer e a HPB, sendo muitas vezes utilizado na intervenção clínica baseada na terapia de privação de andrógenos com a finalidade de impedir o crescimento celular (CARSON; RITTMASER, 2003; ZHOU; BOLTON; JONES, 2015; CAFFO *et al.*, 2016).

1.2.2 Hiperplasia Prostática Benigna

A HPB é a doença geniturinária mais comum na população masculina idosa, afetando mais de 50% dos indivíduos com 50 anos e aumentando a incidência à medida que os homens envelhecem, além disso a idade entre 70 e 79 anos é a que possui maior prevalência entre eles (SKINDER *et al.*, 2016).

A condição patológica da HPB é caracterizada pelo crescimento não-maligno das células prostáticas, particularmente das que compõem a zona de transição (figura 1.8) (CHUGHTAI *et al.*, 2016). Fisiologicamente, a próstata aumenta com o decorrer da idade e chega ao ápice de desenvolvimento aos 18–20 anos de idade. No entanto, por mecanismos ainda não bem estabelecidos, o envelhecimento, a ativação tardia do crescimento celular, os fatores genéticos e as alterações hormonais levam a próstata a tomar proporções cada vez maiores causando uma série de sintomas que podem ser altamente debilitantes (HO; HABIB, 2011; SKINDER *et al.*, 2016).



Diferenças entre a próstata normal e a hiperplásica. **A:** disposição anatômica da próstata com compressão da uretra e retenção de urina na bexiga no quadro hiperplásico. **B:** lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina, com a HPB exibindo tipicamente pleomorfismo considerável em termos de razão estroma/epitelial. **Fonte:** Adaptada de CHUGHTAI *et al.*, 2016.

A clínica da HPB apresenta-se com sintomas do trato urinário inferior (LUTS) em consequência a compressão/obstrução da uretra prostática. Eles compreendem em sintomas relacionados ao armazenamento (polaciúria, poliúria, noctúria e urgência/incontinência urinária), ao esvaziamento (fluxo urinário fraco/interrompido, hesitação, esforço miccional) e ao pós-miccional (sensação de esvaziamento incompleto e gotejamento) (ROEHRBORN, 2011). Na avaliação inicial recomenda-se utilizar o score de sintomas, o I-PSS (Score Internacional de Sintomas Prostáticos), para avaliar o seguimento e o manejo do paciente (BARRY *et al.*, 1992). Além da presença dos sintomas característicos, os exames mais indicados para poder concluir o diagnóstico incluem a avaliação sérica do PSA, que se apresenta elevado nos casos de HPB, o exame retal digital (DRE)/toque retal e a ultrassonografia transretal (TRUS) que são realizados para avaliar o tamanho da próstata e a presença de nódulos, endurecimento ou assimetria prostática (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2017).

Dependendo da apresentação clínica e do impacto sob a qualidade de vida do paciente, pode ser indicada a vigilância ativa, o tratamento farmacológico com o uso de bloqueadores alfa-adrenérgicos (terazosin, doxazosina), inibidores da 5-alfa redutase (finasterida, dutasterida), inibidores da fosfodiesterase tipo 5 (tadalafil) e/ou anticolinérgicos (darifenacin), e em casos mais graves o tratamento cirúrgico (DHINGRA; BHAGWAT, 2011; KIM; LARSON; ANDRIOLE, 2016).

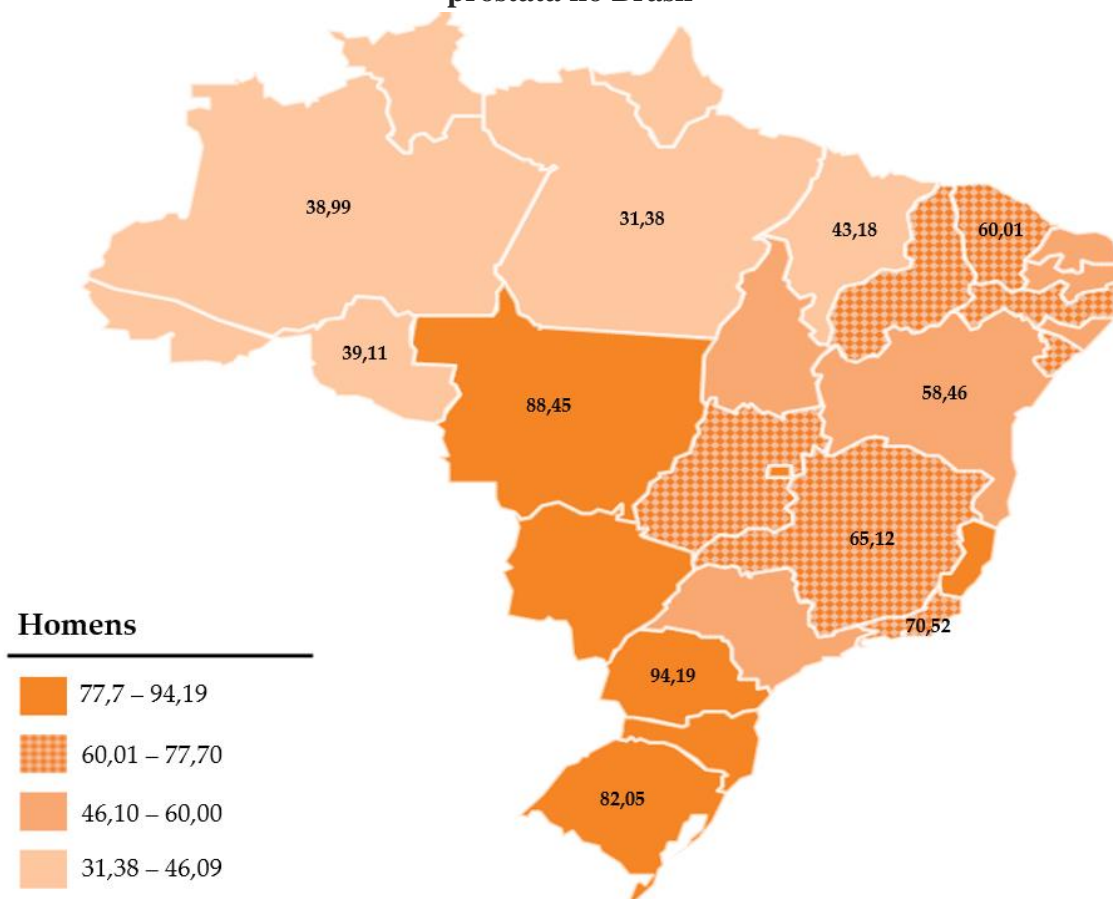
A HPB e o câncer de próstata (CaP) estão entre as doenças mais comuns da próstata e juntas representam encargos significativos para os pacientes e sistemas de saúde. Elas compartilham características como crescimento dependente de hormônios e resposta à terapia antiandrogênica, contudo a relação entre elas ainda não é compreendida, visto que não está claro se a associação entre as patologias reflete uma ligação casual, se a HPB atua apenas como fator de risco ou mesmo se elas possuem mecanismos fisiopatológicos compartilhados (ØRSTED; BOJESSEN, 2012; BANERJEE *et al.*, 2018). Ainda, alguns estudos sugeriram que a condição genética, hormonal e inflamatória dos indivíduos com HPB podem se apresentar como fatores de suscetibilidade para o desenvolvimento do CaP (ALCARAZ *et al.*, 2009; SCHENK *et al.*, 2011).

1.2.3 Câncer de Próstata

O CaP é o quarto tipo de tumor mais incidente no mundo (considerando ambos os sexos) e o segundo mais diagnosticado entre os homens, atingindo 1.276.106

(13,5%) deles (demonstrado anteriormente na figura 1.4) (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, as estimativas para ano de 2018 de CaP foram de 68.220 novos casos, nos quais os maiores índices encontram-se nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste do país (figura 1.9) (INCA, 2018).

Figura 1.9 – Representação geográfica das taxas brutas de incidência de câncer de próstata no Brasil

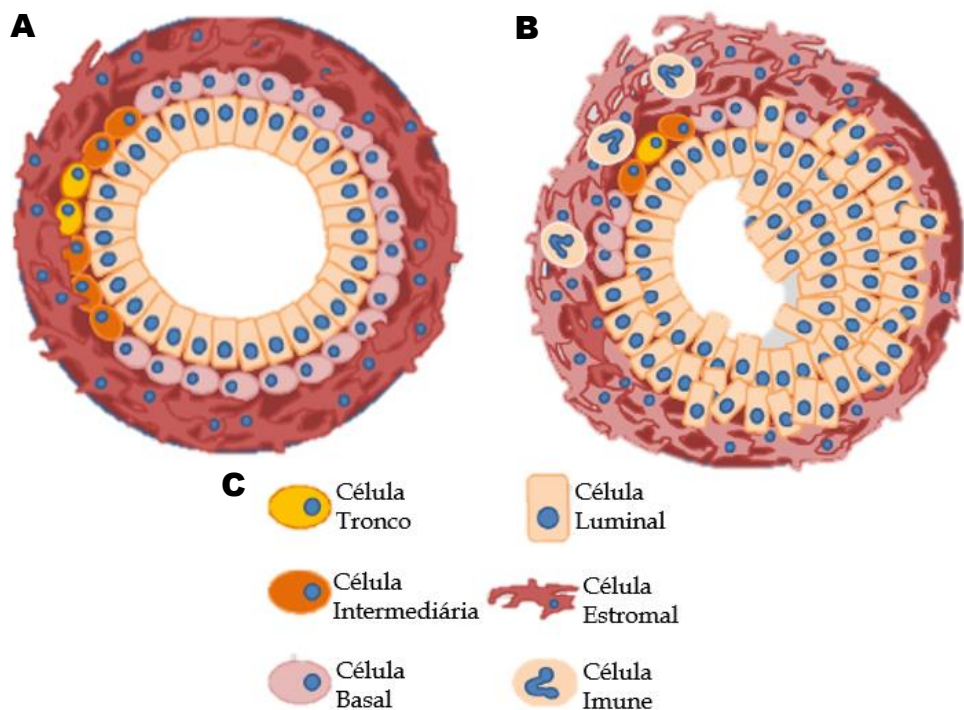


Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação. Os valores representam as taxas de incidências de alguns estados do Brasil como o Paraná, com a maior taxa, de 94,19/100mil, o Pará, com a menor, de 31,38/100mil e o Rio de Janeiro com 70,52/100mil. **Fonte:** Adaptada de INCA, 2018.

Quando analisada as taxas de mortalidade global do CaP, percebe-se o número alarmante totalizando 358.989 mortes, sendo 44% desse total representando por apenas 7 países. Dentre eles destacam-se a China, com a maior taxa de óbitos (51.895; 14,5%), e o Brasil com a quarta posição (16.730 mortes; 4,7%) (GLOBOCAN, 2018). Pelos dados do Ministério da Saúde (2019), no Brasil, o CaP é a segunda causa de mortes por câncer da população masculina (13%), sendo superado apenas do câncer de pulmão (14%).

Em síntese, o CaP apresenta-se com lesões multicêntricas em diferentes graus e regiões do tecido prostático, acometendo sobretudo a zona periférica da próstata. A arquitetura neoplásica (figura 1.10) é caracterizada pela presença de glândulas pequenas infiltrativas ou cribriformes muito grandes ou irregulares, atipia nuclear (aumento nuclear e nucleolar), hiperproliferação de células luminais, ruptura da membrana basal, ausência de células basais, além de infiltração de CAFs e de células imunes pró-tumorigênicas como mastócitos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos T regulatórios (PACKER; MAITLAND, 2016; SHIAO; CHU; CHUNG, 2016).

Figura 1.10 – Composição celular do ácino prostático normal e do tumoral



A: representação esquemática de um ácino prostático normal, apresentando a bicamada epitelial (células basais e luminais) cercada pelo estroma fibromuscular, aqui a proporção celular corresponde a 60% (luminal), 40% (basal) e 1% (célula tronco); **B:** no ácino tumoral toda a arquitetura morfológica apresenta-se alterada com perda da camada basal, a composição celular é de 99% de células luminais e 1% basais; **C:** a representação utilizada para diferenciar as células da próstata. **Fonte:** Adaptada de PACKER; MAITLAND, 2016.

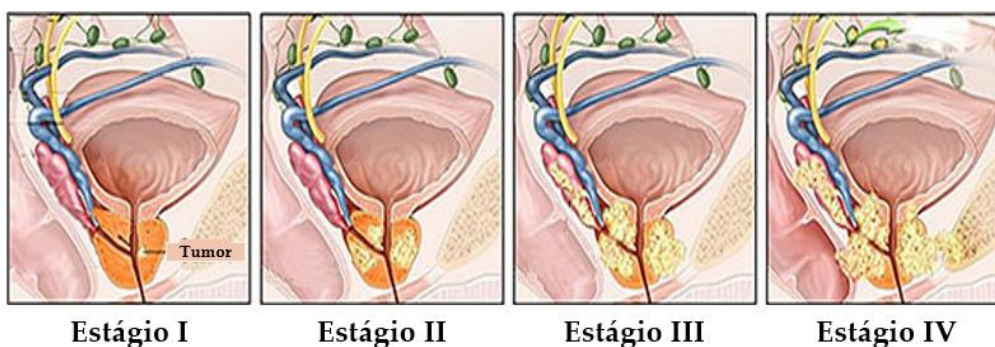
Nos estágios iniciais do CaP, as taxas de sobrevida a longo prazo são altas, superiores a 90%, contudo, nessa fase a evolução é silenciosa, muitas vezes sem que o doente apresente nenhum sintoma (HOWLADER *et al.*, 2016). Entretanto, quando o câncer se encontra em fase avançada as chances de sobrevida são inferiores a 20% e os sintomas vão desde dor aguda ao urinar e insuficiência renal, a outras manifestações como a presença de dores ósseas que são decorrentes dos processos metastáticos

(GUNDEM *et al.*, 2015). Ao invadir tecidos distantes por meio da circulação linfática e/ou sanguínea (metástase), o CaP apresenta-se incurável, mesmo após terapia multimodal intensiva, sendo responsável por grande parte das mortes relacionadas ao câncer (WANG *et al.*, 2018). A letalidade da doença metastática é provocada pela falta de esquemas terapêuticos capazes de gerar respostas duráveis no cenário de extrema heterogeneidade tumoral tanto no nível genético quanto celular (WEI *et al.*, 2017).

Além da apresentação mais agressiva do CaP, foi descrito um estágio intermediário, chamado de CaP oligometastático que se apresenta entre a doença localizada e as metástases generalizadas (polimetastático), em que o doente apresenta até cinco lesões extrapélvicas e, ao contrário da polimetastática, o indivíduo pode se beneficiar do tratamento direcionado as metástases (TOSOIAN *et al.*, 2017).

O CaP é categorizado em distintos estágios de acordo com a região que está acometida, podendo ser complementado pelas avaliações do sistema TNM (que avalia a progressão tumoral ao nível do tumor primário, dos linfonodos e das metástases), do nível de PSA e do grau histológico (BUYOUNOUSKI *et al.*, 2017). Os estágios são basicamente definidos em (figura 1.11): estágio I, em que o tumor é encontrado ao acaso, visto que é pequeno e não pode ser sentido no exame de DRE; estágio II, o tumor é encontrado devido à presença de um nódulo na próstata, porém encontra-se confinado a ela, sendo dividido em três subestágios (IIA, IIB e IIC) de acordo com o tamanho e o grau de diferenciação das células; estágio III, o tumor é localmente avançado infiltrando tecidos ao redor da próstata, como: vesícula seminal (IIIA), reto (IIIB) e bexiga (IIIC); por último, o estágio IV em que o câncer se espalhou para os linfonodos regionais (IVA) ou para os ossos e/ou outros órgãos (IVB) (AMIN *et al.*, 2017).

Figura 1.11 – Estágios do CaP



Representação dos diferentes estágios do CaP. **Fonte:** Adaptada de www.teresewinslow.com.

1.2.3.1 Classificação do Câncer de Próstata

Com relação a classificação histológica, a Organização Mundial da Saúde (OMS) distingue os tumores prostáticos principalmente em: adenocarcinoma acinar, adenocarcinoma ductal, carcinoma intraductal, carcinoma urotelial, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basais e tumores neuroendócrinos (HUMPHREY *et al.*, 2016). Dentre esses, os adenocarcinomas são os tipos mais frequentes, estando presente em 95% dos casos de CaP.

Nos últimos anos, foi observada uma notável expansão no conhecimento sobre a genética do CaP, na qual os avanços tecnológicos e científicos permitiram a identificação de rearranjos cromossômicos complexos e a acentuada heterogeneidade molecular dos tumores de próstata (BARBIERI *et al.*, 2013; BARBIERI; RUBIN, 2015; ROBINSON *et al.*, 2015). Contudo, mesmo com essa característica heterogênea, algumas alterações são altamente recorrentes, permitindo a realização da classificação molecular dos tumores de próstata dependente do estágio clínico da doença (por exemplo tumor primário, CaP metastático e CaP resistente a castração) (ARORA; BARBIERI, 2018). Essa categorização define entidades biológicas distintas e é embasada pela presença de aberrações cromossômicas, diferença no nível de expressão gênica, alterações no número de cópias do DNA e alterações epigenéticas.

A maioria dos tumores primários de próstata se enquadram em pelo menos um dos sete subtipos moleculares definidos pelas fusões gênicas em *ERG*, *ETV1*, *ETV4* e *FLII* ou por mutações pontuais nos genes *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* (BERGER *et al.*, 2011; THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2015). Os genes *ERG*, *ETV1*, *ETV4* e *FLII* pertencem a família de fatores de transcrição *ETS* e desempenham papéis no desenvolvimento, diferenciação, proliferação e migração das células prostáticas (SHAIKHIBRAHIM; WERNERT, 2012). As fusões gênicas mais encontradas com relação aos *ETS* são entre os promotores regulados por androgênios e o *ERG*, sendo a *TMPRSS2-ERG* a primeira fusão descrita nos tumores sólidos e a mais comum delas, presente em aproximadamente 50% dos tumores prostáticos (WANG *et al.*, 2017).

Os genes associados aos subtipos moleculares têm distintas atuações na fisiologia normal da próstata, como o *SPOP* que atua na degradação de proteínas, o *FOXA1* que remodela a cromatina para fornecer acesso genômico para ligação do AR e o *IDH1* que codifica um enzima metabólica citoplasmática envolvida na conversão de isocitrato em 2-oxoglutarato, dessa forma alterações nesses genes estão relacionadas a

perda da estabilidade genômica, promoção do crescimento celular e angiogênese (GAO *et al.*, 2003; GENG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2018).

Apesar dessa categorização ainda não estar incorporada nas diretrizes da OMS, diversos trabalhos já mostraram a importância dessa classificação molecular, correlacionando alguns subtipos, como a fusão *TMPRSS2-ERG*, com formas mais agressivas do CaP, com maior risco de desenvolvimento de metástases e até com uma melhor resposta a certas terapias. Nesse contexto, no futuro, essa classificação dos pacientes pode auxiliar na identificação dos pacientes com formas indolentes da doença e dos que possuem maior risco de recorrência (WANG *et al.*, 2006; RAJPUT *et al.*, 2007).

1.2.3.2 Rastreamento e Diagnóstico

A realização periódica dos exames combinados de PSA e de toque retal em pessoas sem sinais ou sintomas (rastreamento), é preconizado para homens a partir dos 50 anos ou a partir dos 45, para os casos em que há fortes fatores de risco associados, familiares de primeiro grau com CaP ou homens afrodescendentes (DUNN, 2017). Esse acompanhamento tem o intuito de diagnosticar precocemente o CaP, o que é fundamental para a definição da conduta terapêutica, melhor prognóstico e chance de cura, além de diminuir a morbidade causada pela doença (BARRY; SIMMONS, 2017).

A recomendação feita pelas agências de saúde determina que o diagnóstico do CaP deve ser realizado através da avaliação sérica do PSA, DRE e biópsia transretal por agulha, sendo esta última a única capaz de diagnosticar definitivamente o CaP (MOTTET *et al.*, 2017). Todavia, exames complementares podem ser realizados para auxiliar na avaliação do estágio da doença como os exames de imagem (ultrassonografia, PET-CT com PSMA e ressonância magnética multiparamétrica) que são rotineiramente usados, além dos biomarcadores de próxima geração (antígeno do câncer de próstata 3 – *PCA3*, fusão *TMPRSS2-ETS* e *PTEN*) e dos testes de painéis gênicos que podem ser utilizados, mais ainda não estão totalmente estabelecidos (PRENSNER *et al.*, 2012; KOO *et al.*, 2019).

É importante salientar que o PSA é uma proteína produzida preferencialmente pelas células prostáticas, mas não é específica do CaP, podendo ser encontrada alterações inespecíficas em seu nível sérico, que são causadas por tratamentos farmacológicos, manipulações urológicas via uretral e até pela HPB, sendo necessário a avaliação conjunta de outras metodologias para o diagnóstico final (ITO *et al.*, 2003;

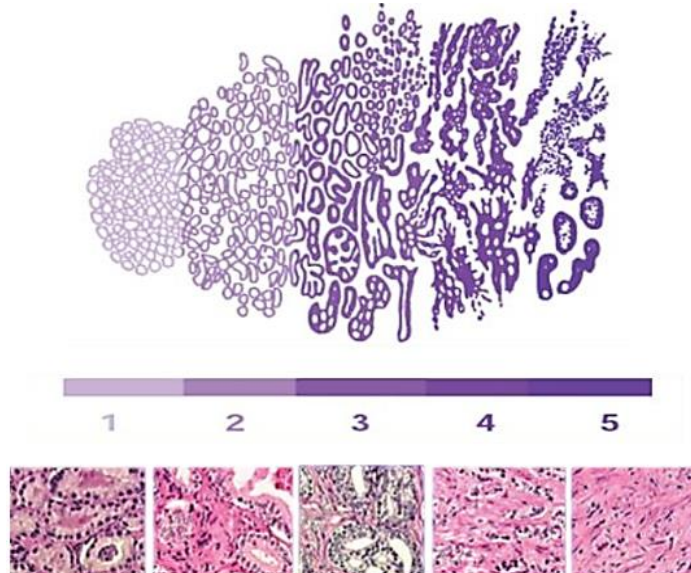
PARK *et al.*, 2015). Além disso, o PSA pode ser dividido em três categorias de risco, pacientes com PSA menor que 4 ng/mL, que possuem baixo risco, mas que não pode ser excluída a possibilidade de CaP; com PSA entre 4 e 10 ng/mL, uma faixa limítrofe em que há chance de pelo menos 1 a 4 indivíduos ter CaP e com PSA maior que 10 ng/mL, em que o risco de CaP é superior aos 50% (ILIC *et al.*, 2018).

Os testes de painéis gênicos têm o objetivo de prever a progressão clínica e a mortalidade pelo CaP, analisando, a partir de amostras de biópsia por agulha, a expressão de genes relacionados a vias fundamentais para o desenvolvimento tumoral (KNEZEVIC *et al.*, 2013; KLEIN *et al.*, 2014; SOMMARIVA *et al.*, 2016; CUCCHIARA *et al.*, 2018). Existem diversos testes no mercado, com distintas metodologias e peculiaridades, mas os principais e mais utilizados são o Prolaris® (*Myriad Genetics*), o Oncotype DX® (*Fleury Genômica*) e o Decipher® (*GenomeDx Bioscience*) (MOHLER *et al.*, 2019). Mesmo com todos os testes apresentando resultados satisfatórios na previsão do prognóstico dos pacientes, ainda são necessárias pesquisas para melhorar a compreensão sobre o significado clínico das alterações observadas nos testes.

Através da biópsia é avaliado o tipo histológico e o estadiamento do CaP, sendo o score de Gleason o sistema de graduação preconizado pelos patologistas, em que se analisa o padrão arquitetônico das glândulas prostáticas e o grau de diferenciação das células (DELAHUNT *et al.*, 2012). Existem 5 graus, numerados de 1 a 5, que são usados para definir o nível de diferenciação dos dois padrões morfológicos mais predominantes na amostra. Os valores desses padrões são somados para resultar no score de Gleason que varia de 2 a 10, sendo 2 definido como um tumor bem diferenciado, e o score de Gleason 10, um tumor pouco diferenciado, que se afasta completamente do padrão histológico normal (figura 1.12) (HUMPHREY *et al.*, 2016). Além disso, o score de Gleason é utilizado para auxiliar na avaliação do prognóstico dos pacientes com CaP, em que os indivíduos que possuem score abaixo de 6 apresentam um tipo mais indolente de CaP, com bom prognóstico, boas chances de cura e baixo potencial metastático, enquanto os que apresentam score acima de 8 têm tumor mais agressivo, com prognóstico ruim e altíssimo potencial metastático. Ainda, há uma imprecisão a respeito do prognóstico dos indivíduos com score 7, não possuindo uma boa caracterização entre o score 7 (3+4) e o 7 (4+3), pois se comportam de forma diferente, as vezes tendendo a um melhor ou pior prognóstico, por isso muito estudos se

comprometem em tentar melhorar a diferenciação dessas duas graduações (HUMPHREY *et al.*, 2016).

Figura 1.12 – Classificação do câncer de próstata através score de Gleason



Representação dos graus de diferenciação usados para calcular o score de Gleason, levando em conta a morfologia/arquitetura tecidual e diferenciação tumoral. De 1 a 5 imagens histológicas representativas de cada grau histológico. **Fonte:** HARNDEN *et al.*, 2007.

1.2.3.3 Tratamento

Para a escolha do tratamento deve ser avaliada a qualidade de vida do indivíduo em contraponto aos efeitos secundários das terapias. Assim, as características do tumor a tratar, a expectativa de vida do doente e o estado geral de saúde devem ser cuidadosamente valorizadas, bem como as diferentes opções de tratamento que terão por finalidade promover efeito paliativo, cura e/ou impedir a recorrência da doença (CORNFORD *et al.*, 2017). De forma geral, os procedimentos que existem para tratar o CaP englobam a imunoterapia (sipuleucel-T), hormonioterapia (abiraterona, enzalutamida), quimioterapia (docetaxel, cabazitaxel), radioterapia e as cirurgias para a remoção da glândula (prostatectomia) ou dos focos tumorais (JAMES *et al.*, 2016; JANICZEK *et al.*, 2017; HANDY; ANTONARAKIS, 2018; RAGHAVAN, 2018). Vale ressaltar que todos os tratamentos descritos até hoje apresentam efeito mais satisfatório quando o diagnóstico é precoce, afirmando a necessidade do acompanhamento recorrente do estado de saúde.

1.2.4 Fatores de Risco

Devido ao caráter complexo das patologias prostáticas, uma série de fatores endógenos e exógenos atuam aumentando o risco para o desenvolvimento delas. A respeito dos fatores exógenos, vários estudos sugerem que a obesidade, o fumo, a hipertensão, os níveis hormonais e as dietas hipercalóricas, ricas em gorduras e pobres em fibras, frutas e vegetais aumentam o risco de desenvolvimento de HPB e CaP, além de atuarem no envelhecimento e na resistência à quimioterapia (PERDANA *et al.*, 2016; ZITVOGEL; PIETROCOLA; KROEMER, 2017). A idade é um dos principais fatores de risco associados a HPB e ao CaP, à medida que com o envelhecimento o risco de desenvolver qualquer uma das doenças aumenta exponencialmente, sendo 66 anos a idade média de diagnóstico delas (HOWLADER *et al.*, 2016). Com relação a etnia, pode-se destacar a maior tendência dos homens afrodescendentes a desenvolverem o CaP, bem como evoluírem para tumores mais agressivos e apresentarem maiores taxas de mortalidade (HSING *et al.*, 2014; REBBECK, 2017). Outro risco bem estabelecido é o histórico familiar da doença, no qual foi demonstrado que se um parente de primeiro grau tem a doença, o risco é, no mínimo, duas vezes maior do indivíduo ter CaP e nos casos em que dois ou mais indivíduos da mesma família sejam afetados, o risco aumenta de cinco a onze vezes em comparação a população em geral (MACINNIS *et al.*, 2010; EELES *et al.*, 2014; TELANG *et al.*, 2017).

A predisposição genética pode resultar de mutações raras altamente penetrantes ou de variantes genéticas que conferem menor risco, a exemplo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) que em conjunto têm importante participação na etiologia das doenças ou ainda, a predisposição pode ser devido a uma combinação dos dois tipos de alteração (MONTGOMERY *et al.*, 2018). O CaP hereditário, ou seja, aquele com forte fator genético envolvido, compreende quase 10% dos casos de CaP, sendo associado a outras síndromes hereditárias como o câncer de mama masculino e a síndrome de Lynch (CASTRO *et al.*, 2013; HARALDSDOTTIR *et al.*, 2014).

Os estudos de associação ampla do genoma (GWAS), estudos com gêmeos e estudos epidemiológicos têm identificado diversas alterações genéticas relacionadas ao desenvolvimento do CaP e ao aumento de suscetibilidade da doença como os SNPs em *HOXB13* e as mutações em genes de reparo do DNA como *BRCA1/2*, *ATM* e *CHEK2* (PRITCHARD *et al.*, 2016; BENAFIF *et al.*, 2018; SCHUMACHER *et al.*, 2018). Porém, mesmo com esses avanços ainda se está longe de caracterizar e entender toda a complexidade fisiopatológica e genética do CaP, sendo sempre necessário buscar novos

conhecimentos sobre esta temática. Na HPB, os avanços a respeito da participação da composição genética ainda estão mais distantes da compreensão, visto que poucos são os investimentos sobre a participação genética nessa patologia.

1.3 Genes Candidatos

Com o intuito de melhorar a compreensão acerca da participação dos fatores genéticos sobre as patologias prostáticas, foi utilizado a ferramenta de busca *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) e os bancos de dados *online GeneCards* (<http://genecards.org/>) e *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>) para selecionar genes candidatos que atuem em vias biológicas relevantes para o desenvolvimento da HPB e do CaP e que já tenham sido descritos polimorfismos associados ao aumento do risco das doenças prostáticas. Além disso, de cada gene foi selecionado um polimorfismo que apresenta relações interessantes com as patologias em outras populações, mas que ainda não há estudos que mostrem o comportamento delas na população do Rio de Janeiro. Todos os genes e polimorfismos selecionados estão descritos com mais detalhe abaixo.

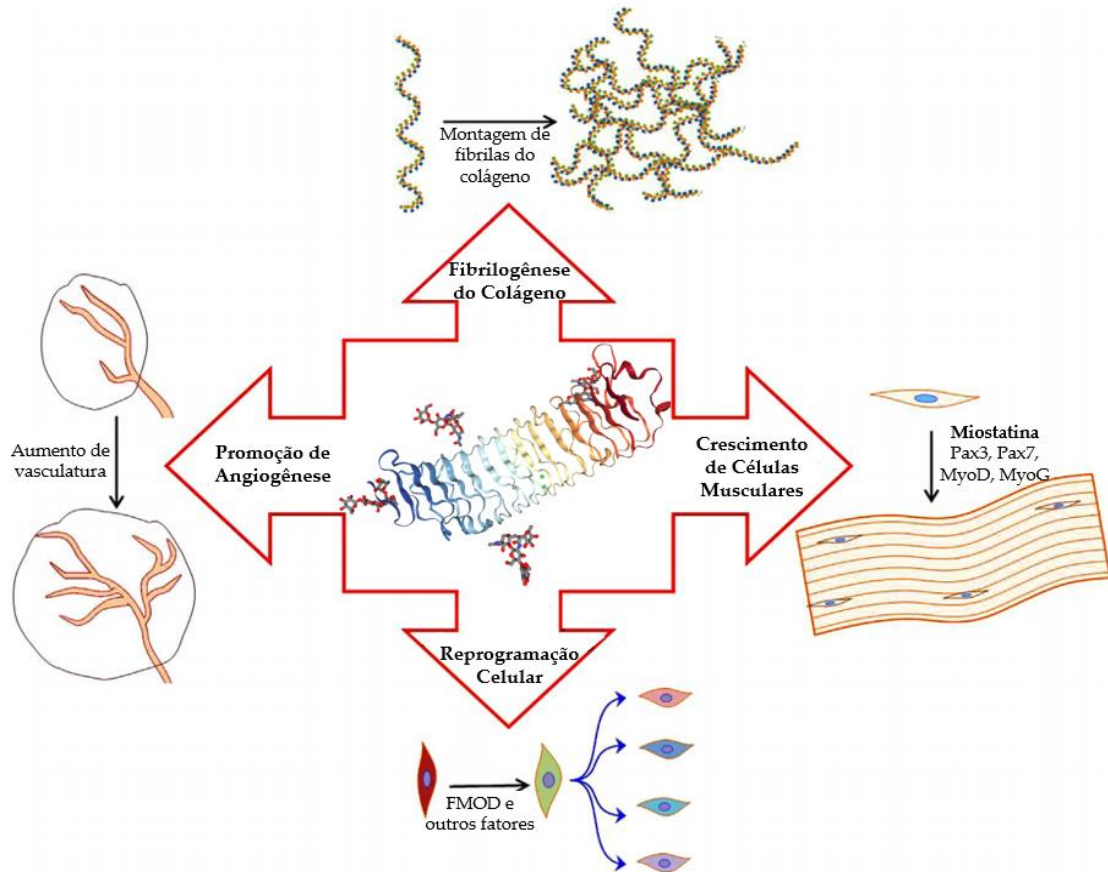
1.3.1 Gene *FMOD*

O gene fibromodulina (*FMOD*), localizado no cromossomo 1q32.1, possui três exons com 2943 pares de base (pb) e codifica uma proteína de mesmo nome (*FMOD*) com 376 aminoácidos (aa) (ENSEMBL). Ela é expressa em todos os tecidos, sendo encontrada em concentrações maiores nos tecidos conjuntivos e é constituinte importante da MEC de mamíferos (LEE; SCHIEMANN, 2011).

A *FMOD* é um pequeno proteoglicano rico em leucina (SLRP – *small leucine-rich proteoglycan*) que regula diversos processos fisiológicos (figura 1.13) como a fibrilogênese do colágeno, a organização da MEC afetando rotatividade celular e a própria composição da MEC, o reparo tecidual em múltiplos órgãos, o desenvolvimento muscular normal por manter a atividade transcricional da miostatina e a reprogramação celular por interações da porção N-terminal da proteína, que imita a heparina, a diversos fatores bioativos como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) e a interleucina-10 (TILGREN *et al.*, 2009; JAN; LEE; CHOI, 2016; KALAMAJSKI *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2016). Além dessas funções, a *FMOD* já foi associada a regulação da angiogênese por estimular o crescimento de células endoteliais, a migração e a formação de redes capilares, além de ser capaz de mudar o estado quiescente das células endoteliais para

um angiogênico ao aumentar a expressão de colágenos e outros fatores pró-angiogênicos (JIAN *et al.*, 2013).

Figura 1.13 – Funções fisiológicas da fibromodulina



Representação da complexidade funcional da fibromodulina (FMOD) normal. **Fonte:** Adaptada de JAN; LEE; CHOI, 2016.

A relação da FMOD com processos patológicos vem sendo largamente estudada. Atualmente, sabe-se que ela está relacionada a tendinopatias, aterosclerose, atrofia do tecido endometrial pós-menopausa, degeneração do disco intervertebral, nefropatia diabética e diversos cânceres (AL-QATTAN; AL-QATTAN, 2018). É conhecido que em câncer de mama altamente metastático há superexpressão de TGF- β 1 e NF- κ B (fator nuclear kappa B), mediante a esse fato, Nejad e colaboradores (2017) superexpressaram a FMOD em linhagens de câncer de mama e observaram uma regulação negativa dessas proteínas, resultando na diminuição do potencial metastático dessas linhagens. Em estudos recentes sobre CaP, foi demonstrado que o *FMOD* está superexpresso em linhagens e em tecidos biopsiados de CaP, mostrando diferenças significativas de expressão quando comparadas com tecidos de HPB e de próstata

saudável, apresentando melhor diferenciação entre as patologias do que o próprio PSA (BETTIN; REYES; REYES, 2016; REYES *et al.*, 2016).

Contudo, não foram realizados estudos genéticos sobre a presença de alterações na sequência de nucleotídeos do *FMOD* e associações com o risco de desenvolvimento do CaP e da HPB.

1.3.2 Gene *GSTP1*

O gene glutathione S-transferase *pi* 1 (*GSTP1*), localizado no cromossomo 11q13.2, apresenta 7 exons (958pb) responsáveis por codificar a proteína de mesmo nome (*GSTP1*) que possui 210aa (ENSEMBL).

As glutathione S-transferases (GSTs) constituem uma família de enzimas que desempenham um papel importante na proteção das células ao atuar na desintoxicação de ROS, de carcinógenos ambientais, metabolismo de hormônios esteroides e agentes quimioterápicos (AWASTHI *et al.*, 2017). As isoformas - *alfa*, *mu*, *pi* e *teta* - são altamente expressas na próstata e polimorfismos genéticos que alterem sua atividade podem afetar o nível de hormônios e xenobióticos na próstata, podendo estar diretamente relacionados com o desenvolvimento e progressão do CaP (COTIGNOLA *et al.*, 2013; CHIRILĂ *et al.*, 2015; MARCHEWKA *et al.*, 2017; CHATTERJEE; GUPTA, 2018).

O polimorfismo rs1695 foi selecionado para ser avaliado neste gene e ele gera uma troca de adenina por guanina na posição 313 no DNA complementar (c.313A>G), gerando também uma alteração na proteína na posição 105 de uma isoleucina para valina (p.Ile105Val) como consta no banco de dados NCBI-dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Diversos trabalhos já encontraram associações entre ele e CaP, estando relacionado com maior risco de desenvolver a patologia em outras populações (YU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016).

1.3.3 Gene *KLK3*

O gene *kallikrein related peptidase 3* (*KLK3*) está localizado no cromossomo 19q13.33 e possui 5 exons (1464pb), seu produto codificado é mais conhecido como PSA, que possui 261aa; e é majoritariamente expresso na próstata (ENSEMBL). Esse gene é um dos 15 que compõem a família de calicreínas que são proteases com diversas funções fisiológicas. Sendo a principal função do PSA, degradar proteínas secretadas

pelas vesículas seminais como a semenogelina, resultando na liquefação e liberação do fluido seminal (KRYZA *et al.*, 2016).

A relação do PSA com a etiologia do CaP ainda está sendo estudada para melhor elucidação, mas alguns estudos já publicaram que além de desempenhar papel importante na motilidade espermática, ele esteja relacionado com a degradação proteolítica da MEC na tumorigênese do CaP, o que contribui para a invasão tumoral e metástase (GUO *et al.*, 2014). Alterações no *KLK3* também já foram encontradas, como o polimorfismo rs1058205 que está localizado na região 3'UTR do gene (*untranslated region*) (c.*15C>T), que mostrou associação com o nível sérico do PSA, indicando que ela pode interferir na produção da proteína e no desenvolvimento do CaP (CHEN; XIN, 2017).

1.3.4 Gene *RNASEL*

O gene ribonuclease L (*RNASEL*), localizado no cromossomo 1q25.3, apresenta 7 exons (4238pb), sendo 6 deles responsáveis por codificar a proteína de mesmo nome (*RNASEL*) que possui 741aa (ENSEMBL). A *RNASEL* atua como antiviral e pró-apoptótico regulado por interferon, após sua ativação ela é capaz de degradar tanto RNA celular quanto viral (BISBAL; SILVERMAN, 2007).

O *RNASEL* é considerado um supressor tumoral, que desempenha papel significativo na patogênese do CaP através da inflamação e da infecção (DAYAL *et al.*, 2017). Diversas mutações nele têm sido associadas à predisposição ao CaP e ele já foi proposto como um gene candidato de suscetibilidade ao CaP hereditário (HCP1) que consta no *locus* 1q24-q25 (MEYER *et al.*, 2010; SAN FRANCISCO *et al.*, 2014; KARYADI *et al.*, 2015). Dentre as alterações descritas, o polimorfismo rs486907 foi selecionado para análise, ele provoca uma troca de guanina por adenina na posição 1385 do DNA (c.1385G>A), por consequência, essa troca resulta numa alteração na proteína no aminoácido 462 (p.Arg462Gln) (NCBI-dbSNP).

1.3.5 Gene *SRD5A2*

O gene esteroide 5-alfa redutase tipo 2 (*SRD5A2*), localizado no cromossomo 2p23.1, contém 5 exons (4519pb) e codifica a proteína *SRD5A2* de 254aa (ENSEMBL). Esse gene é expresso em altos níveis na próstata e em muitos outros tecidos sensíveis a andrógenos como os testículos.

A principal função da SRD5A2 é converter irreversivelmente a testosterona em DHT e dessa forma ela desempenha papel central na diferenciação sexual e na fisiologia dos androgênios (WANG *et al.*, 2014; MENDONCA *et al.*, 2016). A participação da enzima na fisiopatologia de doenças da próstata é extremamente importante, por isso inibidores de sua função como finasterida e dutasterida são utilizados para administrar a HPB e potencialmente prevenir o CaP nesses pacientes (THOMPSON *et al.*, 2013).

O SRD5A2 é altamente polimórfico e diversas alterações já foram associadas a mudanças no metabolismo da testosterona, conferindo risco para CaP (LI *et al.*, 2010; DUŠENKA *et al.*, 2014). Um dos polimorfismos muito estudado é o rs523349 que gera uma troca de citosina por guanina no DNA (c.256C>G), resultando em uma troca na proteína de valina por leucina (p.Val89Leu) que parece interferir nos níveis da proteína produzida (NCBI-dbSNP).

1.3.6 Gene XRCC1

O gene *X-Ray repair cross complementing 1 (XRCC1)*, localizado no cromossomo 19q13.31, apresenta 17 exons (2802pb) que codificam a proteína de complementação cruzada de reparo de raios-X 1 (XRCC1) com 633aa (ENSEMBL).

A proteína XRCC1 desempenha papel crucial no reparo por excisão de bases (BER) e no reparo de quebras de fitas simples (SSBR), interagindo com diversas moléculas como PARP1, PNKP e DNA polimerase β (CALDECOTT, 2019).

Dessa forma alterações nos níveis da proteína funcional reduz a capacidade de reparo e em hipersensibilidade a agentes danosos ao DNA, gerando instabilidade do genoma (HANSSEN-BAUER *et al.*, 2012; NISSAR *et al.*, 2014). Uma dessas alterações é o SNP rs25487 que produz uma troca de adenina por guanina na posição 1196 do DNA (c.1196A>G) e, conseqüentemente, em uma troca de glutamina por arginina na proteína (p.Gln399Arg) (NCBI-dbSNP). Essa troca já foi associada ao aumento de risco de outras patologias como de câncer de pulmão, de tireoide e de mama, mas em relação às patologias prostáticas ainda há muitas controvérsias (WANG *et al.*, 2015; MOGHADDAM *et al.*, 2016; NEDOOSHAN *et al.*, 2017).

1.3.7 Gene CASC8

O CASC8, gene de suscetibilidade ao câncer 8 (*cancer susceptibility 8*), está localizado no cromossomo 8q24.21, possui 6 exons com 1420pb e não codifica uma

proteína, sendo responsável por originar um *long non-coding* RNA (lncRNA) (ENSEMBL).

As funções sobre esse lncRNA vêm sendo descobertas e elas têm se mostrado diretamente envolvidas na tumorigênese, já sendo demonstrado que o *CASC8* está relacionado com a reprogramação da glicólise (efeito Warburg) e a proliferação das células cancerígenas (HU *et al.*, 2017)

Anteriormente, foi relatado que SNPs nesse gene tem associação com a suscetibilidade de diversos tipos de câncer como o de pulmão e de estômago por alterar o nível de expressão do lncRNA (MA *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2016). Para avaliar a relação de alterações nesse gene com as doenças prostáticas, foi selecionado o SNP rs1447295 (n.1041+6290A>C) (NCBI-dbSNP).

2 JUSTIFICATIVA

Uma vez que a longevidade vem aumentando em nossa sociedade e conseqüentemente alterando a estrutura etária da população brasileira, se faz necessária a mudança do foco de pesquisa para as doenças complexas crônicas degenerativas, que são típicas da faixa etária idosa, como a HPB e o CaP (IBGE, 2013). Além disso, o curso habitualmente longo das doenças, a manifestação clínica tardia, principalmente no CaP, e os altos índices de mortalidade e morbidade são desafios marcantes que necessitam de melhor compreensão do comportamento fisiopatológico dessas doenças.

Por estas razões, a elucidação da participação das variações genéticas nessas doenças multifatoriais é extremamente benéfica para a população, visto que a análise dos genes candidatos pode gerar biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce, segregar grupos que possuem maior risco de desenvolvimento das patologias possibilitando que eles tomem medidas profiláticas diferenciadas, além de poder direcionar a melhor abordagem terapêutica e ter uma visualização mais específica do prognóstico dos indivíduos afetados.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a associação de fatores genéticos com o risco de desenvolvimento do câncer de próstata e da hiperplasia prostática benigna em amostra da população do Rio de Janeiro, além de avaliar o perfil de expressão *in silico* dos genes candidatos no câncer de próstata.

3.2 Objetivos Específicos

- Rastrear variantes no gene candidato *FMOD*;
- Genotipar polimorfismos nos genes candidatos: *GSTP1*, *KLK3*, *RNASEL*, *SRD5A2*, *XRCC1* e *CASC8*;
- Estimar os efeitos/riscos relativos dos polimorfismos sobre a HPB e o CaP;
- Analisar as possíveis relações entre o genótipo e o fenótipo através de testes do tipo caso–controle;
- Fazer análise de predição das variantes encontradas no *FMOD*;
- Comparar o perfil de expressão dos genes candidatos em tecido prostático tumoral e não-tumoral (*in silico*);
- Relacionar a expressão dos genes candidatos com diferentes dados clínicos/patológicos (*in silico*);
- Avaliar a expressão dos genes candidatos em um painel com diferentes amostras tumorais, análise PAN-Câncer (*in silico*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Para o desenvolvimento do presente estudo foi utilizado material biológico de 284 indivíduos do sexo masculino residentes no estado do Rio de Janeiro. Dentre eles, 264 foram oriundos da Policlínica de Duque de Caxias (PDC) e atendidos pela equipe de urologia liderada pelo colaborador Dr. Enrique Covarrubias Loyaza. Todos esses indivíduos foram informados sobre os detalhes do estudo e concordaram voluntariamente em participar da pesquisa mediante a assinatura prévia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo A). Após a assinatura, eles tiveram amostras de sangue periférico coletadas e foram questionados a respeito do histórico clínico e familiar (apêndice A). Esses pacientes foram coletados no período de setembro de 2018 a novembro de 2019 e tiveram seus dados continuamente atualizados neste período.

Além desses, foram incluídos no estudo 20 pacientes provenientes de uma colaboração com o Banco Nacional de Tumores do Instituto Nacional de Câncer (BNT–INCA). Esses pacientes foram diagnosticados com CaP por especialistas do INCA e previamente assinaram TCLE específico do BNT e assim cederam amostras de sangue periférico para inclusão neste banco e para estudos subsequentes.

Vale ressaltar que este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio (CAAE: 88510618.8.0000.5283 – anexo B) e do INCA (CAAE: 88510618.8.3002.5274 – anexo C), e ainda que toda a pesquisa científica seguiu estritamente as recomendações exigidas pela Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº466/2012.

4.1.1 Critério de Inclusão e Exclusão

Os indivíduos foram segregados em três grupos: saudáveis (controle), com hiperplasia prostática benigna (HPB) e com câncer de próstata (CaP). Os critérios utilizados para a formação do grupo controle foram idade acima de 50 anos, ausência de sintomas característicos de doenças prostáticas e exames como toque retal e PSA sem alterações. O grupo de HPB foi formado por pacientes com alteração nos exames de toque retal e de ultrassonografia, apresentando peso de próstata acima de 30g. O grupo de CaP foi constituído por pacientes com diagnóstico comprovado por exame

anatomopatológico. Como critério de exclusão nenhum dos indivíduos poderia apresentar prostatites e nem diagnóstico positivo para outras neoplasias.

4.2 Coleta de Material Biológico

Para a realização das análises genéticas foram coletados, por profissional especializado, 5mL de sangue periférico de cada paciente em tubo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Genética da Universidade do Grande Rio (LabGen Unigranrio), onde foram processadas e armazenadas a 4°C.

4.3 Extração de DNA Genômico

O processo de extração do DNA genômico compreende várias etapas que incluem a lise das membranas lipídicas, a purificação do DNA removendo as proteínas e o RNA, seguida pela precipitação e reidratação do DNA em meio adequado para mantê-lo estável. Todo material genético foi extraído a partir dos leucócitos presentes no sangue periférico utilizando o kit comercial FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Alemanha) e seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

4.4 Quantificação do DNA Genômico

Para avaliar a concentração e a pureza do DNA extraído, as amostras foram submetidas à quantificação por nanoespectrofotometria através do equipamento Denovix DS-11 (Uniscience, Brasil). A razão A_{260nm}/A_{280nm} gerada pelo aparelho foi utilizada para estimar a pureza do ácido nucleico, na qual a absorbância do DNA é lida a 260nm e a de potencial contaminante de proteína a 280nm. Dessa forma, as amostras que se encontravam com a razão entre 1,8 e 2,0 foram armazenadas em freezer a -20°C no LabGen para utilização nos experimentos subsequentes.

4.5 Sequenciamento Automático

As etapas para a realização do sequenciamento foram executadas no Laboratório de Genética Humana (LGH) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) em colaboração com a plataforma de sequenciamento PDTIS (Plataforma de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

4.5.1 Construção dos Primers

Os *primers* para o rastreamento do gene *FMOD* foram desenhados a fim de amplificar as regiões codificantes (exons 2 e 3), através do programa *Primer3Web* V. 4.1.0 (<http://primer3.ut.ee/>). A predição da formação de estruturas secundárias (*hairpin*, *self-dimer*, *cross-dimer* e palíndromos) foi avaliada com o auxílio das seguintes ferramentas *online*: *OligoCalc* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), *PCR Primer Stats* (http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html) e *UCSC In-Silico PCR* (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Além desses, a ferramenta *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi usada para verificar a especificidade dos *primers* com o fragmento gênico em questão.

Após as verificações, os *primers* (tabela 4.1) com melhor desempenho e especificidade foram encaminhados a Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, EUA) para confecção.

Tabela 4.1 – Desenho dos *primers* do gene *FMOD*

Gene <i>FMOD</i>	Sequência dos <i>Primers</i>	Fragmento	T _m
Exon 2.1	F: 5'–CCGAAGAAATGAGAGCAAGG–3' R: 5'–TACAAGGCCGTGAGGTTCTC–3'	777pb	61°C
Exon 2.2	F: 5'–GTGATAAGGTGGGCAGGAAG–3' R: 5'–TCAGGTTGCTTCATTTGTGC–3'	681pb	62°C
Exon 3.0	F: 5'–TTGGTGGTTAGGAGGTGAGC–3' R: 5'–CGTGGACTTCTGTCCACATGG–3'	489pb	62°C

Primers para o PCR e o sequenciamento do gene *FMOD* confeccionados pela empresa Thermo Fisher Scientific. O **exon 2** do gene foi dividido em exon 2.1 e 2.2 por conta de seu extenso tamanho. **T_m**: temperatura de *melting* (pareamento); **F**: *primer forward*; **R**: *primer reverse*; **pb**: pares de base. **Fonte**: elaborada pelo autor.

4.5.2 PCR

Para a amplificação de cada um dos exons do gene *FMOD* foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) contendo: 2,5µL de tampão (10X), 1,5µL de MgCl₂ (25mM), 2,5µL de dNTPs (2mM), 0,5µL de *primers forward* e *reverse* (10mM), 0,4µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL), 50ng de DNA molde e água ultrapura para completar o volume de 24µL. A ciclagem para a reação iniciou-se com desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos consecutivos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento a 61°C (para o exon 2.1) ou 62°C (para os exons 2.2 e 3.0) por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, por último, extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para verificar se a amplificação ocorreu, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (Thermo Fisher Scientific) preparada com tampão TBE 1X [Tris - Trihidroximetil aminometano 89mM (GE Healthcare, EUA), ácido bórico 89mM (Merck KGaA, Alemanha), e EDTA 2mM (GE Healthcare)]. As amostras aplicadas no gel foram preparadas utilizando 4µL do produto de PCR, 1µL de corante de corrida [glicerol 30% (Isofar, Brasil), azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol 0,25% (GE Healthcare)] e 1µL de *GelRed* (Biotium, Uniscience). A eletroforese então foi conduzida a 70 volts por 1 hora em cuba horizontal (K33-10H, Kasvi, Brasil), utilizando-se como tampão de corrida TBE 1X e por fim, o gel foi visualizado pelo sistema de fotodocumentação *L-Pix Ex* (Loccus Biotecnologia, Brasil). A fim de confirmar o tamanho do fragmento amplificado foi utilizado como referência um marcador de pares de base (Mpb) de 100pb – *DNA Ladder* (Invitrogen).

4.5.3 Purificação dos Produtos de PCR

Antes de serem utilizados na reação de sequenciamento, os produtos da PCR foram submetidos à purificação utilizando a enzima *ExoSAP-IT* (Thermo Fisher Scientific), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Essa etapa tem a finalidade de remover os resíduos provenientes dos reagentes empregados na reação de amplificação.

4.5.4 Reação de Sequenciamento

Seguindo para o sequenciamento propriamente dito, o preparo da reação consiste em: 50ng do material purificado; 1,0µL de *primer forward* ou *reverse* (3,2µM) para cada exon separadamente (tabela 4.1, citada anteriormente), 1,0µL de tampão de sequenciamento (5X) (Thermo Fisher Scientific), 0,5µL de kit *Big Dye Terminator* V.3.1 (Thermo Fisher Scientific) e água ultrapura para um volume final de 10 µL. As reações foram realizadas em placa de 96 poços e conduzidas ao termociclador *Veriti* 9902, respeitando as condições de ciclagem apresentadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Condições de ciclagem para o sequenciamento do gene *FMOD*

Etapa	Especificações	
Desnaturação inicial	96°C – 1min	
Desnaturação	96°C – 10s	} 15X
Pareamento	50°C – 15s	
Extensão	60°C – 1min 15s	
Desnaturação	96°C – 10s	} 5X
Pareamento	50°C – 15s	
Extensão	60°C – 1min 30s	
Desnaturação	96°C – 10s	} 5X
Pareamento	50°C – 15s	
Extensão	60°C – 2min	

Etapas da ciclagem utilizada para o sequenciamento automático do gene *FMOD*. **min**: minuto; **s**: segundos; **X**: número de ciclos usados. **Fonte**: elaborada pelo autor.

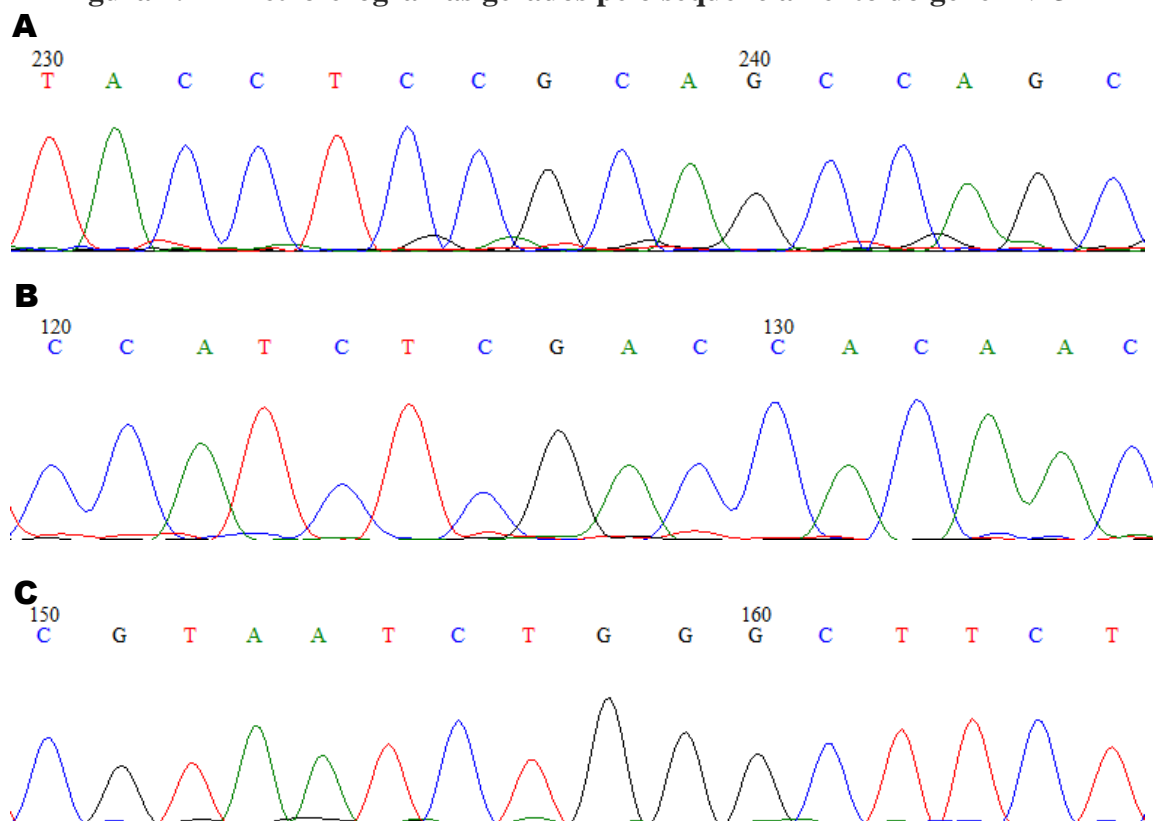
Após a ciclagem, o excesso de reagentes não incorporados na reação foi removido através da precipitação dos produtos de sequenciamento. Para isso, foram adicionados 80µL de isopropanol 75% e em seguida a placa foi centrifugada a 3.000 rpm por 50 minutos (Heraeus Multifuge X3R, Thermo Fisher Scientific). O sobrenadante foi descartado e a placa com as amostras precipitadas foi centrifugada em posição invertida a 900 rpm por 1 minuto.

Na sequência a placa foi levada ao termociclador *Veriti 9902* por 5 minutos a 75°C para secagem. Após esse processo, o material precipitado foi ressuspenseo em 10µL de formamida *Hi-Di* (Thermo Fisher Scientific) e, novamente, levado ao termociclador por 5 minutos a 95°C para desnaturação. Logo após, a placa com as amostras foi centrifugada a 900 rpm por 1 minuto e inserida no sequenciador *ABI Prism 3130* (Life Technologies, EUA) da Plataforma PDTIS para a leitura.

4.5.5 Análise das Sequências

Os eletroferogramas gerados pelo sistema de sequenciamento (figura 4.1) foram analisados através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor V.7.0.9* (Ionis Pharmaceuticals, EUA). Para analisar as sequências obtidas, elas foram alinhadas com o fragmento correspondente à sequência selvagem do gene *FMOD* (ENST00000354955.4) presente no banco de dados *online Ensembl*. Para garantir a especificidade e a sensibilidade da técnica foi utilizado como critério repetir todas as etapas uma vez que alterações genéticas fossem encontradas.

Figura 4.1 – Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento do gene *FMOD*



Eletroferogramas representativos dos exons do gene *FMOD* obtidos pelo sequenciamento automático. **A:** eletroferograma do exon 2.1; **B:** do exon 2.2; **C:** do exon 3.0. **Fonte:** Programa *BioEdit Sequence Alignment*, adaptada pelo autor.

4.6 Análise dos Polimorfismos Genéticos

A avaliação dos polimorfismos foi realizada através de duas metodologias baseadas na amplificação do DNA por meio da PCR.

4.6.1 PCR RFLP

A PCR RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) foi utilizada para genotipar os polimorfismos nos genes *GSTP1* (rs1695) e *XRCC1* (rs25487). A sequência dos *primers* para a amplificação de cada um dos SNPs consta na tabela 4.3 e foram descritos por Chirilă *et al.* (2015) e Noureddini *et al.* (2018), respectivamente.

Tabela 4.3 – Desenho dos *primers* para PCR-RFLP

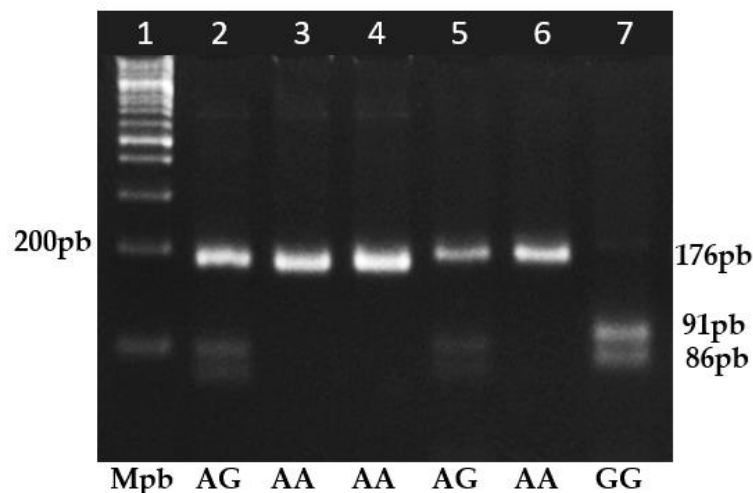
Gene SNP ID	Sequência dos <i>Primers</i>	Tamanho do Fragmento	Enzima de Restrição
<i>GSTP1</i> rs1695	F: 5'-ACCCAGGGCTCTATGGGAA-3' R: 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'	176pb (91pb/85pb)	<i>BSMAI</i>
<i>XRCC1</i> rs25487	F: 5'-CCTCAGATCACACCTAACTGGC-3' R: 5'-CTAACACTTGTTCTCCCACCCC-3'	440pb (158pb/282pb)	<i>MspI</i>

Primers para as variantes dos genes *GSTP1* e *XRCC1* confeccionados pela empresa Integrated DNA Technologies. **SNP ID:** identificador de polimorfismo de nucleotídeo único; **F:** *primer forward*; **R:** *primer reverse*; **pb:** pares de base. **Fonte:** elaborada pelo autor.

O protocolo de PCR para análise do rs1695 (*GSTP1*) iniciou-se com o preparo da reação contendo tampão (10X) (Invitrogen), MgCl₂ (25mM) (Invitrogen), dNTPs (2mM) (Invitrogen), *primers forward* e *reverse* do *GSTP1* (10mM) (Integrated DNA Technologies, EUA), Taq DNA Polimerase (5U/μL) (Invitrogen), 50 ηg de DNA molde e água ultrapura para completar o volume de 25 μL. A PCR foi realizada no termociclador *Veriti* 9902 (Thermo Fisher Scientific) com a seguinte ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos consecutivos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento a 62°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 segundos e por último, extensão final a 72°C por 7 minutos. Para verificar se a amplificação ocorreu, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%.

Após a confirmação de amplificação, os produtos da PCR foram tratados pela enzima de restrição *BSMAI* (New England Biolabs, EUA) e incubados a 55°C por 4 horas, conforme recomendado pelo fabricante. Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 3% para obtenção dos genótipos (figura 4.2).

Figura 4.2 – Discriminação dos genótipos do rs1695 (*GSTP1*) pela eletroforese

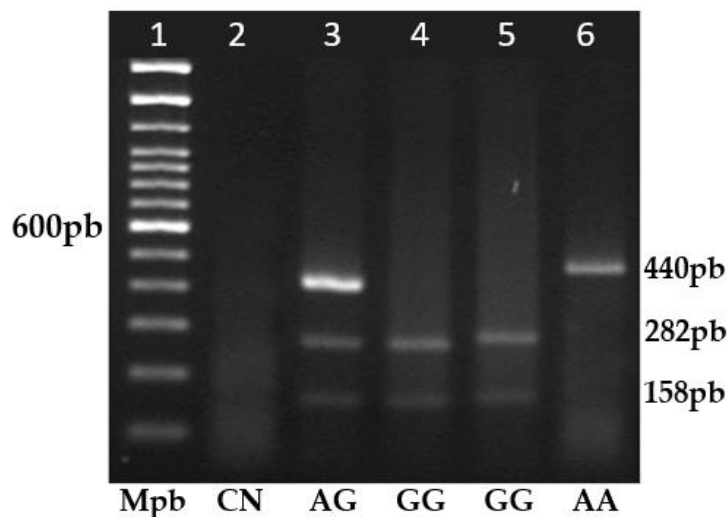


A figura representa os diferentes genótipos do rs1695 A>G (*GSTP1*): heterozigoto (2/5 - AG); homozigoto selvagem (3/4/6 - AA) e homozigoto mutado (7 - GG). **Mpb**: marcador de pares de base (100pb). **Fonte**: elaborada pelo autor.

Para a genotipagem do rs25487 (*XRCC1*) foram utilizados os mesmos reagentes da reação do rs1695 (*GSTP1*). A ciclagem também foi similar diferindo apenas na temperatura de pareamento, 63°C. Para a reação de RFLP, as amostras foram incubadas a 37°C por 4h com a enzima *MspI* (New England Biolabs), como

recomendado pelo fabricante e em seguida foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% (figura 4.3).

Figura 4.3 – Discriminação dos genótipos do rs25487 (*XRCCI*) pela eletroforese



A figura representa os diferentes genótipos do rs25487 A>G (*XRCCI*): heterozigoto (3 - AG); homozigoto mutado (4/5 - GG) e homozigoto selvagem (6 - AA). **Mpb**: marcador de pares de base (100pb); **CN**: controle negativo (2); **Fonte**: elaborada pelo autor.

4.6.2 PCR em Tempo Real

A técnica de PCR em tempo real com sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) foi realizada para genotipar os polimorfismos dos genes *CASC8* (rs1447295), *KLK3* (rs1058205), *RNASEL* (rs486907) e *SRD5A2* (rs523349) (tabela 4.4). Para a análise de todos os SNPs foram preparadas reações contendo Genotyping Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific), sonda TaqMan (10X), 50ng de DNA molde e complementação com água ultrapura até obter o volume final de 10 µL. Após o preparo, a reação foi colocada em placa de 96 poços (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, Thermo Fisher Scientific) e levada para o equipamento QuantStudio 7 Flex System (Thermo Fisher Scientific). As condições de amplificação para todos os polimorfismos foram 60°C por 30 segundos, 95°C por 10 minutos, 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e 30 segundos e por fim, 60°C por 30 segundos. Além disso, para garantir que não há nenhuma contaminação, em toda reação realizada foi incluído um controle negativo.

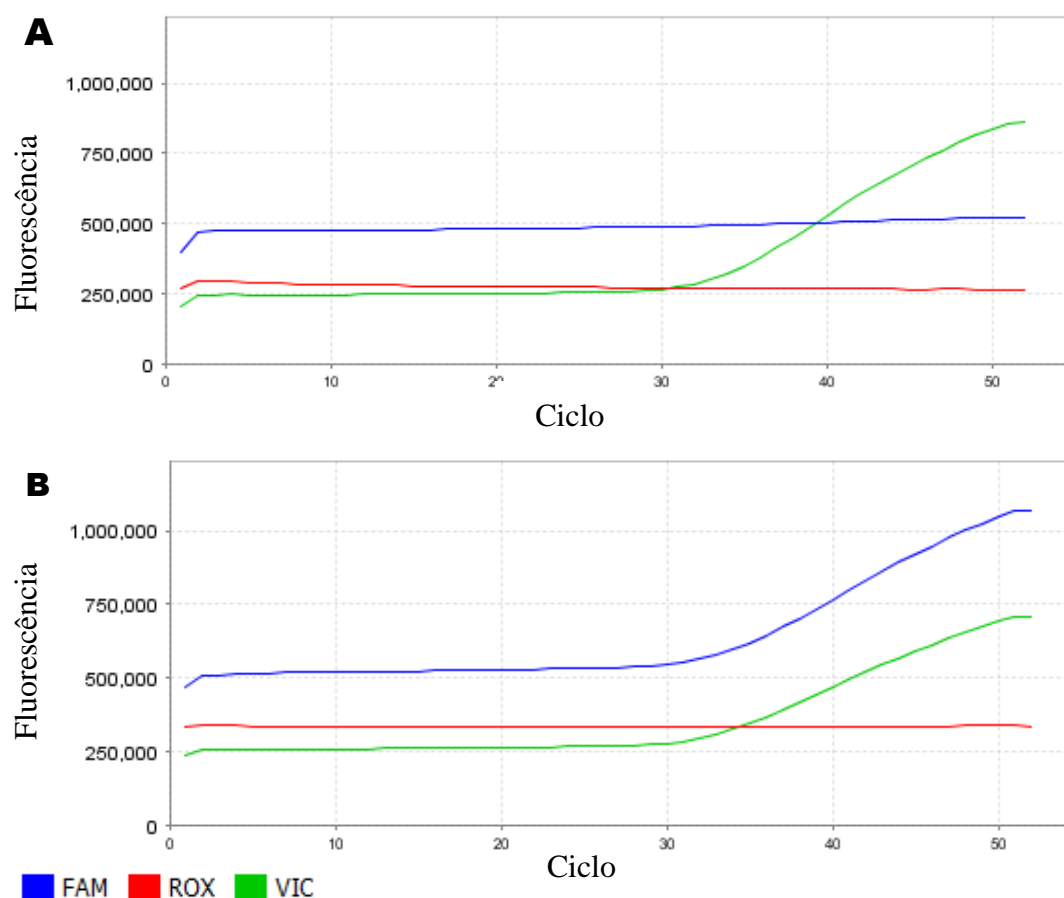
Tabela 4.4 – Desenho das sondas TaqMan

Gene	SNP ID	Sonda TaqMan [VIC/FAM]
<i>CASC8</i>	rs1447295	AGTGCCATTGGGGAGGTATGTAAAA[A/C]GTGCTATGGA AAAAAAGCAACAGGA
<i>KLK3</i>	rs1058205	CCAACCCCTGAGCACCCCTATCAAC[C/T]CCCTATTGTAG TAAACTTGGAACCT
<i>RNASEL</i>	rs486907	CTTAAATATAGATGACAGGACATTT[C/T]GGGCAAATTC ATCTTCCTCATTTTC
<i>SRD5A2</i>	rs523349	AAACGCTACCTGTGGAAGTAATGTA[C/G]GCAGAAGAG GCCAGAAGTACCGTC

Sondas TaqMan para a realização do PCR em tempo real para cada uma das variantes. Sondas desenhadas pela empresa Thermo Fisher Scientific. **SNP ID:** identificador de polimorfismo de nucleotídeo único; **VIC/FAM:** fluorescências usadas para diferenciar os alelos. **Fonte:** elaborada pelo autor.

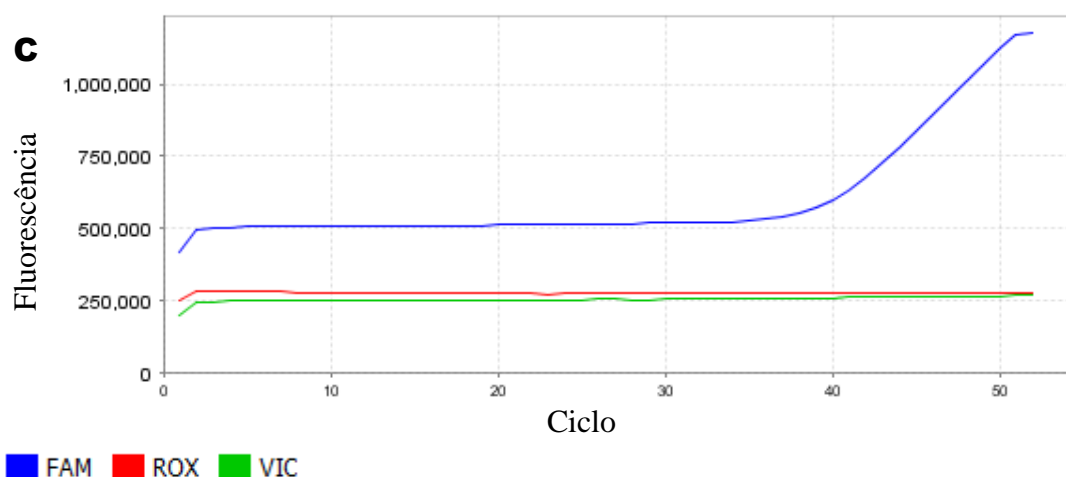
Os resultados da PCR em tempo real foram analisados no *QuantStudio Real Time PCR Software* (Thermo Fisher Scientific) através de gráficos de discriminação genotípica gerados pelo programa (figura 4.4) e que serviram como base para as análises.

Figura 4.4 – Gráficos multicomponentes da discriminação genotípica



Gráficos representativos da discriminação dos genótipos do rs523349 (*SRD5A2*). **A:** homocigoto selvagem; **B:** heterocigoto; **C:** homocigoto mutado. **Curva verde:** fluorescência do VIC; **Curva azul:** fluorescência do FAM; **Linha vermelha:** fluorescência da ROX. **Fonte:** *QuantStudio Real Time PCR Software*; adaptada pelo autor.

Figura 4.4 – Gráficos multicomponentes da discriminação genotípica (continuação)



Gráficos representativos da discriminação dos genótipos do rs523349 (*SRD5A2*). **A:** homocigoto selvagem; **B:** heterocigoto; **C:** homocigoto mutado. **Curva verde:** fluorescência do VIC; **Curva azul:** fluorescência do FAM; **Linha vermelha:** fluorescência da ROX. **Fonte:** *QuantStudio Real Time PCR Software*; adaptada pelo autor.

4.7 Análise *in Silico*

4.7.1 Análise de Predição

As ferramentas de predição *in silico* são frequentemente utilizadas para prever se mudanças no nucleotídeo de um gene geraram alterações na estrutura ou na função de uma proteína, dessa forma as análises são feitas avaliando duas categorias principais: o impacto de uma variante *missense* e o impacto de uma variante no *splicing* (LI M *et al.*, 2017). Após a interpretação, a variante pode ser basicamente classificada em benigna, na qual não interfere na funcionalidade da proteína, ou patogênica, em que há potencial prejuízo na proteína final.

Para a análise do impacto de variantes *missense* sobre uma proteína são avaliados diversos critérios como: a conservação evolutiva do aminoácido ou nucleotídeo, a localização e o contexto dentro da sequência proteica, e a consequência bioquímica da substituição de aminoácidos considerando propriedades físico-químicas específicas (THUSBERG; OLATUBOSUN; VIHINEN, 2011). Todos esses parâmetros são explorados por diferentes algoritmos de predição, e os que são comumente utilizados são o *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), o *SIFT* (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) e o *Mutation Taster* (<http://www.mutationtaster.org/>) (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013; SCHWARZ *et al.*, 2010; SIM *et al.*, 2012). O *PolyPhen-2* classifica a alteração como patogênica quando o resultado das

análises apresenta score próximo de um e benigna, quando é próximo de zero. O *SIFT* classifica como patogênica a alteração com score menor que 0,05 ou como benigna, se o score for maior que 0,05. Já o *Mutation Taster* utiliza uma matriz de substituição de aminoácidos para criar pontuações de acordo com o grau de diferença entre o aminoácido original e o novo, variando de 0 a 215, sendo mais próximo de 215 usado para classificar uma alteração como patogênica.

O impacto das variantes no *splicing* tem uma considerável participação na etiologia de doenças genéticas, visto que o reconhecimento correto dos sítios de *splicing* são fundamentais para a formação do RNA, na qual os introns são excisados e os exons são conectados. Para analisar esse impacto existem diversos algoritmos de predição disponíveis (JIAN; BOERWINKLE; LIU, 2014), mas para este trabalho foi escolhida a ferramenta eletrônica *Human Splicing Finder* que reconhece sítios de *splicing* em qualquer sequência humana e é a mais utilizada pelos trabalhos na literatura (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.shtml> – DESMET *et al.*, 2009).

4.7.2 Amostra TCGA

A amostra utilizada para a avaliação *in silico* de expressão dos genes candidatos foi obtida do banco de dados público *The Cancer Genome Atlas* – TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/> – WANG; JENSEN; ZENKLUSEN, 2016). Dele foram extraídos dados de transcriptoma (RNAseq V2) de amostras teciduais tumorais e não-tumorais de próstata. As amostras foram divididas em duas coortes, uma chamada de *Training Set* (TS) que contém 51 amostras pareadas (dados de expressão correspondentes a tecido prostático tumoral e não-tumoral de um mesmo indivíduo) e outra chamada de *Validation Set* (VS) com 445 amostras tumorais (composta somente por dados de tecido prostático tumoral). A divisão das coortes foi realizada com o intuito de avaliar a diferença de expressão gênica entre os grupos comparando amostras pareadas (TS) e, posteriormente, validando os resultados em uma coorte maior (VS).

Além dessas amostras foram selecionados dados de PAN-Câncer, que contém transcriptoma de diversos tecidos tumorais e não tumorais, totalizando 8609 e 738 amostras, respectivamente (descritas mais detalhadamente no apêndice B). Essa análise é feita a fim de avaliar a expressão dos genes candidatos em outros tecidos tumorais, verificando se há diferenças de expressão entre eles. Os dados utilizados do PAN-Câncer foram obtidos através do banco de dados público *UALCAN* (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html> – CHANDRASHEKAR *et al.*, 2017), que foi

elaborado para auxiliar na análise de dados clínicos, patológicos e de transcriptoma do TCGA.

4.7.3 Análise de Expressão e Dados Clínicos/Patológicos

Com a finalidade de avaliar a correlação entre o perfil de expressão dos genes candidatos e os dados clínicos/patológicos foram utilizadas as amostras tumorais totais de CaP provenientes do TCGA, englobando as tumorais pareadas e as não pareadas. Os dados selecionados para a correlação foram PSA total, score de Gleason e subtipo molecular dos tumores de próstata.

A avaliação do PSA e do score de Gleason foi realizada diretamente dos dados do TCGA, proporcionando as informações necessárias para que fosse possível criar gráficos do tipo *scatter plot* através do programa GraphPad Prism 8. Enquanto o subtipo molecular foi avaliado através da ferramenta *UALCAN*.

4.8 Análise Estatística

A primeira análise realizada foi a verificação da normalidade da distribuição das variáveis quantitativas (idade, IMC, PSA, peso da próstata, perfil de expressão) através do teste de Kolmogorov-Smirnov. No caso de distribuição normal, as variáveis foram analisadas com média e desvio padrão através de testes paramétricos como teste *t* de Student ou Análise de variâncias (ANOVA). Quando a distribuição não é normal, as variáveis quantitativas foram analisadas com medianas e quartis através de testes não paramétricos como o Mann-Whitney, Wilcoxon (para amostras pareadas) ou Kruskal-Wallis.

No caso das variáveis qualitativas (cor/raça, obesidade, I-PSS, níveis de PSA, score de Gleason) foi feita análise comparativa usando o teste do qui-quadrado (X^2). Sendo ainda avaliada as distribuições genótípicas e alélicas dos diferentes polimorfismos analisados e o equilíbrio genético de Hardy-Weinberg, que corresponde ao modelo teórico capaz de avaliar se a população está sob influência de fatores evolutivos. Além disso, foi utilizado o cálculo do *odds ratio* (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para avaliar a estimativa do risco relativo dos genótipos em relação a patologia.

Nas análises *in silico*, o perfil de expressão apresentou distribuição não normal, sendo utilizado o teste estatístico de Wilcoxon para avaliar as diferenças dentro da coorte TS e o teste de Mann-Whitney para análise da coorte VS. Para indicar a

significância estatística da correlação entre a expressão e os dados clínicos de PSA e score de Gleason foi usado o teste de Kruskal-Wallis e na análise do subtipo molecular foi usado o teste *t* de Student.

Todas as inferências estatísticas foram realizadas ao nível de significância de 5%. Os programas computacionais utilizados para essas análises foram Microsoft Excel, GraphPad Prism 8 e IBM SPSS V.22.

4.8.1 Regressão Logística Multivariada

Através do estudo de regressão logística foram feitas as análises dos efeitos dos polimorfismos sobre os grupos de pacientes (CaP e HPB). A seleção do melhor modelo inclui apenas os polimorfismos que possuem efeitos significativos sobre a patologia, o método utilizado neste caso foi o *Forward Wald* usando o programa IBM SPSS V.22. Todas as variáveis da regressão foram ajustadas pela idade.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Descritiva dos Grupos

O grupo amostral foi composto por 285 indivíduos, sendo 100 do grupo controle, 135 do grupo com HPB e 49 do grupo com CaP.

A primeira análise realizada foi o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov para as variáveis quantitativas e todas apresentaram distribuição não normal, sendo mostradas por meio das medianas e dos 1º e 3º quartis. Dessa forma, o teste de Kruskal-Wallis foi usado para calcular a diferença estatística entre os grupos amostrais. Nesta análise, vimos que os grupos apresentam diferenças estatísticas significativas em relação a idade, PSA e peso da próstata, sendo todas essas variáveis maiores no grupo CaP, com exceção do peso da próstata que é maior no grupo HPB (tabela 5.1). Vale descartar que o IMC não diferiu significativamente entre os grupos ($p=0,62$), apresentando medianas de sobrepeso (IMC entre 25,0 e 29,9 kg/m²) para todos os grupos.

Tabela 5.1 – Comparação das variáveis quantitativas em relação aos grupos amostrais

Variáveis Quantitativas	N	Controle	N	HPB	N	CaP	<i>p</i>
Idade (anos)	100	65 (57; 66)	135	68 (62; 75)	49	72 (64; 77)	0,00
IMC (kg/m ²)	93	25,90 (23,86; 28,85)	123	26,17 (23,62; 28,72)	29	26,85 (24,66; 29,39)	0,62
PSA _{total} (ng/mL)	45	0,97 (0,53; 1,77)	100	2,56 (1,08; 4,84)	40	12,94 (5,71; 23,75)	0,00
PSA _{livre} (ng/mL)	42	0,32 (0,17; 0,49)	90	0,52 (0,21; 0,92)	21	1,07 (0,79; 2,38)	0,00
Peso da Próstata* (g)	24	21,50 (23,50; 32,00)	77	47,00 (35,70; 61,50)	22	35,55 (27,75; 54,75)	0,00

Os valores indicam a mediana (1º quartil; 3º quartil). *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste de Kruskal-Wallis. **N**: número de indivíduos; **IMC**: índice de massa corporal; **PSA**: antígeno específico da próstata. *Peso da próstata foi avaliado por ultrassonografia transretal.

Além dessas, também foram avaliadas diversas variáveis clínicas de caráter qualitativo, em que a avaliação através do I-PSS e dos níveis de PSA se mostraram com diferenças significativas entre os grupos e a distribuição da cor/raça apresentou uma tendência de associação entre as amostras (tabela 5.2). Novamente, a classificação do IMC não mostrou diferença entre os grupos, enfatizando que a obesidade não se

apresentou como um fator de risco para as patologias prostáticas nessa população. Todas essas comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

Tabela 5.2 – Comparação das variáveis qualitativas em relação aos grupos amostrais

Variáveis Qualitativas	Controle 100 (%)	HPB 135 (%)	CaP 49 (%)	<i>p</i>
Cor/Raça (IBGE)				
Branca	42 (42)	41 (32)	19 (39)	0,05
Parda	22 (22)	45 (34)	20 (41)	
Preta	36 (36)	45 (34)	10 (20)	
Total	100	131	49	
Classificação IMC				
Eutrófico	33 (35)	44 (36)	8 (28)	0,85
Sobrepeso	45 (48)	58 (47)	14 (48)	
Obeso	15 (16)	21 (17)	7 (24)	
Total	93	123	29	
I-PSS				
Leve	86 (87)	59 (44)	11 (38)	0,00
Moderado	10 (10)	31 (23)	5 (17)	
Grave	3 (3)	43 (32)	13 (45)	
Total	99	133	29	
Níveis de PSA				
Abaixo de 4 ng/mL	43 (96)	73 (72)	5 (13)	0,00
Entre 4 e 10 ng/mL	2 (4)	22 (22)	11 (28)	
Acima de 10 ng/mL	0 (0)	6 (6)	24 (60)	
Total	45	101	40	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL (baixo risco de CaP), entre 4 e 10 ng/mL (1 a cada 4 corre risco de CaP) e acima de 10 ng/mL (50% de risco de CaP). O **I-PSS** (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente.

5.2 Análise das Variantes Encontradas no Gene *FMOD*

Através do sequenciamento dos exons e das regiões de limite exon-intron do gene *FMOD* foram evidenciadas seis variantes: 3 *missense*, 2 sinônimas e 1 intrônica. As variantes estão listadas na tabela 5.3 destacando suas principais características.

Tabela 5.3 – Variantes evidenciadas na análise molecular do gene *FMOD*

Alteração na Sequência			Localização no Gene	Tipo de Alteração	Nº de Indivíduos com a Alteração		
SNP ID	c.DNA	Proteína			CTL	HPB	CaP
rs139299015	c.70C>G	Pro24Ala	exon 2	<i>missense</i>	1	0	0
rs115908597	c.125A>C	Tyr42Ser	exon 2	<i>missense</i>	0	2	1
rs145901742	c.1059C>T	Asn353Lys	exon 3	<i>missense</i>	0	0	1
rs7543148	c.237G>A	Glu79Glu	exon 2	sinônima	52	60	35
rs77856193	c.759C>T	His253His	exon 2	sinônima	1	0	2
rs1891180	c.980-114A>G	–	intron 2–3	intrônica	41	58	30

Representação das variantes encontradas através do sequenciamento automático do gene *FMOD*, com suas características de troca de base nitrogenada e/ou aminoácido, além do número de indivíduos encontrados com a alteração em cada um dos grupos amostrais. **c.DNA:** referência para ácido desoxirribonucleico complementar.

5.2.1 Análise das Variantes *Missense* do *FMOD*

A análise de predição foi realizada para as variantes *missense*, através dos programas *Polyphen-2*, *SIFT* e *Mutation Taster*, sendo identificadas duas alterações patogênicas rs115908597 e rs145901742, e uma benigna, rs139299015 (tabela 5.4). Todas essas alterações são descritas abaixo.

Tabela 5.4 – Análise de predição das variantes *missense* evidenciadas no *FMOD*

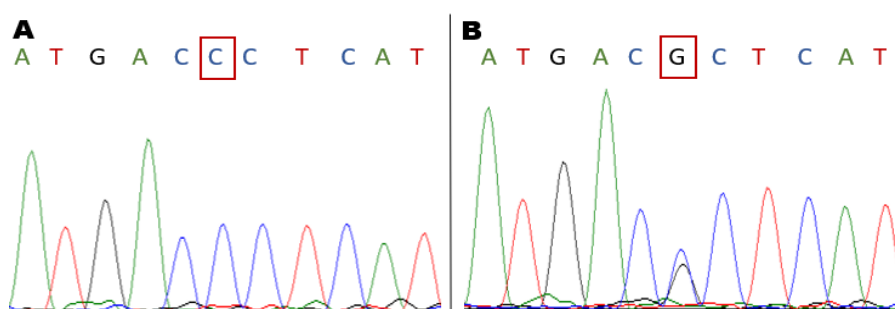
SNP ID	c.DNA Proteína	<i>Polyphen-2</i>	<i>SIFT</i>	<i>Mutation Taster</i>
rs139299015	c.70C>G Pro24Ala	Benigna	Benigna	Benigna
rs115908597	c.125A>C Tyr42Ser	Patogênica	Patogênica	Patogênica
rs145901742	c.1059C>T Asn353Lys	Patogênica	Patogênica	Patogênica

Classificação dada por cada uma das ferramentas de predição utilizadas. **c.DNA:** referência para ácido desoxirribonucleico complementar.

5.2.1.1 rs139299015

A variante *missense* rs139299015 do exon 2 produz uma troca de C>G na posição 70 do DNA, como ilustrado no eletroferograma da figura 5.1, e essa troca resulta na alteração do aminoácido prolina na posição 24 para alanina (Pro24Ala). A alteração foi encontrada em apenas um indivíduo controle de 57 anos e através das análises de predição ela foi considerada benigna pelos três programas utilizados, provavelmente não tendo impacto funcional sobre a proteína.

Figura 5.1 – Eletroferogramas da alteração rs139299015 do *FMOD*

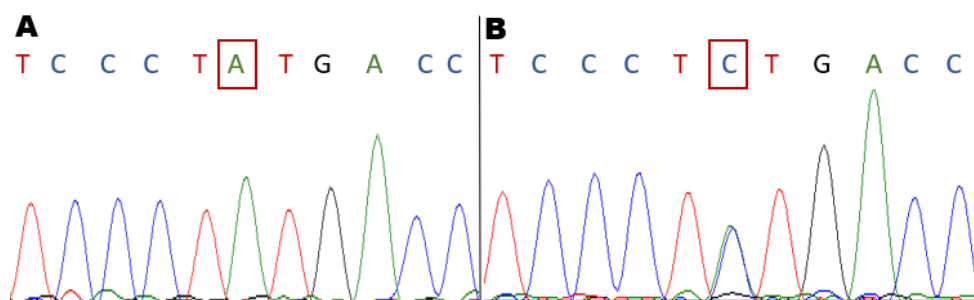


Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento automático do exon 2 do gene *FMOD*, apresentando a troca de base nitrogenada do rs139299015 (c.70C>G). **A:** sequência selvagem; **B:** sequência mutada em heterozigose. **Fonte:** Programa *BioEdit Sequence Alignment*, adaptada pelo autor.

5.2.1.2 rs115908597

A variante *missense* rs115908597 (c.125A>C) do exon 2 (figura 5.2) resulta na troca do aminoácido tirosina na posição 42 da proteína por serina (Tyr42Ser). Ela foi observada em 3 indivíduos, sendo dois do grupo HPB com idade de 72 e 74 anos e um indivíduo do grupo CaP de 75 anos, não sendo encontrada em nenhum indivíduo com as patologias prostáticas. Além disso, a análise de predição indicou que ela altera a funcionalidade da proteína, classificando-a como patogênica.

Figura 5.2 – Eletroferogramas da alteração rs115908597 do *FMOD*

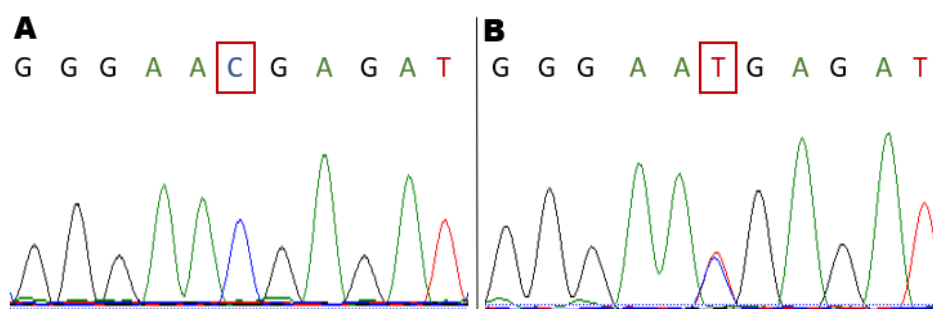


Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento automático do exon 2 do gene *FMOD*, apresentando a troca de base nitrogenada do rs115908597 (c.125A>C). **A:** sequência selvagem; **B:** sequência mutada em heterozigose. **Fonte:** Programa *BioEdit Sequence Alignment*, adaptada pelo autor.

5.2.1.3 rs145901742

A variante *missense* rs145901742 (c.1059C>T) do exon 3 (figura 5.3) resulta na troca do aminoácido asparagina por lisina (Asn353Lys). Essa alteração foi observada em um indivíduo com CaP de 64 anos, estando ausente nos indivíduos saudáveis analisados. Além do mais, avaliando os programas de predição, todos classificam a alteração como patogênica, possuindo potencial efeito na proteína final.

Figura 5.3 – Eletroferogramas da alteração rs145901742 do *FMOD*



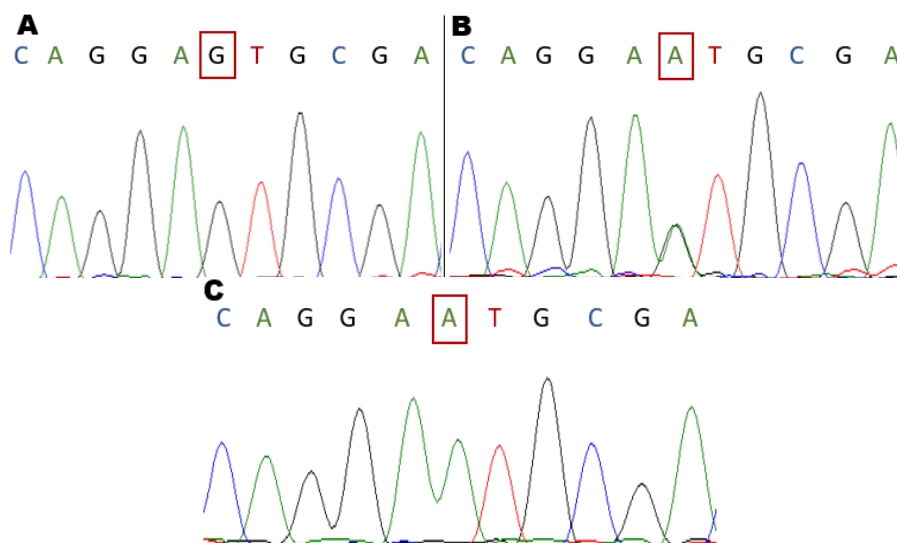
Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento automático do exon 3 do gene *FMOD*, apresentando a troca de base nitrogenada do rs145901742 (c.1059C>T). **A:** sequência selvagem; **B:** sequência mutada em heterozigose. **Fonte:** Programa *BioEdit Sequence Alignment*, adaptada pelo autor.

5.2.2 Análise das Variantes Sinônimas do *FMOD*

5.2.2.1 rs7543148

A variante sinônima rs7543148 (c.237G>A) foi encontrada tanto em heterozigose quanto em homozigose (figura 5.4) nos grupos amostrais, possuindo comportamento polimórfico. Ela foi observada em 52 indivíduos controles (possuindo frequência de 78,79% do grupo controle analisado), 60 indivíduos com HPB (85,71%) e 35 com CaP (79,55%). A análise de predição dessa variante através do *Mutation Taster* e do *Human Splicing Finder* indicou que ela não apresenta patogenicidade e nem está em sítio de *splicing*.

Figura 5.4 – Eletroferogramas da alteração rs7543148 do *FMOD*



Eletroferogramas gerados pelo sequenciamento automático do exon 2 do gene *FMOD*, apresentando a troca de base nitrogenada do rs7543148 (c.237G>A). **A:** sequência selvagem; **B:** sequência mutada em heterozigose; **C:** sequência mutada em homozigose. **Fonte:** Programa *BioEdit Sequence Alignment*, adaptada pelo autor.

No teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado que os grupos controle e CaP se apresentaram em desequilíbrio ($p < 0,05$) para esse polimorfismo, enquanto o HPB estava em equilíbrio ($p > 0,05$). Não foram encontradas associações significativas entre os genótipos e os alelos desse polimorfismo com as patologias prostáticas analisadas (tabela 5.5).

Tabela 5.5 – Distribuição genotípica e alélica do rs7543148 (*FMOD*) entre os grupos

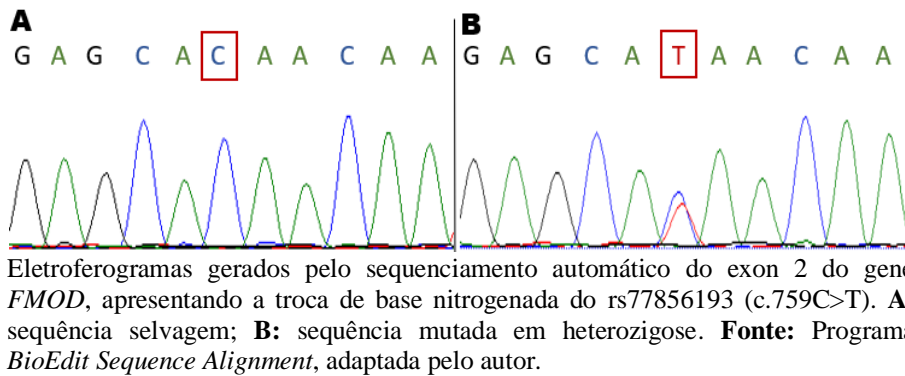
SNP ID	Genótipo	HPB	Controle	Total	p'
	GG	10	14	24	0,29
	GA	33	23	56	
	AA	27	29	56	
	Total	70	66	136	
	p (H-W)	0,99	0,03		
	Alelos	HPB	Controle	Total	p''
	G	53	51	104	0,90
	A	87	81	168	
	Total	140	132	272	
	Genótipo	CaP	Controle	Total	p'
	GG	9	14	23	0,92
	GA	14	23	37	
	AA	21	29	50	
	Total	44	66	110	
	p (H-W)	0,04	0,03		
	Alelos	CaP	Controle	Total	p''
	G	32	51	83	0,73
	A	56	81	137	
	Total	88	132	220	
	Genótipo	CaP	HPB	Total	p'
	GG	9	10	19	0,26
	GA	14	33	47	
	AA	21	27	48	
	Total	44	70	114	
	p (H-W)	0,04	0,99		
	Alelos	CaP	HPB	Total	p''
	G	32	53	85	0,82
	A	56	87	143	
	Total	88	140	228	

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). p' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. p'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

5.2.2.2 rs77856193

A outra variante sinônima foi o rs77856193, c.759C>T (figura 5.5) presente no exon 2. Ela foi encontrada em três indivíduos, dois com CaP de 74 anos e 57 anos e um indivíduo controle de 67 anos. A análise de predição determinou que essa alteração não tem impacto na função da proteína, mas que pode estar em um sítio relevante para o *splicing* de acordo com a ferramenta *Human Splicing Finder*.

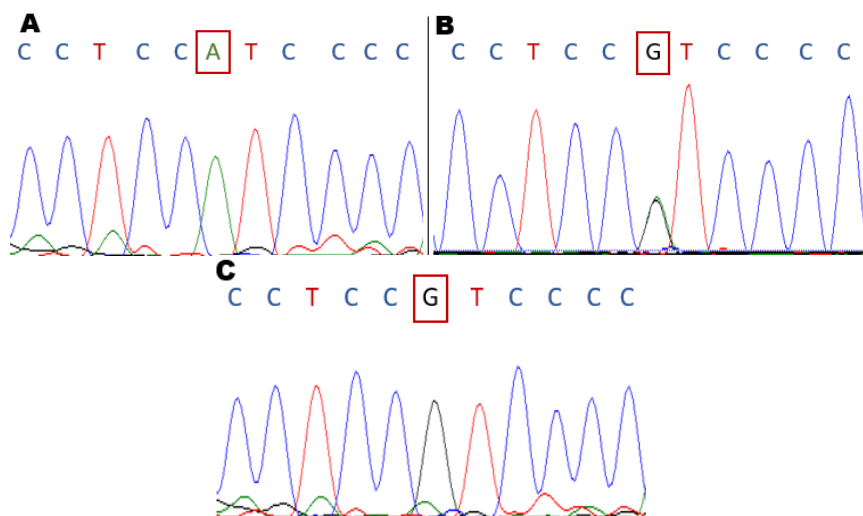
Figura 5.5 – Eletroferogramas da alteração rs77856193 do *FMOD*



5.2.3 Análise da Variante Intrônica do *FMOD*

A única variante intrônica encontrada foi a rs1891180, c.980-114A>G (figura 5.6), que está presente entre os exons 2 e 3. Na nossa casuística, essa alteração foi observada em 41 indivíduos controles (55,41%), 58 com HPB (69,05%) e 30 com CaP (62,50%). A análise de predição classificou essa variante como benigna e sem impacto no *splicing*.

Figura 5.6 – Eletroferogramas da alteração rs1891180 do *FMOD*



Por se tratar de uma variante polimórfica foi testado o equilíbrio de Hardy-Weinberg, e só os grupos HPB e CaP apresentaram equilíbrio. Além disso, nas distribuições genóticas e alélicas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos amostrais (tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Distribuição genotípica e alélica do rs1891180 (*FMOD*) entre os grupos

SNP ID	Genótipo	HPB	Controle	Total	p'
	AA	26	33	59	0,07
	AG	38	21	59	
	GG	20	20	40	
	Total	84	74	158	
	p (H-W)	0,41	0,00		
Alelos	HPB	Controle	Total	p''	
	A	90	87	177	0,35
	G	78	61	139	
	Total	168	148	316	
Genótipo	CaP	Controle	Total	p'	
	AA	18	33	51	0,12
	AG	22	21	43	
	GG	8	20	28	
	Total	48	74	122	
	p (H-W)	0,08	0,00		
Alelos	CaP	Controle	Total	p''	
	A	58	87	145	0,80
	G	38	61	99	
	Total	96	148	244	
Genótipo	CaP	HPB	Total	p'	
	AA	18	26	44	0,57
	AG	22	38	60	
	GG	8	20	28	
	Total	48	84	132	
	p (H-W)	0,08	0,41		
Alelos	CaP	HPB	Total	p''	
	A	58	90	148	0,28
	G	38	78	116	
	Total	96	168	264	

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). p' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. p'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

5.3 Análise dos Polimorfismos dos Genes Candidatos

5.3.1 *GSTPI* (rs1695)

No teste de equilíbrio genético de Hardy-Weinberg foi observado que os grupos HPB e controle se ajustaram ao modelo de equilíbrio ($p > 0,05$), ao passo que o grupo CaP se apresentou com desvio significativo ($p < 0,05$) para o polimorfismo rs1695 (A>G).

Na análise de distribuição genotípica foi encontrada associação significativa entre os grupos CaP e controle e entre os grupos CaP e HPB. Além disso, analisando os alelos, os portadores do alelo mutante G apresentam quase duas vezes mais risco de desenvolver CaP em comparação a HPB (OR = 1,80; IC 95% = 1,1 – 2,94) (tabela 5.7). Todas essas análises foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

Tabela 5.7 – Distribuição genotípica e alélica do rs1695 (*GSTPI*) entre os grupos

SNP ID	Genótipo	HPB	Controle	Total	p'
	AA	77	47	124	
	AG	45	39	84	0,35
	GG	11	11	22	
	Total	133	97	230	
	p (H-W)	0,50	0,80		
	Alelos	HPB	Controle	Total	p''
	A	199	133	332	
	G	67	61	128	0,14
	Total	266	194	460	
rs1695					
(<i>GSTPI</i>)	Genótipo	CaP	Controle	Total	p'
	AA	14	47	61	
	AG	33	39	72	0,00
	GG	2	11	13	
	Total	49	97	146	
	p (H-W)	0,01	0,80		
	Alelos	CaP	Controle	Total	p''
	A	61	133	194	
	G	37	61	98	0,28
	Total	98	194	292	

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). p' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. p'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

Tabela 5.7 – Distribuição genotípica e alélica do rs1695 (*GSTP1*) entre os grupos (continuação)

SNP ID	Genótipo	CaP	HPB	Total	<i>p</i> '
rs1695 (<i>GSTP1</i>)	AA	14	77	91	0,00
	AG	33	45	78	
	GG	2	11	13	
	Total	49	133	182	
	<i>p</i> (H-W)	0,01	0,50		
	Alelos	CaP	HPB	Total	<i>p</i> ''
	A	61	199	280	0,01
G	37	67	104		
Total	98	266	364		

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). *p*' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. *p*'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

Após a partição do qui-quadrado foi encontrada uma associação significativa no modelo mutante dominante (AA *versus* AG+GG) entre os grupos CaP e controle, mostrando que o genótipo conjunto AG+GG apresenta mais de duas vezes mais risco de desenvolver o CaP (OR = 2,30; IC 95% = 1,12 – 4,73). Observação similar foi encontrada quando comparado os grupos CaP e HPB (OR = 3,36; IC 95% = 1,68 – 6,71) (tabela 5.8).

Tabela 5.8 – Análise de risco entre os grupos amostrais (Modelo Mutante Dominante)

SNP ID	Genótipo	CaP	Controle	Total	<i>p</i>	OR	IC 95%
rs1695 (<i>GSTP1</i>)	AA	14	47	61			Referência
	AG+GG	35	50	85	0,02	2,30	1,12 4,73
	Total	49	97	146			
	Genótipo	CaP	HPB	Total	<i>p</i>	OR	IC 95%
	AA	14	77	91			Referência
	AG+GG	35	56	91	0,00	3,36	1,68 6,71
	Total	49	133	182			

p é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos do modelo mutante dominante. As comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado. **OR**: *odds ratio*; **IC 95%**: intervalo de confiança de 95%.

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para estudar os possíveis efeitos do polimorfismo sobre as variáveis quantitativas em cada um dos grupos (controle, HPB e CaP). Os resultados dessa análise não apresentaram associações significativas (apêndice C). A comparação das variáveis qualitativas com os genótipos foi avaliada pelo teste do qui-quadrado e apenas o nível de PSA dos indivíduos com CaP apresentou diferença

significativa entre os diferentes níveis e genótipos, $p=0,01$ (tabela 5.9). As outras variáveis qualitativas constam no apêndice D.

Tabela 5.9 – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1695 (*GSTP1*)

SNP ID	Níveis de PSA – HPB				
Genótipo	<4 (%)	4-10 (%)	>10 (%)	Total	<i>p</i>
AA	39 (53)	8 (38)	4 (67)	51	0,56
AG	26 (36)	11 (52)	2 (33)	39	
GG	8 (11)	2 (10)	0 (0)	10	
Total	73	21	6	100	

rs1695 (<i>GSTP1</i>)	Níveis de PSA – CaP				
Genótipo	<4 (%)	4-10 (%)	>10 (%)	Total	<i>p</i>
AA	4 (80)	2 (18)	6 (25)	12	0,01
AG	1 (20)	7 (64)	18 (75)	26	
GG	0 (0)	2 (18)	0 (0)	2	
Total	5	11	24	40	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL.

5.3.2 *KLK3* (rs1058205)

Avaliando o equilíbrio de Hardy-Weinberg, todos os grupos amostrais se apresentaram em equilíbrio para o polimorfismo rs1058205 (C>T).

Na análise de distribuição genotípica e alélica não foram encontradas associações significativas entre os grupos (tabela 5.10). Ademais, nenhuma diferença estatística foi encontrada nas comparações entre os genótipos e as variáveis quantitativas (apêndice E) e qualitativas (apêndice F).

Tabela 5.10 – Distribuição genotípica e alélica do rs1058205 (*KLK3*) entre os grupos

SNP ID	Genótipo	HPB	Controle	Total	p'
rs10582015 (<i>KLK3</i>)	CC	13	7	20	0,65
	CT	47	32	79	
	TT	73	59	132	
	Total	133	98	231	
	p (H-W)	0,43	0,67		
	Alelos	HPB	Controle	Total	p''
	C	73	46	119	0,33
	T	193	150	343	
	Total	266	196	462	
	Genótipo	CaP	Controle	Total	p'
CC	6	7	13	0,57	
CT	16	32	48		
TT	27	59	86		
Total	49	98	147		
p (H-W)	0,37	0,67			
Alelos	CaP	Controle	Total	p''	
C	28	46	74	0,34	
T	70	150	220		
Total	98	196	294		
Genótipo	CaP	HPB	Total	p'	
CC	6	13	19	0,87	
CT	16	47	63		
TT	27	73	100		
Total	49	133	182		
p (H-W)	0,37	0,43			
Alelos	CaP	HPB	Total	p''	
C	28	73	101	0,83	
T	70	193	263		
Total	98	266	364		

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). p' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. p'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

5.3.3 *RNASEL* (rs486907)

No teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado que todos os grupos se apresentaram em equilíbrio para o SNP rs486907 (G>A). E na análise das distribuições das frequências genotípicas e alélicas não foram observadas associações estatísticas entre os grupos amostrais (tabela 5.11).

Tabela 5.11 – Distribuição genotípica e alélica do rs486907 (RNASEL) entre os grupos

SNP ID	Genótipo	HPB	Controle	Total	p'
	GG	77	58	135	0,68
	GA	47	36	83	
	AA	9	4	13	
	Total	133	98	231	
	p (H-W)	0,88	0,86		
Alelos	HPB	Controle	Total	p''	
	G	201	152	353	0,62
	A	65	44	109	
	Total	266	196	462	
Genótipo	CaP	Controle	Total	p'	
	GG	32	58	90	0,33
	GA	13	36	49	
	AA	4	4	8	
	Total	49	98	147	
	p (H-W)	0,33	0,86		
Alelos	CaP	Controle	Total	p''	
	G	77	152	229	0,84
	A	21	44	65	
	Total	98	196	294	
Genótipo	CaP	HPB	Total	p'	
	GG	32	77	109	0,53
	GA	13	47	60	
	AA	4	9	13	
	Total	49	133	182	
	p (H-W)	0,33	0,88		
Alelos	CaP	HPB	Total	p''	
	G	77	201	278	0,55
	A	21	65	86	
	Total	98	266	364	

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). p' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. p'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

Na análise dos níveis de PSA para o grupo de CaP foi verificada uma tendência de associação entre os diferentes grupos ($p=0,05$) (tabela 5.12). As outras análises realizadas com as variáveis quantitativas e qualitativas encontram-se no apêndice G e H, respectivamente, visto que não foram encontradas associações com os grupos e nem com os genótipos.

Tabela 5.12 – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs486907 (RNASEL)

SNP ID	Níveis de PSA – HPB				
Genótipo	<4 (%)	4-10 (%)	>10 (%)	Total	<i>p</i>
GG	43 (59)	11 (52)	3 (50)	57	0,75
GA	24 (33)	7 (33)	3 (50)	34	
AA	6 (8)	3 (14)	0 (0)	9	
Total	73	21	6	100	
rs486907 (RNASEL)	Níveis de PSA – CaP				
Genótipo	<4 (%)	4-10 (%)	>10 (%)	Total	<i>p</i>
GG	1 (20)	9 (82)	15 (63)	25	0,05
GA	4 (80)	1 (9)	6 (25)	11	
AA	0 (0)	1 (9)	3 (13)	4	
Total	5	11	24	40	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL.

5.3.4 SRD5A2 (rs523349)

Todos os grupos amostrais se ajustaram ao modelo de equilíbrio genético de Hardy-Weinberg para o polimorfismo rs523349 (C>G).

Na análise de distribuição genotípica e alélica não foram encontradas associações significativas (tabela 5.13). Além disso, nenhuma associação foi observada nas análises das variáveis quantitativas (apêndice I) e qualitativas (apêndice J).

Tabela 5.13 – Distribuição genotípica e alélica do rs523349 (SRD5A2) entre os grupos

SNP ID	Genótipo	HPB	Controle	Total	<i>p'</i>
rs523349 (SRD5A2)	CC	61	40	101	0,30
	CG	52	47	99	
	GG	20	10	30	
	Total	133	97	230	
	<i>p</i> (H-W)	0,37	0,78		
	Alelos	HPB	Controle	Total	<i>p''</i>
	C	174	127	301	0,96
	G	92	67	159	
	Total	266	194	460	

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). *p'* é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. *p''* é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

Tabela 5.13 – Distribuição alélica e genotípica do rs523349 (SRD5A2) entre os grupos (continuação)

SNP ID	Genótipo	CaP	Controle	Total	p'	
	CC	25	40	65	0,31	
	CG	22	47	69		
	GG	2	10	12		
	Total	49	97	146		
	p (H-W)	0,57	0,78			
	Alelos	CaP	Controle	Total	p''	
	C	72	127	199	0,16	
	G	26	67	93		
	Total	98	194	292		
rs523349 (SRD5A2)	Genótipo	CaP	HPB	Total	p'	
	CC	25	61	86	0,13	
	CG	22	52	74		
	GG	2	20	22		
	Total	49	133	182		
		p (H-W)	0,57	0,37		
	Alelos	CaP	HPB	Total	p''	
	C	72	174	246	0,14	
	G	26	92	118		
	Total	98	266	364		

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). p' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. p'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

5.3.5 XRCC1 (rs25487)

No teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observado que os grupos controle e CaP se mostraram em equilíbrio, enquanto o HPB está em desequilíbrio para o polimorfismo rs25487 (A>G).

Foram encontradas associações na distribuição genotípica entre os grupos HPB e controle e os grupos CaP e HPB. Além do mais, na análise alélica entre o HPB e o controle também foi vista diferença significativa, indicando o alelo A como de risco para a HPB (OR = 1,64; IC 95% = 1,11 – 2,41) (tabela 5.14).

Tabela 5.14 – Distribuição genotípica e alélica do rs25487 (*XRCCI*) entre os grupos

SNP ID	Genótipo	HPB	Controle	Total	p'
	AA	14	6	20	
	AG	84	48	132	0,01
	GG	33	42	75	
	Total	131	96	227	
	p (H-W)	0,00	0,28		
Alelos	HPB	Controle	Total	p''	
	A	112	60	172	
	G	150	132	282	0,01
	Total	262	192	454	

Genótipo	CaP	Controle	Total	p'	
AA	6	6	12		
AG	20	48	68	0,66	
GG	23	42	65		
Total	49	96	145		
p (H-W)	0,88	0,28			
Alelos	CaP	Controle	Total	p''	
	A	32	60	92	
	G	66	132	198	0,81
	Total	98	192	290	

Genótipo	CaP	HPB	Total	p'	
AA	6	14	20		
AG	20	84	104	0,01	
GG	23	33	56		
Total	49	131	180		
p (H-W)	0,88	0,00			
Alelos	CaP	HPB	Total	p''	
	A	32	112	144	
	G	66	150	216	0,08
	Total	98	262	360	

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). p' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. p'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

Com a finalidade de encontrar os genótipos associados com as patologias, foi realizada a partição do qui-quadrado e dessa forma foi encontrada uma associação significativa no modelo mutante recessivo (AA+AG *versus* GG) entre os grupos HPB e controle, mostrando que o genótipo conjunto AA+AG apresenta o risco de desenvolver a

HPB (OR = 2,29; IC 95% = 1,31 – 4,00). Entre os grupos CaP e HPB observamos associação do genótipo mutado GG com o risco de CaP em comparação a HPB (OR = 2,61; IC 95% = 1,33 – 5,12) (tabela 5.15). Ainda, nas análises comparativas das variáveis quantitativas (apêndice K) e qualitativas (apêndice L) não foram encontradas associações significativas.

Tabela 5.15 – Análise de risco entre os grupos amostrais (Modelo Mutante Recessivo)

SNP ID	Genótipo	HPB	Controle	Total	<i>p</i>	OR	IC 95%	
rs25487 (XRCCI)	AA+AG	98	54	152	0,00	2,29	1,31 4,00	
	GG	33	42	75				Referência
	Total	131	96	227				
	Genótipo	CaP	HPB	Total	<i>p</i>	OR	IC 95%	
AA+AG	26	98	124	0,00	2,61	1,33 5,12		
GG	23	33	56					
Total	49	131	180					

p é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. As comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado. **OR:** *oddis rattoo*; **IC 95%:** intervalo de confiança de 95%.

5.3.6 CASC8 (rs1447295)

No teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) foi constatado que os grupos controle e CaP se apresentaram em equilíbrio, mas o HPB mostrou desvio significativo para o polimorfismo rs1447295 (A>C). Nas análises da distribuição genotípica e alélicas nenhuma associação foi identificada (tabela 5.16).

Tabela 5.16 – Distribuição genotípica e alélica do rs1447295 (CASC8) entre os grupos

SNP ID	Genótipo	HPB	Controle	Total	<i>p</i> '
rs1447295 (CASC8)	AA	8	3	11	0,34
	AC	28	27	55	
	CC	96	67	163	
	Total	132	97	229	
	<i>p</i> (H-W)	0,02	0,99		
Alelos	HPB	Controle	Total	<i>p</i> ''	
A	44	33	77	0,92	
C	220	161	381		
Total	264	194	458		

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). *p*' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. *p*'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

Tabela 5.16 – Distribuição genotípica e alélica do rs1447295 (CASC8) entre os grupos (continuação)

SNP ID	Genótipo	CaP	Controle	Total	p'
	AA	2	3	5	0,13
	AC	6	27	33	
	CC	39	67	106	
	Total	47	97	144	
	p (H-W)	0,08	0,99		
	Alelos	CaP	Controle	Total	p''
	A	10	33	43	0,15
	C	84	161	245	
	Total	94	194	288	
rs1447295 (CASC8)	Genótipo	CaP	HPB	Total	p'
	AA	2	8	10	0,37
	AC	6	28	34	
	CC	39	96	135	
	Total	47	132	179	
	p (H-W)	0,08	0,02		
	Alelos	CaP	HPB	Total	p''
	A	10	44	54	0,16
	C	84	220	304	
	Total	94	264	358	

p é o valor de significância no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W). p' é o valor de significância na comparação da distribuição genotípica entre os grupos. p'' é o valor de significância na comparação alélica entre os grupos. Todas as comparações foram realizadas através do teste do qui-quadrado.

Na análise de comparação das variáveis quantitativas com as amostras e os diferentes genótipos do rs1447295 foi identificada associação significativa para o peso da próstata no grupo HPB, sinalizando aumento progressivo dessa variável para o genótipo heterozigótico (AC) e mutado (CC). Também foi observado aumento considerável de IMC para os indivíduos com CaP e portadores do genótipo CC (tabela 5.17).

Tabela 5.17 – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs1447295 (CASC8)

Variáveis	Controle – rs1447295 (CASC8)			p
	AA	AC	CC	
IMC (kg/m ²)	25,61 (23,88;29,04)	25,61 (23,74;27,81)	26,47 (24,02;29,32)	0,94
PSA_{total} (ng/mL)	2,23 (2,23;2,23)	0,87 (0,59;1,68)	0,97 (0,52;1,79)	0,39
PSA_{livre} (ng/mL)	–	0,23 (0,14;0,35)	0,35 (0,18;0,49)	0,26
Peso da Próstata* (g)	26,00 (26,00;26,00)	27,00 (23,25;30,15)	30,00 (2,00;43,00)	0,78

Variáveis	HPB – rs1447295 (CASC8)			p
	AA	AC	CC	
IMC (kg/m ²)	26,17 (25,36;30,74)	25,90 (23,15;28,48)	26,03 (23,61;28,73)	0,49
PSA_{total} (ng/mL)	1,62 (0,93;2,83)	1,95 (1,05;2,81)	2,61 (1,10;5,60)	0,53
PSA_{livre} (ng/mL)	0,51 (0,28;0,66)	0,48 (0,21;0,78)	0,52 (0,18;1,05)	0,88
Peso da Próstata* (g)	32,20 (29,50;40,60)	41,00 (34,00;51,50)	49,70 (39,50;69,00)	0,04

Variáveis	CaP – rs1447295 (CASC8)			p
	AA	AC	CC	
IMC (kg/m ²)	18,28 (21,26;24,24)	23,59 (22,66;24,50)	27,28 (25,31;30,61)	0,03
PSA_{total} (ng/mL)	31,81 (31,81;31,81)	12,69 (9,77;28,12)	12,51 (5,46;23,47)	0,57
PSA_{livre} (ng/mL)	2,91 (2,91;2,91)	1,70 (1,08;2,33)	1,03 (0,63;1,90)	0,37
Peso da Próstata* (g)	51,00 (51,00;51,00)	32,00 (21,00;43,00)	35,55 (29,50;64,05)	0,56

Os valores indicam a mediana (1º quartil; 3º quartil). *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste de Kruskal-Wallis. **IMC**: índice de massa corporal; **PSA**: antígeno específico da próstata. *Peso da próstata foi avaliado por ultrassonografia transretal.

A comparação das variáveis qualitativas com os genótipos do rs1447295 foi significativa entre a cor/raça e o CaP, mostrando que há diferença entre os grupos (tabela 5.18). As outras análises qualitativas não apresentaram associação e constam no apêndice M.

Tabela 5.18 – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1447295 (CASC8)

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – HPB					
	Genótipo	Branca (%)	Parda (%)	Preta (%)	Total	<i>p</i>
rs1447295 (CASC8)	AA	0 (0)	3 (7)	5 (12)	8	0,15
	AC	8 (20)	8 (18)	11 (26)	27	
	CC	33 (80)	34 (76)	26 (62)	93	
	Total	41	45	42	128	
	Cor/Raça (IBGE) – CaP					
	Genótipo	Branca (%)	Parda (%)	Preta (%)	Total	<i>p</i>
	AA	0 (0)	0 (0)	2 (20)	2	0,04
	AC	3 (17)	1 (5)	2 (20)	6	
	CC	15 (83)	18 (95)	6 (60)	39	
	Total	18	19	10	47	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado.

5.3.7 Análise da Regressão Logística Multivariada

Quando realizada a análise de regressão linear multivariada (corrigindo as variáveis por idade) foi observado resultado semelhante aos descritos acima. O polimorfismo rs1695 (*GSTPI*) confirmou a associação significativa com o CaP, tanto quando comparados com indivíduos sem câncer ($p = 0,05$; OR = 1,65; IC 95% = 1,00 – 2,72), quanto com a HPB ($p = 0,02$; OR = 1,90; IC 95% = 1,11 – 3,26).

Do mesmo modo, o rs25487 (*XRCCI*) mostrou associação protetora em relação a HPB ($p = 0,00$; OR = 0,48; IC 95% = 0,29 – 0,79), indicando o alelo selvagem como o de risco. Além disso, também revelou esse papel quando comparado com o risco geral de desenvolvimento das patologias prostáticas ($p = 0,01$; OR = 0,57; IC 95% = 0,36 – 0,89) (tabela 5.19).

Tabela 5.19 – Regressão Logística Multivariada

Análise logística do CaP x HPB+Controle							
Variável	B	EP	gl	p	OR	IC 95%	
Idade	0,07	0,02	1	0,00	1,08	1,04	1,12
rs1695 (<i>GSTPI</i>)	0,50	0,25	1	0,05	1,65	1,00	2,72

Análise logística do CaP x Controle							
Variável	B	EP	gl	p	OR	IC 95%	
Idade	0,17	0,03	1	0,00	1,18	1,11	1,26

Análise logística do CaP x HPB							
Variável	B	EP	gl	p	OR	IC 95%	
Idade	0,04	0,02	1	0,06	1,04	1,00	1,08
rs1695 (<i>GSTPI</i>)	0,64	0,28	1	0,02	1,90	1,11	3,26

Análise logística da HPB x Controle							
Variável	B	EP	gl	p	OR	IC 95%	
Idade	0,10	0,02	1	0,00	1,11	1,07	1,15
rs25487 (<i>XRCCI</i>)	-0,73	0,26	1	0,00	0,48	0,29	0,79

Análise logística das CaP+HPB x Controle							
Variável	B	EP	gl	p	OR	IC 95%	
Idade	0,12	0,02	1	0,00	1,12	1,08	1,17
rs25487 (<i>XRCCI</i>)	-0,57	0,23	1	0,01	0,57	0,36	0,89

B: indica o efeito da variável sobre o grupo; **EP:** erro padrão; **gl:** grau de liberdade; **p:** é o valor de significância da comparação entre os grupos, realizada através da análise de regressão logística multivariada; **OR:** *odds ratio*; **IC 95%:** intervalo de confiança de 95%.

5.4 Análise do Perfil de Expressão dos Genes Candidatos (*in silico*)

Para iniciar as análises *in silico*, caracterizamos as coortes referentes ao CaP obtidas através do TCGA (tabela 5.20). A coorte TS é composta por 51 amostras pareadas e a VS por 445 amostras tumorais (excluindo as tumorais pareadas). Os dados clínicos analisados foram: idade ao diagnóstico (variando de 42 a 78 anos), PSA total pré-operatório (variando de 0,7 a 107 ng/mL) e score de Gleason calculado a partir da soma dos scores primário e secundário (variando de 6 a 10).

Nas duas coortes a maioria dos indivíduos apresentaram idade superior a 55 anos e PSA entre 4 e 10 ng/mL. Entretanto o score de Gleason diferiu entre as coortes, sendo o 7(3+4) mais comum na TS e o score de 8 a 10 na VS.

Tabela 5.20 – Caracterização das coortes de CaP do TCGA

	<i>Training Set</i>	<i>Validation Set</i>	Total
	N (%)	N (%)	
Pacientes	51 (100)	445 (100)	496
Idade ao Diagnóstico (anos)	51 (100)	433 (100)	484
≤55	14 (27,5)	92 (21,2)	106
>55	37 (72,5)	341 (78,8)	678
Níveis de PSA (ng/mL)	51 (100)	430 (100)	481
<4	6 (11,8)	47 (10,9)	53
4–10	31 (60,8)	245 (57)	276
>10	14 (27,4)	138 (32,1)	152
Score de Gleason	51 (100)	433 (100)	484
6	5 (9,8)	45 (10,4)	50
7 (3+4)	25 (49)	122 (28,2)	147
7 (4+3)	13 (25,5)	82 (18,9)	95
8–10	8 (15,7)	184 (42,5)	192

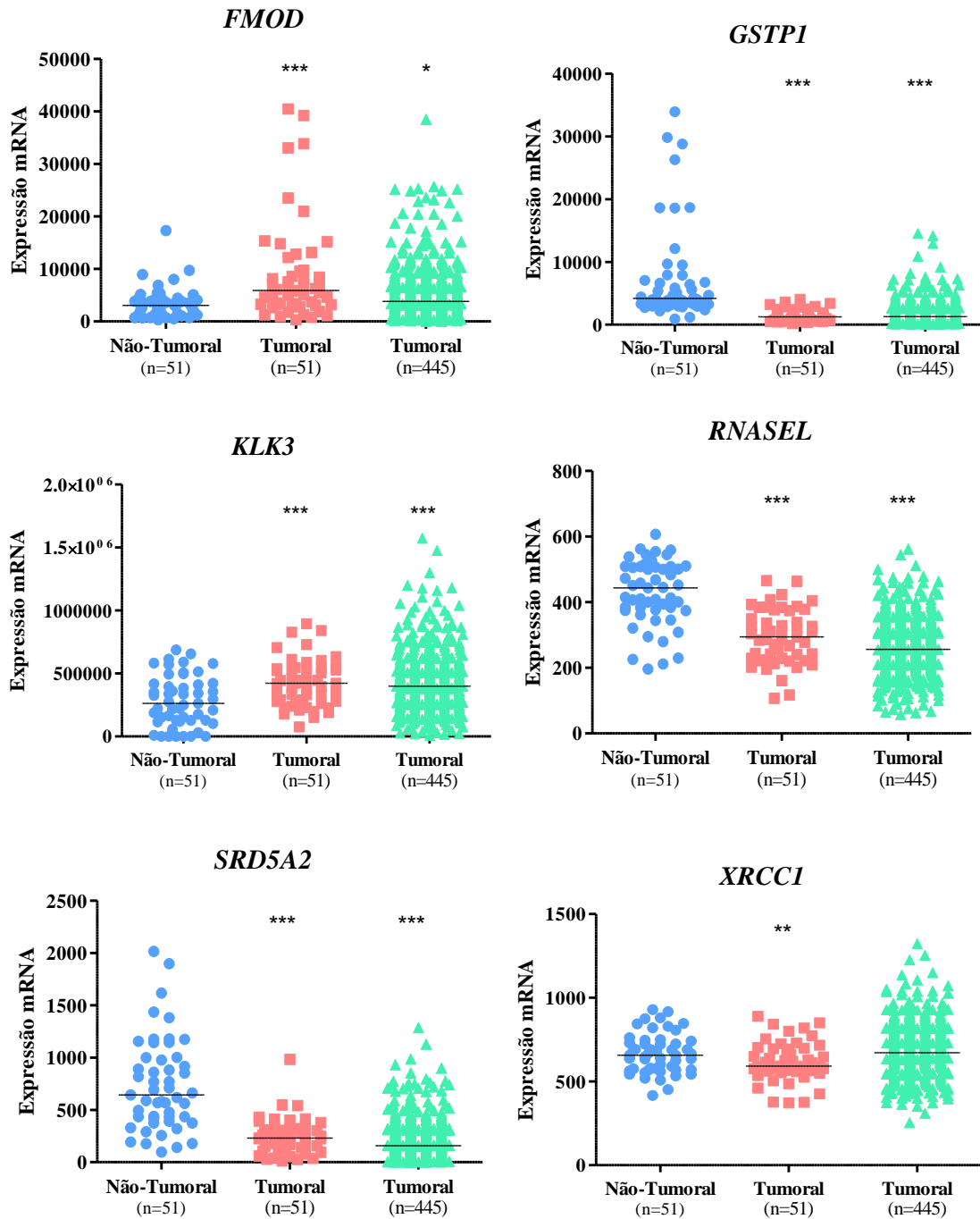
Caracterização das coortes de pacientes diagnosticados com CaP do banco TCGA. Os valores indicam o número de indivíduos em cada um dos grupos. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10. **N**: número de indivíduos.

5.4.1 Análise do Perfil de Expressão Gênica em Tecido de Próstata

Para a análise do perfil de expressão dos genes candidatos (*FMOD*, *GSTP1*, *KLK3*, *RNASEL*, *SRD5A2* e *XRCC1*) entre tecidos prostáticos tumorais e não-tumorais foram utilizados dados de RNAseq depositados no banco de dados do TCGA (figura 5.7). A comparação do perfil de expressão para cada gene candidato foi realizada entre as amostras pareadas não-tumorais (n=51) e as pareadas tumorais (n=51) – coorte TS, tendo a significância estatística analisada através do teste de Wilcoxon. Além dessa, também foi feita a comparação entre as amostras pareadas não-tumorais (n=51) e as tumorais não pareadas (n=445) – coorte VS, sendo avaliada pelo teste de Mann-Whitney.

Analisando os dados de expressão foi possível observar que o *FMOD* e o *KLK3* apresentaram alta expressão em tecidos tumorais em ambas as coortes do estudo (TS e VS). Todavia os genes *GSTP1*, *RNASEL*, *SRD5A2* e *XRCC1* apresentaram baixa expressão nos tecidos tumorais, em ambas as coortes, com exceção do *XRCC1* que só mostrou significância na coorte TS.

Figura 5.7 – Perfil de expressão dos genes candidatos em amostras tumorais e não-tumorais de próstata



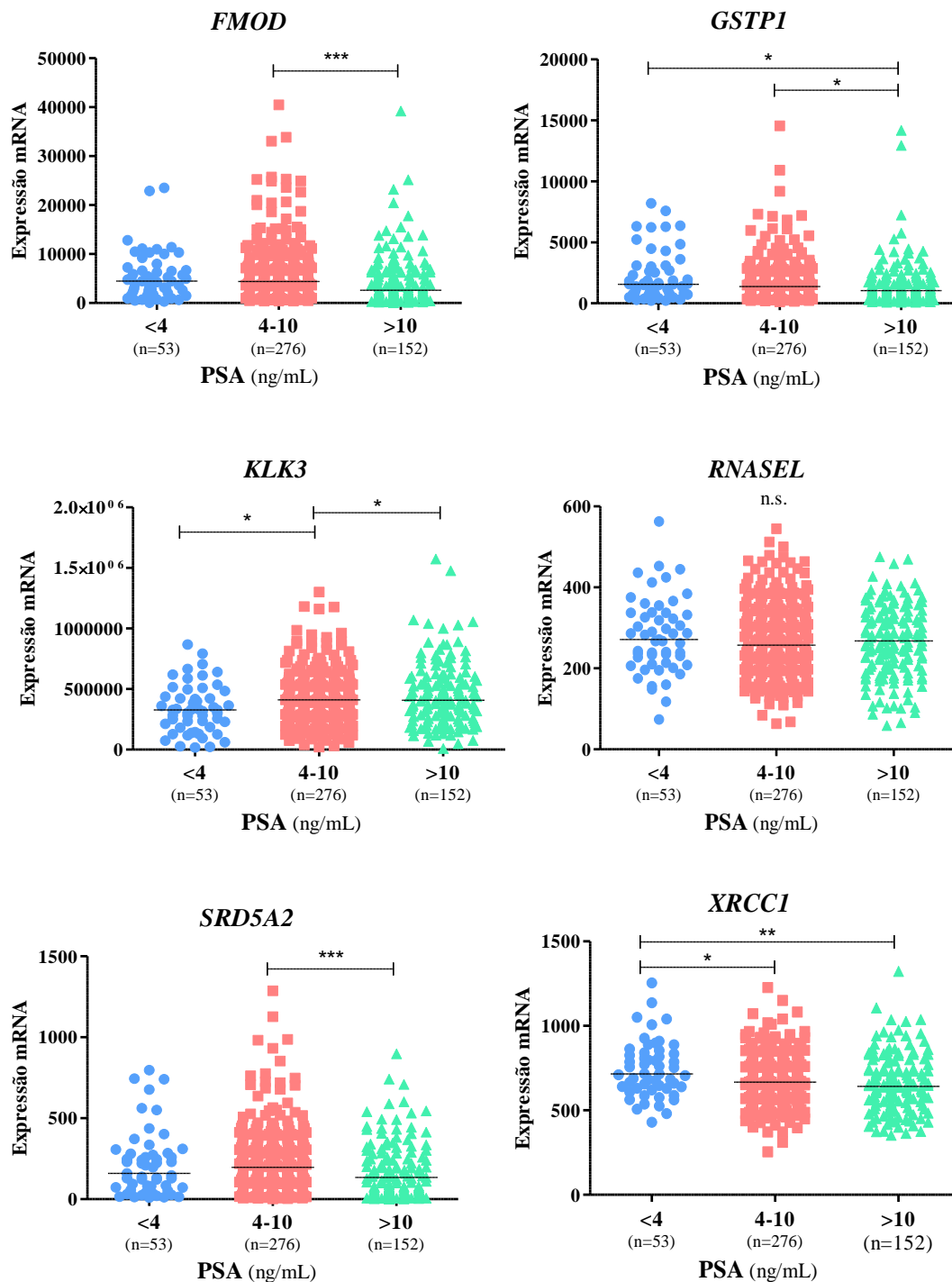
O eixo y representa o nível de expressão do mRNA (RNAseq V2) dos genes candidatos e o eixo x as diferentes amostras do TCGA: amostras não-tumorais pareadas (n=51), tumorais pareadas (n=51) e tumorais não pareadas (n=445). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ são os valores de significância das diferenças entre os grupos, avaliados através do teste de Wilcoxon para as amostras pareadas e do teste de Mann-Whitney para as não pareadas.

5.4.2 Correlação entre o Perfil de Expressão dos Genes e os Dados Clínicos/Patológicos

A correlação da expressão dos genes candidatos com os níveis de PSA foi realizada segregando as amostras tumorais (n=481, inclusas aqui todas as tumorais, tanto as pareadas quanto as não pareadas) em 3 grupos (figura 5.8). O primeiro grupo correspondendo as amostras com PSA abaixo de 4 ng/mL, o segundo inclui as amostras com PSA entre 4 e 10 ng/mL e o último apresenta PSA mais elevado com valores acima de 10 ng/mL. Para avaliar a diferença estatística entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

Os genes *FMOD* e *SRD5A2* apresentaram diferença de expressão entre as amostras com PSA de 4–10 e maiores que 10 ng/mL, estando mais baixa nos indivíduos com PSA maior que 10. Analisando individualmente, o *GSTP1* apresentou diferença significativa de expressão entre os indivíduos que possuem PSA menor que 4 e os que tem PSA maior que 10 ng/mL, estando diminuída no grupo de maior PSA. No *KLK3*, a diferença foi encontrada entre o grupo com PSA menor que 4 e 4–10 ng/mL, apresentando maior expressão neste último grupo. Enquanto o perfil de expressão do *XRCC1* apresentou diferença estatística entre todos os grupos, mostrando uma tendência de diminuição da expressão quando o PSA é maior. Por fim, o perfil de expressão do *RNASEL* não mostrou diferenças estatísticas significativas entre os grupos de PSA.

Figura 5.8 – Correlação entre a expressão dos genes candidatos e os níveis de PSA de pacientes com CaP

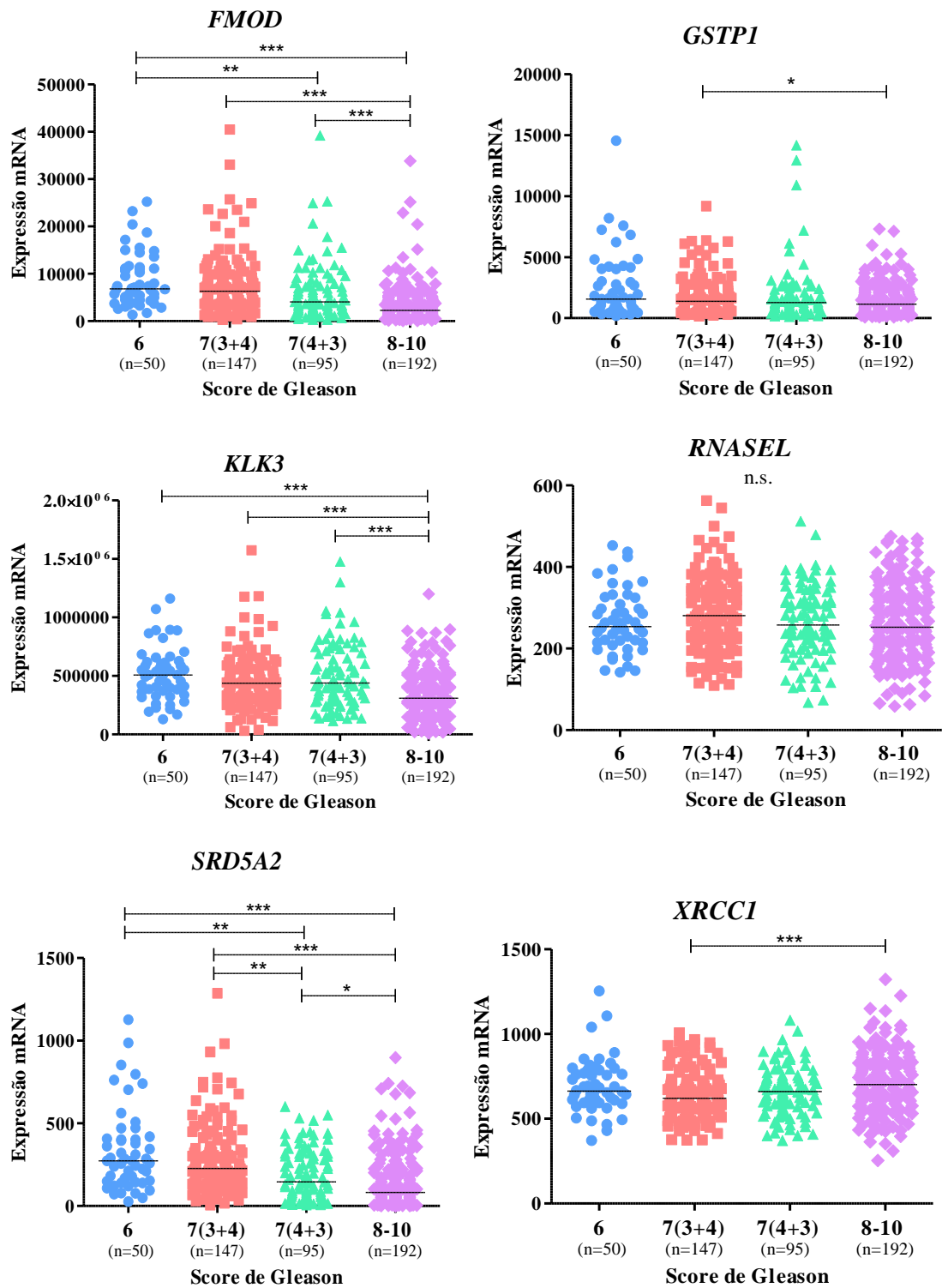


O eixo y representa o nível de expressão do mRNA (RNAseq V2) dos genes candidatos e o eixo x os níveis de PSA de pacientes com CaP do TCGA (n=481): PSA abaixo de 4 ng/mL (n=53), entre 4 e 10 ng/mL (n=276) e maiores que 10 ng/mL (n=152). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ são os valores de significância das diferenças entre os grupos, avaliados através do teste de Kruskal-Wallis.

Para a correlação da expressão dos genes com o score de Gleason, as amostras tumorais (n=484) foram segregadas em 4 grupos (figura 5.9). O primeiro grupo corresponde a pacientes com score total de 6, o segundo apresenta score total de 7 com somatório do primário e secundário em 3+4, o terceiro tem total 7 com somatório 4+3 e por fim, o quarto grupo tem score total mais grave variando de 8 a 10. A análise realizada para avaliar a diferença estatística entre os grupos foi a de Kruskal-Wallis.

Os genes *FMOD* e *SRD5A2* apresentaram diferenças significativas de expressão entre todos os grupos do score de Gleason. Em ambos os genes a expressão apresenta diminuição de acordo com o aumento do score, além disso eles demonstraram interessante diferença entre os scores 7(3+4) e 7(4+3), que até hoje não possuem uma boa definição prognóstica. Na análise do *KLK3* foi visto uma redução da expressão no grupo com score 8–10, com pior prognóstico, em comparação com os outros grupos. Ademais, a única associação encontrada no *GSTP1* e no *XRCCI* foi entre os grupos 7(3+4) e 8–10. No *RNASEL* nada foi encontrado. Potencialmente, o perfil de expressão dos genes poderia atuar como biomarcador de prognóstico dos pacientes.

Figura 5.9 – Correlação entre o perfil de expressão dos genes candidatos e o score de Gleason de pacientes com CaP

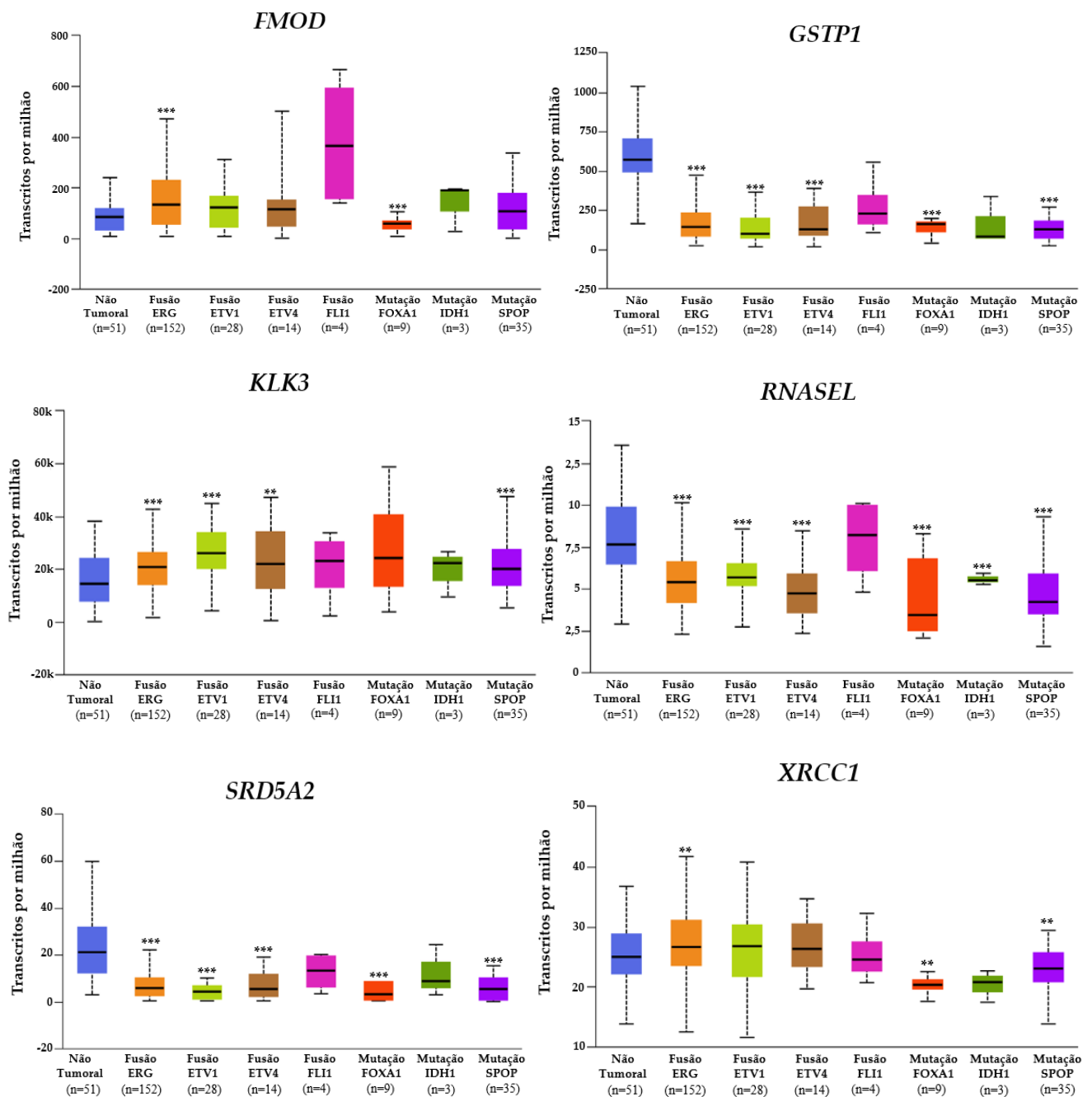


O eixo y representa o nível de expressão do mRNA (RNAseq V2) dos genes candidatos e o eixo x os diferentes níveis do score de Gleason de pacientes com CaP do TCGA (n=484) organizados nos seguintes grupos: Gleason 6 (n=50), 7(3+4) (n=147), 7(4+3) (n=95) e 8 a 10 (n=192). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ são os valores de significância das diferenças entre os grupos, avaliados através do teste de Kruskal-Wallis.

A correlação do perfil de expressão com o subtipo molecular dos pacientes com CaP (n=245) foi avaliada dividindo-os em sete subtipos moleculares definidos por fusão gênica *ERG*, *ETV1*, *ETV4* e *FLI1*, além de mutações nos genes *SPOP*, *FOXA1* e *IDH1* (*UALCAN*). A amostra não-tumoral (n=51) foi utilizada como controle para avaliar a diferença estatística entre os grupos através do teste *t* de Student.

Analisando os resultados (figura 5.10), os genes *FMOD* e *XRCCI* apresentaram aumento de expressão no subtipo fusão-ERG e diminuição no subtipo mutação-FOXA1, além disso o *XRCCI* também se mostrou diminuído no SPOP. A expressão dos genes *GSTP1*, *RNASEL* e *SRD5A2* se apresentou diminuída em praticamente todos os subtipos moleculares tanto nos de fusão quanto nos de mutação. Além do mais o *KLK3* apresentou alta expressão em grande parte dos subtipos de fusão e no de mutação-SPOP.

Figura 5.10 – Correlação do perfil de expressão dos genes candidatos e o subtipo molecular de pacientes com CaP



O eixo y representa transcritos por milhão (TPM) e o eixo x os diferentes subtipos moleculares dos pacientes com CaP do TCGA (n=245) (*UALCAN*). O subtipo molecular foi dividido da seguinte forma: fusão-ERG (n=152), fusão-ETV1 (n=28), fusão-ETV4 (n=14), fusão-FLI1 (n=4), mutação-FOXA1 (n=9), mutação-IDH1 (n=3) e mutação-SPOP (n=35). E ainda, uma amostra não-tumoral de próstata (n=51) foi usada como controle. **p<0,01 e ***p<0,0001 são os valores de significância das diferenças entre os grupos, avaliados através do teste t de Student.

5.4.3 Análise do PAN-Câncer

A análise de PAN-Câncer engloba dados de expressão de 24 tipos de tecidos primários tumorais (n=8609) e não-tumorais (n=738) (apêndice B), ela foi utilizada com a finalidade de avaliar se o perfil de expressão dos genes candidatos é exclusivamente observado nos tumores prostáticos ou se é comum a outros tipos tumorais, para tal análise foi utilizado o programa *UALCAN*.

Comparando os níveis de expressão dos diferentes tipos de câncer (figura 5.11) observamos que o gene *FMOD* se mostrou com uma tendência a alta expressão na próstata se comparado aos outros tipos tumorais. O *KLK3* apresentou-se com alta expressão somente na próstata, o que valida a aplicação como potencial biomarcador deste órgão. O *SRD5A2* também apresentou alta expressão na próstata se comparado aos outros tecidos, com exceção do fígado e das vias biliares que mostraram o mesmo perfil de expressão. Nos outros genes analisados, *GSTP1*, *RNASEL* e *XRCC1*, não foi verificado nenhum comportamento diferenciado na expressão entre a próstata e os outros órgãos.

Figura 5.11 – Análise do perfil de expressão dos genes candidatos no PAN-Câncer

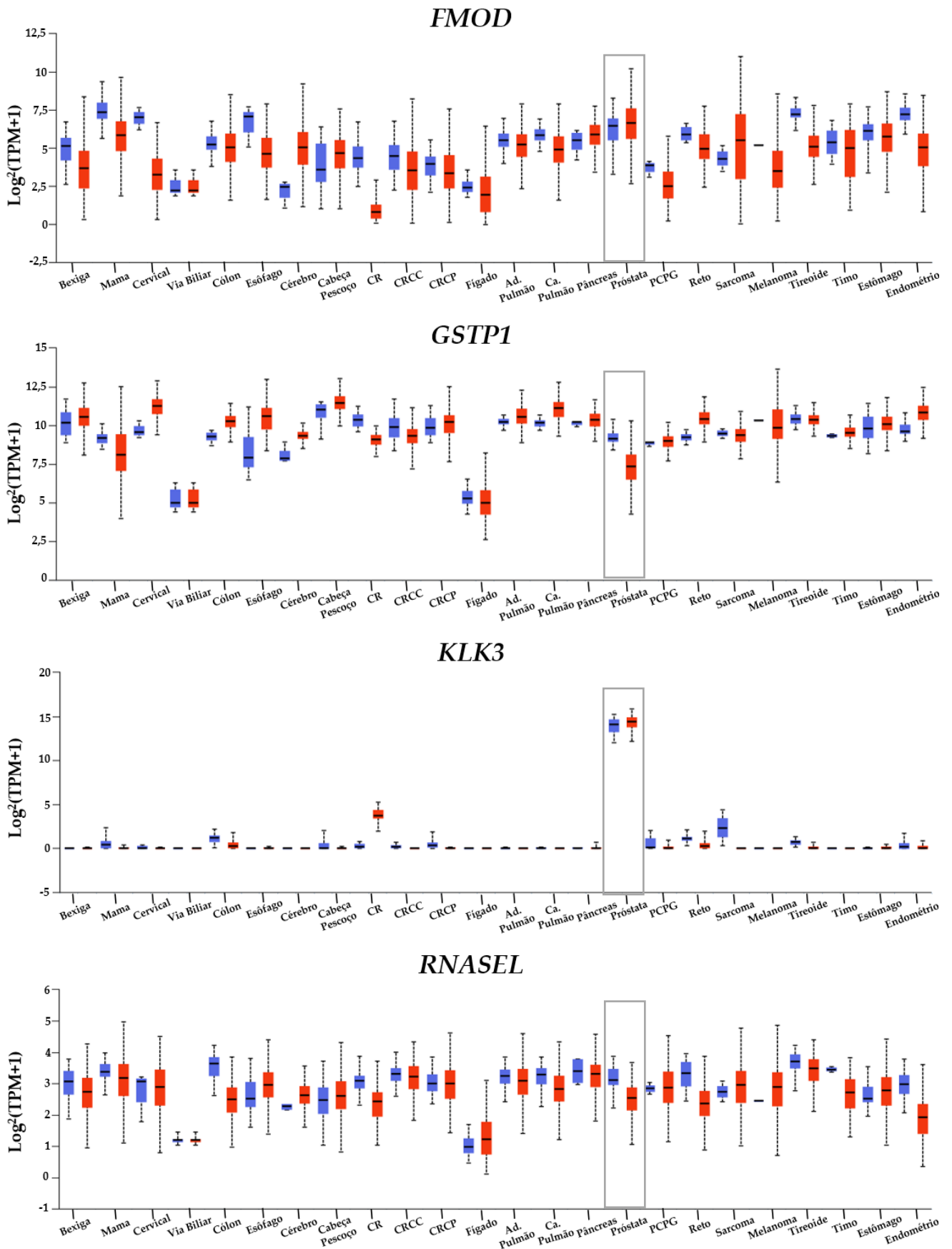
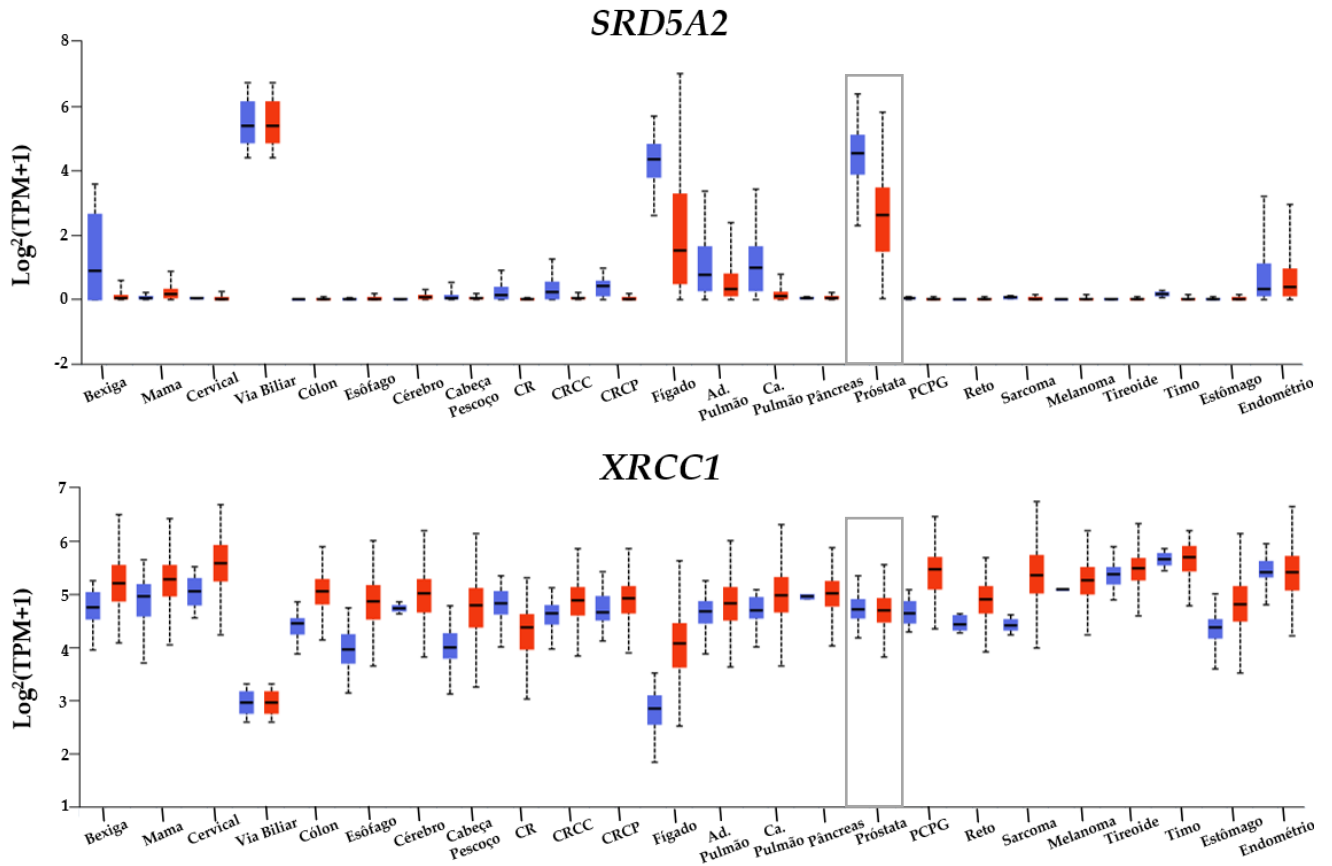


Figura 5.11 – Análise do perfil de expressão dos genes candidatos no PAN-Câncer (continuação)



Comparação do perfil de expressão dos genes candidatos entre diferentes amostras tumorais (caixa laranja) e não tumorais (caixa roxa) do PAN-Câncer. Dados gerados pelo programa *online* UALCAN. **TPM**: transcritos por milhão; **CR**: cromóforo renal; **CRCC**: carcinoma renal de células claras; **CRCP**: carcinoma renal de células papilares; **Ad.**: adenocarcinoma; **Ca.**: carcinoma; **PCPG**: feocromocitoma e paraganglioma.

5.5 Compilado das Alterações Genômicas

Compilação dos resultados das alterações encontradas no rastreamento do gene *FMOD*, da análise dos polimorfismos genéticos e do perfil de expressão observado para cada um dos genes candidatos (tabela 5.21).

Tabela 5.21 – Compilado das alterações genômicas observadas no estudo

Gene	Variante	Análise Genética	Perfil de Expressão no CaP	Expressão x PSA	Expressão x Score de Gleason	Expressão x Subtipo Molecular	PAN-Câncer
<i>FMOD</i>	rs139299015	Benigna	Alta expressão em tecido tumoral de próstata	Baixa expressão no PSA >10 ng/mL	Baixa expressão nos scores mais altos	Alta expressão no subtipo fusão-ERG e baixa na mutação-FOXA1	Tendência a alta expressão na próstata se comparado aos outros tipos tumorais.
	rs115908597	Patogênica					
	rs145901742	Patogênica					
	rs7543148	Benigna					
	rs77856193	Benigna					
	rs1891180	Intrônica					
<i>GSTP1</i>	rs1695	Aumenta o risco de CaP	Baixa expressão em tecido tumoral	Baixa expressão no PSA >10 ng/mL	Baixa expressão no score 8-10	Baixa expressão em todos os subtipos	Sem comportamento diferenciado
<i>KLK3</i>	rs1058205	Sem associação	Alta expressão em tecido tumoral	Alta expressão nos PSA mais altos	Baixa expressão no score 8-10	Alta expressão em grande parte dos subtipos de fusão	Alta expressão somente na próstata
<i>RNASEL</i>	rs486907	Sem associação	Baixa expressão em tecido tumoral	Sem associação	Sem associação	Baixa expressão em todos os subtipos	Sem comportamento diferenciado
<i>SRD5A2</i>	rs523349	Sem associação	Baixa expressão em tecido tumoral	Baixa expressão no PSA >10 ng/mL	Baixa expressão nos scores mais altos	Baixa expressão em todos os subtipos	Alta expressão na próstata se comparado aos outros tecidos
<i>XRCC1</i>	rs25487	Aumenta o risco de CaP	Baixa expressão em tecido tumoral	Baixa expressão nos PSA mais altos	Alta expressão no score 8-10	Alta expressão no subtipo fusão-ERG e baixa na mutação-FOXA1 e no SPOP	Sem comportamento diferenciado
<i>CASC8</i>	rs1447295	Aumenta o peso da próstata na HPB	–	–	–	–	–

Os resultados da **análise genética** englobam dados do rastreamento do *FMOD* e da análise de polimorfismos dos outros genes candidatos do estudo, que tiveram a associação com as patologias prostáticas avaliada através de testes do tipo caso-controle. Os resultados do **perfil de expressão** são baseados na comparação entre tecido tumoral e não tumoral de próstata. As avaliações de **expressão gênica versus as características clínicas** foram observadas comparando as subcategorias de cada característica, sendo 3 categorias para o PSA (PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e maiores que 10 ng/mL), 4 para o score de Gleason (Gleason 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10) e 7 para subtipo molecular (fusões ERG, ETV1, ETV4, FLI1 e mutações FOXA1, IDH1 e SPOP). Na análise **PAN-Câncer** 24 tipos de tecidos tumorais foram avaliados. Todos os dados constam com mais detalhe nos tópicos 5.1 a 5.4.

6 DISCUSSÃO

Considerando que o CaP é o segundo tipo de câncer que mais causa óbitos entre os homens no Brasil, é relevante tentar entender o porquê desse número, visto que as chances de cura são altas quando o diagnóstico é feito precocemente. Dito isso, é fundamental que os esforços para reduzir esse número se concentrem não só na conscientização de realizar exames periodicamente, mas em realizar pesquisas que se propõem a buscar variações genéticas que estejam associadas com o risco de desenvolver as doenças, melhorando a abordagem de rastreamento da população masculina.

O presente trabalho teve o intuito de avaliar não somente variantes genéticas na linhagem germinativa de genes candidatos, através de sangue de indivíduos com HPB ou CaP, buscando possíveis associações de risco de desenvolvimento das patologias, como também avaliar o perfil de expressão desses genes a nível tecidual, por meio do banco de dados TCGA, para ver se há expressão diferencial desses genes no CaP.

Rastreamento do *FMOD*

O gene *FMOD* possui papel fundamental em diversos processos fisiológicos e tem sido associado ao desenvolvimento de patologias como tendinopatias, câncer de mama, linfoma, câncer de pulmão e doenças ginecológicas (AL-QATTAN; AL-QATTAN, 2018). Contudo, em relação a próstata, ainda não se tem muitas informações sobre sua participação na carcinogênese, tendo sido recentemente relatado ao se destacar em uma análise com mais de 21 genes, em que ele apresentou expressão diferencial no tecido tumoral de próstata (BETTIN; REYES; REYES, 2016). Por estas razões, este gene foi selecionado para realizar o rastreamento de alterações em sua sequência e assim poder reforçar a sua influência no desenvolvimento no CaP.

O estudo de variações na extensão do gene *FMOD* foi conduzido em 84 indivíduos com HPB e 48 com CaP, além de 76 indivíduos sem doenças prostáticas. Este rastreamento levou a identificação de 5 alterações nos grupos patológicos, sendo duas mutações *missense*, duas sinônimas e uma intrônica (tabela 5.3 e 5.4, citadas anteriormente). Vale destaque o fato de que nenhuma dessas variações foi anteriormente relatada com associação a essas ou a outras patologias.

As duas mutações *missense*, rs115908597 e rs145901742, foram classificadas como patogênicas pelas ferramentas de predição e encontradas somente em indivíduos com os distúrbios prostáticos, possuindo frequência na nossa população de 1,6% e 0,49%, respectivamente. As frequências relatadas destoam da mundial que apresenta

valores de 0,3% e 0,2%, indicando que pode haver influência das patologias em questão nessas frequências (1000 GENOMES BROWSER - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>).

A alteração sinônima rs77856193 foi relatada em 2 indivíduos de cor parda e com CaP e em indivíduo controle de cor branca, na análise de predição ela foi classificada como benigna por não apresentar alteração de aminoácidos, mas a troca de bases pode estar em sítio de *splicing* de acordo com a ferramenta *Human Splicing Finder*, sendo assim, impossível descartar seu potencial efeito modificador na proteína.

As outras duas variantes apresentam comportamento de polimorfismo, sendo frequentes na população. A variante sinônima rs7543148 e a intrônica rs1891180 não se ajustaram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg na casuística, contudo suas frequências alélicas foram similares as da população mundial, a primeira apresentando 62% e a segunda 43% em comparação aos 62% e 50% da população mundial, respectivamente (1000 GENOMES BROWSER). Com relação ao efeito na proteína, todos os programas de predição classificaram as alterações como benignas e sem impacto em sítios de *splicing*. O SNP rs7543148 foi anteriormente estudado com outras patologias como no risco de rompimento do ligamento cruzado anterior e com miopia, e revelou não estar associado a essas doenças, além de não ter se ajustado ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, como no nosso estudo (LIN *et al.*, 2009; MANNION *et al.*, 2014).

Polimorfismos de Nucleotídeo Único

Desde o início dos estudos de associação ampla do genoma (GWAS), diversos grupos têm se dedicado a investigar a associação de polimorfismos com o risco de doenças complexas. Até hoje, mais de 160 SNPs já foram consistentemente associados com o risco de CaP, estando localizados em diversas regiões do genoma (SCHUMACHER *et al.*, 2018). Com a HPB há poucos trabalhos realizados, mas pelo menos 20 SNPs foram relacionados nos estudos de GWAS com o aumento de suscetibilidade a hiperplasia (GUDMUNDSSON *et al.*, 2018). Ainda estamos longe de compreender a participação das alterações genéticas com o desenvolvimento dessas patologias multifatoriais, sendo sempre necessário mais estudos, com maior abrangência de genes e de número amostral, além de populações diferentes para tentar chegar a um denominador comum. Dentro de diversos genes com vias biológicas importantíssimas, selecionamos seis SNPs para avaliar sua potencial associação com a HPB e o CaP.

Quando comparamos a frequência dos genótipos entre o controle e os grupos patológicos, dois SNPs apresentaram diferenças estatisticamente significativas. O primeiro deles foi o rs1695 (A>G) do *GSTP1*, em que os portadores de qualquer um dos genótipos, AG ou GG, tem duas vezes mais risco de desenvolver CaP quando comparados com indivíduos controles e 3 vezes mais risco quando comparados com os indivíduos com HPB. Esses achados foram confirmados na análise de regressão logística multivariada, na qual o polimorfismo do *GSTP1* continuou apresentando forte correlação positiva com o CaP em relação aos indivíduos sem câncer (grupo Controle + HPB) e aos indivíduos com HPB.

O rs1695 foi descrito pela primeira vez por Harries *et al.* em 1997, mostrando associação com a suscetibilidade ao câncer de bexiga, de testículo e de próstata, sendo neste último caracterizado por uma diminuição significativa no número de homozigotos selvagens (AA), assim como encontramos na nossa casuística uma redução de 48% do AA controle para 29% do AA com CaP. Mais tarde, outros estudos identificaram que essa alteração ocorria em um sítio ativo do gene, levando a diminuição da atividade da proteína codificada, diminuição da excreção de substâncias estranhas e da eficiência catalítica (DONG *et al.*, 2018).

Em conformidade com nossos resultados, outros trabalhos também encontraram relação entre esse SNP e o CaP em diferentes populações (MITTAL; MISHRA; MANDHANI, 2006; QADRI *et al.*, 2011, ZHANG *et al.*, 2016). Em duas metanálises incluindo mais de 6 mil indivíduos e 13 estudos diferentes, além da associação entre o polimorfismo do *GSTP1* e o risco de CaP, também foi encontrada uma correlação entre os caucasianos e o SNP, mas não entre os afrodescendentes (CAI *et al.*, 2013; YU *et al.*, 2013). Outros grupos também revelaram que o SNP está relacionado com maior risco de recorrência bioquímica (OR = 3,16, IC 95% = 1,13 – 8,02) e com o nível de PSA, estando associado com um pior prognóstico (COTIGNOLA *et al.*, 2013; OSKINA *et al.*, 2014a). Contudo, alguns trabalhos não encontraram diferenças estatisticamente significantes nas análises de frequência entre o grupo de casos e o de controles, mesmo em brasileiros do estado de São Paulo (LIMA *et al.*, 2008; MO *et al.*, 2009; WEI *et al.*, 2013; CHIRILÃ *et al.*, 2015). Sendo assim, este é o primeiro estudo nesta população e com associações positivas com o aumento do risco para o CaP.

O outro SNP que também mostrou associação significativa com as patologias é o rs25847 (A>G) do *XRCC1*, que apresentou comportamento peculiar nas análises. Na

partição dos grupos, descobrimos que os portadores do genótipo AA ou AG tem duas vezes maior risco de desenvolver HPB se comparado ao grupo controle, sendo confirmado na regressão logística o efeito protetor da troca de bases para essa patologia. Além desses resultados, encontramos que os portadores do genótipo GG (mutado) tem maior risco de desenvolver o CaP em relação a HPB ($p = 0,00$; OR = 2,61; IC 95% = 1,33 – 5,12). Esses achados mostram uma associação dupla desse polimorfismo com as patologias prostáticas, nesta casuística, os indivíduos que possuem genótipo mutado para o rs25487 tem maior risco de CaP, mas os que possuem o genótipo selvagem ou heterozigótico possuem maior risco de HPB, indicando que não só o polimorfismo tenha alguma relação com as doenças, mas o gene em si parece relevante na fisiopatologia.

Vários pesquisadores associaram este polimorfismo com o CaP, sugerindo que ele atue aumentando o risco da doença (MITTAL *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015). Mais recentemente, Nouredini *et al.* (2018) realizaram uma metanálise de 14 trabalhos e um estudo de caso-controle com 360 indivíduos e observaram que o SNP estava correlacionado com o risco de CaP e ainda, em uma análise *in silico*, essa troca de bases mostrou ser prejudicial para a função e estrutura da proteína XRCC1. Analisando modelos genéticos, outros grupos encontraram resultados similares aos nossos, em que o modelo recessivo (GG) do rs25487 estava associado com aumento do risco de CaP (GENG *et al.*, 2009; YAN *et al.*, 2015). Apesar desses resultados correlacionando o SNP e o CaP, ainda há trabalhos com dados conflitantes como o de Henríquez-Hernández *et al.* (2013) e de Zhu *et al.* (2015) que não obtiveram a mesma associação em suas análises. Além do mais, nenhum trabalho foi publicado mostrando a relação entre a variante e a HPB, nem de forma positiva ou negativa.

Ainda que o polimorfismo rs1447295 do *CASC8* (A>C) não tenha apresentado diferenças nas distribuições genótípicas e alélicas, ele mostrou relações interessantes com o peso da próstata nos indivíduos com HPB, revelando que há um aumento progressivo significativo do genótipo selvagem para o mutado ($p = 0,04$); o genótipo mutado também foi associado aos maiores valores do IMC no grupo com CaP ($p = 0,03$) e na distribuição de cor/raça também foi encontrada associação significativa ($p = 0,04$). O *CASC8*, ainda que não codifique uma proteína, parece influenciar no desenvolvimento do CaP em populações de islandeses, japoneses, sérvios, poloneses e russos (AMUNDADOTTIR *et al.*, 2006; TERADA *et al.*, 2008; BRANKOVIC *et al.*, 2013; KASHYAP *et al.*, 2014; OSKINA *et al.*, 2014b). Apesar disso, Murphy *et al.*

(2012) avaliaram uma população africana e não associaram o CaP a este polimorfismo ($p = 0,16$). Em uma metanálise com 20.184 casos e 20.439 controles provenientes de 20 estudos distintos foi encontrada associação significativa com o risco de CaP em caucasianos e asiáticos, mas não entre afrodescendentes, outros estudos abrangentes encontraram a mesma relação (LIU *et al.*, 2015; REN *et al.*, 2015; LI R *et al.*, 2017). Zhou *et al.* (2017) mostraram que além de haver risco significativo de CaP associado ao polimorfismo, as variáveis de score de Gleason e o nível de PSA também revelaram forte associação, indicando que este SNP pode servir como um biomarcador confiável para diferentes estágios do CaP. No entanto, corroborando com nossos achados, outros pesquisadores não encontraram relação entre o rs1447295 e o CaP em hispânicos (SAN-FRANCISCO *et al.*, 2014).

Apesar de serem descritos com associação ao CaP em tantos estudos os polimorfismos rs1058205 (*KLK3*), rs486907 (*RNASEL*) e rs523349 (*SRD5A2*) não mostraram associação nas distribuições de genótipos e nem nas comparações com as variáveis clínicas analisadas no estudo.

Em sua pesquisa, Sävblom *et al.* (2014) associaram a variante rs1058205 (*KLK3*) em amostras de sangue de pacientes com CaP, bem como verificaram o aumento de seu produto no soro e sêmen dos mesmos indivíduos. Do mesmo modo, outros estudos também demonstraram que a alteração está associada à neoplasia prostática (PENNEY *et al.*, 2011; STEGEMAN *et al.*, 2015; CHEN; XIN, 2017). Os resultados gerais de Ding *et al.* (2018) indicaram que o polimorfismo estava associado à diminuição do risco de CaP, particularmente na população caucasiana. No entanto, em nossas análises e em um trabalho feito com a população chinesa, não foi observada nenhuma associação com o CaP (ZHANG *et al.*, 2014).

O papel da variação do gene *RNASEL* e sua influência no desenvolvimento do CaP é controverso. Ainda que alguns estudos não associem o polimorfismo rs486907 à neoplasia prostática esporádica, evidências sugerem forte associação entre o SNP e os casos de CaP hereditários (WANG *et al.*, 2002; NAKAZATO *et al.*, 2003; MI *et al.*, 2010; ZUO *et al.*, 2017). Casey *et al.* (2002) determinaram que a variação resulta em três vezes menos atividade enzimática que o tipo selvagem da proteína *RNASEL* e está significativamente associada ao risco de CaP ($p = 0,007$). Mesmo com essas correlações positivas, outros trabalhos encontraram os mesmos resultados que o nosso, não revelando associação do polimorfismo com o risco geral de CaP e nem com as características clínicas (ZHANG *et al.*, 2011; WEI *et al.*, 2012; SAN FRANCISCO *et*

al., 2014). Além disso, as variações no *RNASEL* já foram associadas a formas mais agressivas/letais do CaP, talvez seja mais uma razão para não termos encontrado resultados positivos na amostra, visto que não fizemos essa categorização, mas encontramos uma tendência de associação na avaliação dos níveis de PSA nos indivíduos com CaP (ALVAREZ-CUBERO *et al.*, 2016).

O rs523349 (*SRD5A2*) foi o único polimorfismo deste trabalho que foi anteriormente associado a HPB e ao peso da próstata, sugerindo que ele atue aumentando o risco da doença (OKUGI *et al.*, 2006; SCARIANO *et al.*, 2008; GU *et al.*, 2013; CHOUBEY *et al.*, 2015). Além disso, outros trabalhos associaram esse SNP ao CaP, e ele exibiu maior risco de progressão e morte para os portadores dos genótipos mutados (SALAM *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2010; SHIOTA *et al.*, 2015). Um grupo de pesquisadores brasileiros encontrou resultados interessantes a respeito de polimorfismo do *SRD5A2* e o CaP em uma amostra de pacientes no Rio Grande do Sul, revelando que os indivíduos com menos de 65 anos e que possuem genótipo heterozigótico têm maior risco de desenvolver a patologia, enquanto quem possui os dois alelos selvagens tem um fator de proteção contra o câncer (AMORIN, 2010). Corroborando com nossos resultados, diferentes trabalhos não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos com as patologias prostáticas analisadas (RAJENDER *et al.*, 2009; TONG *et al.*, 2010; DUŠENKA *et al.*, 2014; KACHAKOVA *et al.*, 2016).

A falta de relação desses polimorfismos com o CaP ou a HPB pode ter sido causada pelas diferenças étnicas entre os grupos amostrais dos outros estudos para o nosso. Mas ainda assim, as associações encontradas com os SNPs do *GSTP1* e do *XRCC1* foram interessantíssimas, indicando essas variantes como fatores preditivos para o CaP e podendo ser utilizadas como biomarcadores para identificar pacientes com alto risco de desenvolver a patologia. O *CASC8*, ainda revelou resultados nunca descritos antes, com uma clínica mais agressiva da HPB, com volumes prostáticos maiores nos genótipos mutados, anteriormente ele só tinha sido associado ao CaP mais agressivo (CORNU *et al.*, 2011). Sabe-se que cada SNP tem um efeito individual muito modesto nas razões de chances de risco de doença, mas juntos eles têm um efeito muito mais forte, por isso um painel de biomarcadores associados ao risco deve ser criado para avaliar o efeito cumulativo das alterações sobre a patologia (ISAACS; XU, 2019).

Outros estudos de acompanhamento a longo prazo devem ser realizados com essas e outras variantes para identificar biomarcadores que possam ser utilizados para

além de prever o risco, conseguir diferenciar pacientes de alto e baixo grau de CaP, com o intuito de auxiliar nas abordagens personalizadas do câncer a fim de diminuir os casos de *overdiagnosis* e de *overtreatment*.

Perfil de Expressão Gênica

Além da análise de variantes genéticas associados ao risco de desenvolver o câncer, muitas pesquisas têm sido voltadas para o estudo de alterações no perfil de expressão dos genes no tecido acometido, comparando com tecido saudável subjacente. Uma ferramenta muito utilizada para essas análises é o *The Cancer Genome Atlas* que consiste em um repositório de dados genômicos criado a partir da caracterização de 20 mil amostras de tecidos primários de 33 tipos diferentes de câncer. A partir desse banco foi possível estabelecermos o perfil de expressão dos genes candidatos, além de compará-lo com características clínicas. Todos os genes candidatos usados para análise de variantes tiveram seu perfil de expressão tecidual avaliado pelos dados genômicos do TCGA, com exceção do *CASC8*, pois os dados analisados foram apenas de RNA-seq.

Atualmente, o diagnóstico do CaP é frequentemente baseado no uso de biomarcadores, especialmente na dosagem do PSA, porém ele apresenta falhas já que pode estar alterado em situações não cancerosas, levando a biópsias desnecessárias e a diagnósticos equivocados. Para resolver este problema, a pesquisa continua na busca de biomarcadores adicionais, que possam atuar de forma mais específica e particularmente, melhorar o prognóstico, diferenciando formas indolentes das mais agressivas da doença (ESFAHANI; ATAEI; PANJEHPUR, 2015). Diversos genes já tiveram sua expressão diferencial entre tecido saudável e tumoral comprovada, na última década os que tem sido mais estudados e até mesmo utilizados na clínica por ter uma boa especificidade e sensibilidade são o *AMACR* (alfa metilacil CoA racemase) e o *PCA3*. O *AMACR* é altamente expresso por células cancerígenas da próstata e pode ter um valor prognóstico considerável, uma vez que a redução na expressão tem sido associada a alta possibilidade de recorrência bioquímica (JIANG *et al.*, 2013). A análise do *PCA3* é feita por um exame não invasivo, avaliado por PCR com transcrição reversa em amostra de urina após toque retal, sua dosagem não é afetada por outras doenças benignas da próstata e ainda é capaz de dar informações sobre agressividade do tumor, ajudando na tomada de decisões terapêuticas, devido a essas características tem alto potencial para ser utilizado na clínica, mas ainda é pouco realizado no Brasil (PLOUSSARD; TAILLE, 2018).

Além desses biomarcadores, existem os painéis gênicos no mercado, como o Oncotype DX[®] que é um tipo de teste que analisa o nível de expressão de 17 genes associados a agressividade do CaP, recorrência clínica e morte. Os resultados são informados através do *Genomic Prostate Score* (GPS) que varia de 0 a 100, que pode ajudar a determinar o tratamento adequado, vigilância ou terapia em homens que foram diagnosticados com tumor de baixo grau (KLEIN *et al.*, 2014). O outro teste já bem usado é o Prolaris[®] que avalia genes de progressão do ciclo celular (PCC), ele já foi confirmado em várias coortes e pode prever a agressividade do CaP, a probabilidade de recidiva ou de progressão após prostatectomia durante 10 anos de acompanhamento (BISHOFF *et al.*, 2014).

Apesar de todas as inovações no quesito biomarcadores, ainda não há um marcador ou teste único, sem lacunas, que possa definitivamente afirmar o diagnóstico de CaP, determinar o prognóstico, ser levemente invasivo e ter um bom custo-benefício, por estas e outras razões a busca incansável por novos marcadores tumorais para o CaP parece ser muito mais difícil do que em outras neoplasias, sendo o foco das pesquisas até hoje.

No nosso painel de genes candidatos, todos apresentaram boas distinções entre os tecidos tumorais e não-tumorais de próstata, uns exibindo alta expressão no tumoral como o *FMOD* e o *KLK3* e outros expressão diminuída.

A função do *FMOD* na próstata e mais precisamente, nas patologias prostáticas ainda não foi esclarecida, mas estudos tem mostrado que há diferença considerável na expressão quando comparados os três tecidos: saudável, hiperplásico e tumoral de próstata. Assim como relatamos, a expressão do *FMOD* no tecido tumoral em relação ao não-tumoral foi elevada no primeiro, Bettin *et al.* (2016) encontraram o mesmo resultado e ainda, demonstraram que essa diferença não está presente no tecido hiperplásico, sugerindo que esse gene possa ter um papel diferencial nas patologias da próstata, sendo capaz de diferenciar o tecido tumoral do saudável e do hiperplásico benigno. Uma vez que o *FMOD* codifica um proteoglicano que pode ser detectável em outros fluidos corporais, como secreções prostáticas, urina ou sangue, é de extremo interesse determinar se a expressão de *FMOD* no nível da proteína é capaz de diferenciar os pacientes com CaP de pacientes com doença benigna e dessa forma definir o valor real do *FMOD* como um biomarcador minimamente invasivo (REYES *et al.*, 2016).

A expressão diferencial do *KLK3* já foi vista por outros pesquisadores, principalmente nos casos de CaP resistente a castração, sendo proposto para a análise do prognóstico desses pacientes ou para medir os efeitos terapêuticos juntamente com a expressão do *PCA3* e do *TMPRSS2-ERG* (DIJKSTRA *et al.*, 2014). A expressão elevada do *KLK3* nos tecidos tumorais, assegura ainda mais o seu uso como biomarcador do CaP e sua função biológica nas patologias prostáticas, além de não ter sido encontrado nenhum marcador para competir com ele, devido a sua alta especificidade com o tecido prostático.

O *SRD5A2* foi encontrado consideravelmente downregulado no tecido tumoral, mostrando que pode haver uma deficiência da enzima nos casos de CaP. É sabido que os níveis de testosterona diminuem com o envelhecimento e talvez, por isso a maquinaria celular, reconhecendo os baixos níveis da testosterona, regule negativamente o nível da enzima que converte a testosterona em DHT. Essa redução pode estar envolvida com a ocorrência do CaP, visto que os índices dessa doença aumentam com a idade, mas esse mecanismo ainda é pouco compreendido, não sendo confirmado se o nível da testosterona contribui como fator de risco para o CaP (KLAP; SCHMID; LOUGHLIN, 2015; WATTS *et al.*, 2018). Mas a dosagem da testosterona sérica tem sido utilizada como marcador prognóstico e tem ajudado no acompanhamento de homens com CaP de baixo grau (FERRO *et al.*, 2017).

Além desses resultados, o *FMOD* apresentou diminuição de expressão no PSA e score de Gleason mais elevados e ainda o *SRD5A2* mostrou relação considerável com o score de Gleason, no qual a expressão reduz consideravelmente nos maiores scores, podendo esses dois genes ter valor prognóstico na identificação de homens com maior risco de progressão do CaP. Esses dados relacionando a expressão dos genes candidatos com as características clínicas e patológicas são interessantes e requerem que validações robustas em populações abrangentes e testes funcionais dos biomarcadores sejam realizados para confirmar seus papéis na tumorigênese prostática e poder, futuramente, ser utilizados como biomarcadores relacionados ao prognóstico.

No que se refere ao subtipo molecular do CaP, sabe-se que ainda é uma análise muito preliminar e pouco validada, dessa forma nosso intuito foi avaliar se os genes candidatos podem contribuir para melhorar o entendimento sobre os subtipos moleculares anteriormente propostos (THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2015). Vimos que a expressão do *FMOD* e do *XRCC1* se apresentou regulada positivamente na fusão-ERG e negativamente no subtipo mutação-FOXA1. No

pouco que é conhecido sobre os significados clínicos e prognósticos dos subtipos moleculares do CaP, é de real destaque que o nível de expressão da fusão *TMPRSS2-ERG* está associado a um fenótipo agressivo e que juntamente com a expressão do ERG, provou servir como marcador molecular da progressão do CaP (FONT-TELLO *et al.*, 2015). O *FOXAI* é um fator de transcrição essencial para o desenvolvimento embrionário de diversos órgãos como a próstata, no entanto não está claro como as mutações afetam a carcinogênese, sendo assim as alterações no *FOXAI* já foram atribuídas tanto com papel supressor tumoral quanto oncogênico (ROBINSON *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2018). Parolia *et al.* (2019) reafirmaram o papel central do *FOXAI*, mediado pelos receptores de androgênios, como iniciador do CaP e altamente relacionado com a progressão metastática, sendo também um subtipo molecular de pior prognóstico, possivelmente a baixa expressão do *XRCCI*, que é fundamental na proteção do genoma contra danos endógenos e exógenos ao DNA, contribua para que esse subtipo molecular tenha resultados negativos a longo prazo (FAN *et al.*, 2004).

Por fim, realizamos a análise PAN-Câncer que tem sido muito utilizada para validar que a expressão diferencial do mRNA seja específica do tecido em questão e/ou tenha pouca similaridade com outros tecidos. Dentre os genes candidatos propostos o único que demonstrou resultado mais específico foi o *KLK3*, que apresentou expressão aumentada tanto no tecido tumoral quanto no não-tumoral de próstata e em mais nenhum outro órgão. Isso corrobora com as funções biológicas desse gene, já que ele é expresso quase que exclusivamente pelas células prostáticas e ainda mais pelas prostáticas neoplásicas. O *SRD5A2* também exibiu característica interessante, talvez pelo papel que exerça no tecido prostático, convertendo a testosterona.

À medida que continuamos a definir o cenário de alterações genéticas na linhagem germinativa e de variações da transcriptômica tecidual no desenvolvimento do CaP, é necessário compreender quais são as implicações clínicas e as abordagens de tratamento que podem ser geradas com essas variações e assim poder melhorar a assistência dada para aos pacientes neoplásicos.

7 CONCLUSÃO

- O rastreamento do *FMOD* revelou seis variantes na casuística sendo duas (rs115908597 e rs145901742) apresentadas como patogênicas pelos programas de predição e com frequência maior em nossa amostra do que na população mundial;
- O polimorfismo rs1695 (*GSTP1*) mostrou aumentar o risco para o CaP. Além de ter apresentado relação com os níveis de PSA nos indivíduos com CaP;
- O rs25487 (*XRCCI*) mostrou aumentar o risco para o CaP e o genótipo selvagem aumenta o risco para a HPB;
- O rs1447295 (*CASC8*) está relacionado com o aumento da próstata em indivíduos com HPB e com o aumento do IMC em indivíduos com CaP;
- Os SNPs rs1058205 (*KLK3*), rs486907 (*RNASL*) e rs523349 (*SRD5A2*) não mostraram associação com as patologias e nem com as variáveis analisadas;
- Nas análises *in silico*, todos os genes apresentaram diferenças significativas no perfil de expressão entre os tecidos não-tumorais e os tumorais de próstata. Mostrando que há uma desregulação a nível transcriptômico nos tecidos neoplásicos de próstata;
- O *FMOD* apresentou resultados interessantes, no qual a expressão se mostrou diminuída nos estágios mais avançados de CaP avaliados através dos parâmetros do PSA e do score de Gleason;
- Esperamos que esses resultados auxiliem na determinação de marcadores genéticos de suscetibilidade para o CaP e dessa forma possam contribuir para a melhorar a abordagem de rastreio da população masculina. Mesmo assim, vale destacar, que outros estudos são necessários para melhorar a compreensão do impacto das variações genômicas nessas doenças complexas.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.”

8 REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI I, JORDAN DM, SUNYAEV SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;76(1):7–20.
- ALCARAZ A, HAMMERER P, TUBARO A, SCHRÖDER FH, CASTRO R. Is There Evidence of a Relationship between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer? Findings of a Literature Review. *Eur Urol.* 2009;55(4):864–75.
- AL-QATTAN MM, AL-QATTAN AM. Fibromodulin: Structure, Physiological Functions, and an Emphasis on its Potential Clinical Applications in Various Diseases. *J Coll Physicians Surg Pakistan.* 2018;28(10):783–90.
- ALVAREZ-CUBERO MJ, PASCUAL-GELER M, MARTINEZ-GONZALEZ LJ, EXPÓSITO RM, SAIZ M, et al. Association between RNASEL, MSR1, and ELAC2 single nucleotide polymorphisms and gene expression in prostate cancer risk. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2016;34(10):431.
- AMARAVADI RK, KIMMELMAN AC, DEBNATH J. Targeting Autophagy in Cancer: Recent Advances and Future Directions. *Cancer Discov.* 2019;9:0F1–15.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures, 2019.*
- AMIN MB, GREENE FL, EDGE SB, COMPTON CC, GERSHENWALD JE, BROOKLAND RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):93–9.
- ARORA K, BARBIERI CE. Molecular Subtypes of Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep.* 2018;20(58):1–9.
- ASATRYAN AD, KOMAROVA NL. Evolution of genetic instability in heterogeneous tumors. *Journal of theoretical biology.* 2016;396, 1-12.
- ASHKENAZI A, FAIRBROTHER WJ, LEVERSON JD, SOUERS AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2017;16(4), 273.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE UROLOGIA. Diretrizes – Uma Referência Rápida para os Urologistas (2017) Disponível em: http://portaldaurologia.org.br/medicos/wp-content/uploads/2017/08/guideline_AUA_SBU-ilovepdf-compressed.pdf. Acesso em: 15 set. 2019.
- AWASTHI YC, RAMANA K V., CHAUDHARY P, SRIVASTAVA SK, AWASTHI S. Regulatory roles of glutathione-S-transferases and 4-hydroxynonenal in stress-mediated signaling and toxicity. *Free Radic Biol Med.* 2017;111:235–43.
- BAKHOUM SF, LANDAU DA. Chromosomal Instability as a Driver of Tumor Heterogeneity and Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(6).
- BANERJEE PP, BANERJEE S, BROWN TR, ZIRKIN BR. Androgen action in prostate function and disease. *Am J Clin Exp Urol.* 2018;6(2):62–77.

- BARBIERI CE, BANGMA CH, BJARTELL A, CATTO JW, CULIG Z, GRONBERG H, et al. The Mutational Landscape of Prostate Cancer Christopher. *Eur Urol*. 2013;64(4):567–76.
- BARBIERI CE, RUBIN MA. Genomic Rearrangements in Prostate Cancer. *Curr Opin Urol*. 2015;25(1):71–6.
- BARRY MJ, FOWLER FJ, O’LEARY MP, BRUSKEWITZ RC, HOLTGREWE HL. The American Urological Association symptom index for benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1992;148:1549–57.
- BARRY MJ, SIMMONS LH. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. *Med Clin North Am*. 2017;101(4):787–806.
- BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST). Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 15 jan. 2018.
- BENAFIF S, KOTE-JARAI Z, EELES RA. A Review of Prostate Cancer Genome Wide Association Studies (GWAS). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2018;27(8):845–57.
- BERGER MF, LAWRENCE MS, DEMICHELIS F, DRIER Y, CIBULSKIS K, SIVACHENKO AY, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*. 2011;470(7333):214–20.
- BERMAN TA, SCHILLER JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer*. 2017;123(12):2219–29.
- BETTIN A, REYES I, REYES N. Gene expression profiling of prostate cancer-associated genes identifies fibromodulin as potential novel biomarker for prostate cancer. *Int J Biol Markers*. 2016;31(2):e153–62.
- BISBAL C, SILVERMAN RH. Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie*. 2007;89(6–7):789–98.
- BISHOFF JT, FREEDLAND SJ, GERBER L, TENNSTEDT P, REID J, WELBOURN W, et al. Prognostic utility of the cell cycle progression score generated from biopsy in men treated with prostatectomy. *The Journal of urology*. 2014;192(2):409–414.
- BRANKOVIĆ AS, BRAJUŠKOVIĆ GN, MIRČETIĆ JD, NIKOLIĆ ZZ, KALABA PB, VUKOTIĆ VD, et al. Common variants at 8q24 are associated with prostate cancer risk in Serbian population. *Pathology & Oncology Research*. 2013;19(3): 559–569.
- BRECHBUHL HM, FINLAY-SCHULTZ J, YAMAMOTO TM, GILLEN AE, CITTELLY DM, TAN AC, et al. Fibroblast subtypes regulate responsiveness of luminal breast cancer to estrogen. *Clin Cancer Res*. 2017;23(7):1710–21.
- BURRELL RA, MCGRANAHAN N, BARTEK J, SWANTON C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature*. 2013;501(7467):338–45.

BUYOUNOUSKI MK, CHOYKE PL, MCKENNEY JK, SARTOR O, SANDLER HM, AMIN MB, et al. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(3):245–53.

CABRERA MC, HOLLINGSWORTH RE, HURT EM. Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. *World J Stem Cells.* 2015;7(1):27–36.

CAFFO O, MAINES F, VECCIA A, KINSBERGER S. Splice variants of androgen receptor and prostate cancer. *Oncol Rev.* 2016;10(297):14–8.

CAI Q, WU T, ZHANG W, GUO X, SHANG Z, JIANG N, et al. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferases P1 (GSTP1) Ile105Val and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Tumor Biology.* 2013;34(6):3913-3922.

CAIRNS RA, HARRIS IS, MAK TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:85–95.

CALDECOTT KW. XRCC1 protein; Form and function. *DNA Repair (Amst).* 2019; 102664.

CANCELA MC, ALMEIDA LM. Impacto econômico da mortalidade prematura por câncer nos Brics. *Rede Câncer.* 2018;40:32–3.

CARSON C, RITTMASER R. The Role of Dihydrotestosterone in Benign Prostatic Hyperplasia. *Elsevier Sci.* 2003;61:2–7.

CASEY G, NEVILLE PJ, PLUMMER SJ, XIANG Y, KRUMROY LM, KLEIN EA, et al. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nature genetics.* 2002;32(4):581.

CASTRO E, GOH C, OLMOS D, SAUNDERS E, LEONGAMORNLEET D, TYMRAKIEWICZ M, et al. Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(14):1748–57.

CHAACHOUAY H, OHNESEIT P, TOULANY M, KEHLBACH R, MULTHOFF G, RODEMANN HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol.* 2011;99(3):287–92.

CHANDRASHEKAR DS, BASHEL B, BALASUBRAMANYA SAH, CREIGHTON CJ, PONCE-RODRIGUEZ I, CHAKRAVARTHI BVSK, et al. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia.* 2017;19(8):649–58.

CHATTERJEE A, GUPTA S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett.* 2018;433(May):33–42.

CHEN C, XIN Z. Single-nucleotide polymorphism rs1058205 of KLK3 is associated with the risk of prostate cancer: A case-control study of Han Chinese men in Northeast China. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(10):e6280.

CHEN Y, LI T, LI J, MO Z. X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) Arg399Gln polymorphism significantly associated with prostate cancer. *The International journal of biological markers*. 2015;30(1):12-21.

CHIRILĂ DN, POPP R, VESA S, BĂLĂCESCU O, COMAN I, CONSTANTEA NA, et al. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 genetic variants in multiple urologic cancers. *Chirurgia*. 2015;110:254-261.

CHOUBEY VK, SANKHWAR SN, CARLUS SJ, SINGH AN, DALELA D, THANGARAJ K, et al. SRD5A2 gene polymorphisms and the risk of benign prostatic hyperplasia but not prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16:1033-1036.

CHUGHTAI B, FORDE JC, DANA D, THOMAS M, LAOR L, HOSSACK T, et al. Benign prostatic hyperplasia. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2.

CICCIA A, ELLEDGE SJ. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179–204.

CORNFORD P, BELLMUNT J, BOLLA M, BRIERS E, DE SANTIS M, GROSS T, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2017;71(4):630–42.

CORNU JN, DROUIN S, CANCEL-TASSIN G, BIGOT P, AZZOUZI AR, KOUTLIDIS N, et al. Impact of Genotyping on Outcome of Prostatic Biopsies: A Multicenter Prospective Study. *Mol Med*. 2011;17(5-6):473-477.

COTIGNOLA J, LEONARDI DB, SHAHABI A, ACUÑA AD, STERN MC, NAVONE N, et al. Glutathione-S-transferase (GST) polymorphisms are associated with relapse after radical prostatectomy. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2013;16(1):28.

CRASTA K, GANEM NJ, DAGHER R, LANTERMANN AB, IVANOVA EV, PAN Y, et al. DNA breaks and chromosome pulverization from errors in mitosis. *Nature*. 2012;482(7383):53–8.

CUCCHIARA V, COOPERBERG MR, DALL'ERA M, LIN DW, MONTORSI F, SCHALKEN JA, et al. Genomic Markers in Prostate Cancer Decision Making. *Eur Urol*. 2018;73(4):572–82.

CZABOTAR PE, LESSENE G, STRASSER A, ADAMS JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(1),49-63.

DAGOGO-JACK I, SHAW AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(2):81–94.

DAYAL S, ZHOU J, MANIVANNAN P, SIDDIQUI MA, AHMAD OF, CLARK M, et al. RNase I suppresses androgen receptor signaling, cell migration and matrix metalloproteinase activity in prostate cancer cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):1–27.

DELAHUNT B, MILLER RJ, SRIGLEY JR, EVANS AJ, SAMARATUNGA H. Gleason grading: past, present and future. *Histopathology*. 2012;60(1):75–86.

- DENARDO DG, ANDREU P, COUSSENS LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010;29(2):309–16.
- DENTON AE, ROBERTS EW, FEARON DT. Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. *Stromal Immunol.* 2018;99–114.
- DESMET FO, HAMROUN D, LALANDE M, COLLOD-BÉROUD G, CLAUSTRES M, BÉROUD C. Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):1–14.
- DHINGRA N, BHAGWAT D. Benign prostatic hyperplasia: An overview of existing treatment. *Indian journal of pharmacology.* 2011;43(1):6.
- DIJKSTRA S, LEYTEN GH, JANNINK SA, DE JONG H, MULDER PF, VAN OORT, IM, et al. KLK3, PCA3, and TMPRSS2-ERG expression in the peripheral blood mononuclear cell fraction from castration-resistant prostate cancer patients and response to docetaxel treatment. *Prostate.* 2014;74:1222–30
- DING WH, REN KW, YUE C, ZOU JG, ZUO L, ZHANG LF, et al. Association between three genetic variants in kallikrein 3 and prostate cancer risk. *Bioscience reports.* 2018;38(6).
- DUNN MW. Prostate Cancer Screening. *Semin Oncol Nurs.* 2017;33(2):156–64.
- DUŠENKA R, TOMAŠKIN R, KLIMENT J, DOBROTA D, DUŠENKOVÁ S, VILČKOVÁ M, et al. Polymorphism of the SRD5A2 gene and the risk of prostate cancer. *Molecular medicine reports.* 2014;10(6):3151-3156.
- DYSON NJ. RB1: A prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev.* 2016;30(13):1492–502.
- EELES R, GOH C, CASTRO E, BANCROFT E, GUY M, OLAMA AA, et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol.* 2014;11(1):18–31.
- ENSEMBL. Disponível em: <http://www.ensembl.org/index.html>. Acesso em: 10 fev. 2019.
- ESFAHANI M, ATAEI N, PANJEHPOUR M. Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(7):2601-2611.
- FAN R, KUMARAVEL TS, JALALI F, MARRANO P, SQUIRE JA, BRISTOW RG. Defective DNA strand break repair after DNA damage in prostate cancer cells: implications for genetic instability and prostate cancer progression. *Cancer research.* 2004;64(23):8526-8533.
- FARNSWORTH RH, LACKMANN M, ACHEN MG, STACKER SA. Vascular remodeling in cancer. *Oncogene.* 2014;33(27):3496–505.
- FERRO M, LUCARELLI G, BRUZZESE D, DI LORENZO G, PERDONÀ S, AUTORINO, R, et al. Low serum total testosterone level as a predictor of upstaging and

upgrading in low-risk prostate cancer patients meeting the inclusion criteria for active surveillance. *Oncotarget*. 2017;8(11):18424.

FONT-TELLO A, JUANPERE N, DE MUGA S, LORENZO M, LORENTE JA, FUMADO L, et al. Association of ERG and TMPRSS2-ERG with grade, stage, and prognosis of prostate cancer is dependent on their expression levels. *Prostate*. 2015;75:1216–26.

FRIDMAN WH, PAGÈS F, SAUTS-FRIDMAN C, GALON J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298–306.

FRIEDRICH M, JASINSKI-BERGNER S, LAZARIDOU MF, SUBBARAYAN K, MASSA C, TRETBAR S. et al. Tumor-induced escape mechanisms and their association with resistance to checkpoint inhibitor therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2019;68(10), 1689-1700.

GAO N, ZHANG J, RAO MA, CASE TC, MIROSEVICH J, WANG Y, et al. The role of hepatocyte nuclear factor-3 α (forkhead box A1) and androgen receptor in transcriptional regulation of prostatic genes. *Mol Endocrinol*. 2003;17(8):1484–507.

GENECARDS: The human Gene DataBase. Disponível em: <http://genecards.org/>. Acesso em: 10 fev. 2018.

GENG C, RAJAPAKSHE K, SHAH SS, SHOU J, EEDUNURI VK, FOLEY C, et al. Androgen receptor is the key transcriptional mediator of the tumor suppressor SPOP in prostate cancer. *Cancer Res*. 2014;74(19):5631–43.

GENG J, ZHANG Q, ZHU C, WANG J, CHEN L. XRCC1 genetic polymorphism Arg399Gln and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Urology*. 2009;74(3):648-653.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN) - International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 15 set. 2019.

GREENBERG R. Telomeres, Crisis and Cancer. *Curr Mol Med*. 2005;5(2):213–8.

GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR, KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883–99.

GROSSE A, BARTSCH S, BANIAHMAD A. Molecular and Cellular Endocrinology Androgen receptor-mediated gene repression. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;352(1–2):46–56.

GU X, NA R, HUANG T, WANG L, TAO S, TIAN L, et al. SRD5A1 and SRD5A2 are associated with treatment for benign prostatic hyperplasia with the combination of 5 α -reductase inhibitors and α -adrenergic receptor antagonists. *The Journal of urology*. 2013;190(2):615-619.

GUDMUNDSSON J, SIGURDSSON JK, STEFANSDOTTIR L, AGNARSSON BA, ISAKSSON HJ, STEFANSSON OA, et al. Genome-wide associations for benign prostatic hyperplasia reveal a genetic correlation with serum levels of PSA. *Nature communications*. 2018;9(1): 4568.

GUNDEM G, VAN LOO P, KREMEYER B, ALEXANDROV LB, TUBIO JMC, PAPAEMMANUIL E, et al. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature*. 2015;520(7547):353–7.

GUO Z, LAI Y, DU T, ZHANG Y, CHEN J, BI L, et al. Prostate specific membrane antigen knockdown impairs the tumorigenicity of LNCaP prostate cancer cells by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Chinese medical journal*. 2014;127(5):929-936.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100:57–70.

HANDY CE, ANTONARAKIS ES. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: Novel insights and future directions. *Futur Oncol*. 2018;14(10):907–17.

HANSSEN-BAUER A, SOLVANG-GARTEN K, AKBARI M, OTTERLEI M. X-ray Repair Cross Complementing protein 1 in base excision repair. *Int J Mol Sci*. 2012;13(12):17210–29.

HARALDSDOTTIR S, HAMPEL H, WEI L, WU C, FRANKEL W. Prostate cancer incidence in males with Lynch syndrome. *Genet Med*. 2014;16(7):553–7.

HARNDEN P, SHELLEY MD, COLES B, STAFFURTH J, MASON MD. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2007;8(5):411–9.

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.

HAYASHI MT, CESARE AJ, RIVERA T, KARLSEDER J. Cell Death During Crisis Is Mediated by Mitotic Telomere Deprotection. *Nature*. 2017;522(7557):492–6.

HEIDEN MG VANDER, CANTLEY LC, THOMPSON CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029–33.

HEINLEIN CA, Chang C. Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. *Endocr Rev*. 2002;23(2):175–200.

HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ LA, VALENCIANO A, FORO-ARNALOT P, ÁLVAREZ-CUBERO MJ, COZAR J M, SUAREZ-NOVO JF, et al. Polymorphisms in DNA-repair genes in a cohort of prostate cancer patients from different areas in Spain: heterogeneity between populations as a confounding factor in association studies. *PLoS One*. 2013;8(7):e69735.

HERREROS-VILLANUEVA M, ZHANG J-S, KOENIG A, ABEL E V, SMYRK TC, BAMLET WR, et al. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*. 2013;2(8).

HO CKM, HABIB FK. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. *Nat Rev Urol*. 2011;8(1):29–41.

HOLLSTEIN M, ALEXANDROV LB, WILD CP, ARDIN M, ZAVADIL J. Base changes in tumour DNA have the power to reveal the causes and evolution of cancer. *Oncogene*. 2017;36(2):158–67.

HOWLADER N, NOONE AM, KRAPCHO M, MILLER D, BREST A, YU M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/.

HSING AW, YEBOAH E, BIRITWUM R, TETTEY Y, MARZO AM DE, ADJEI A, et al. Africans: Implications for Racial Disparity of Prostate Cancer. *J Urol*. 2014;192(3):730–5.

HU L, CHEN SH, LV QL, SUN B, QU Q, QIN CZ, et al. Clinical significance of long non-coding RNA CASC8 rs10505477 polymorphism in lung cancer susceptibility, platinum-based chemotherapy response, and toxicity. *International journal of environmental research and public health*. 2016;13(6):545.

HU R, ZHONG P, XIONG L, DUAN L. Long Noncoding RNA Cancer Susceptibility Candidate 8 Suppresses the Proliferation of Bladder Cancer Cells via Regulating Glycolysis. *DNA Cell Biol*. 2017;36(9):767–74.

HUMAN SPLICING FINDER. Disponível em: <http://www.umd.be/HSF3/HSF.shtml>. Acesso em: 10 out. 2019.

HUMPHREY PA, MOCH H, CUBILLA AL, ULBRIGHT TM, REUTER VE. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol*. 2016;70(1):106–19.

ILIC D, DJULBEGOVIC M, JUNG JH, HWANG EC, ZHOU Q, CLEVES A, et al. Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: A systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2018;362:k3519.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE): Projeção da população por sexo e idade no Brasil 2000–2060 (2013).

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA): Estimativa de câncer no Brasil (2018). Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em: 15 set. 2019.

ISAACS WB, XU J. Current progress and questions in germline genetics of prostate cancer. *Asian Journal of Urology*. 2019;6(1):3–9.

ITO K, YAMAMOTO T, OHI M, TAKECHI H, KUROKAWA K, SUZUKI K, et al. Natural history of PSA increase with and without prostate cancer. *Urology*. 2003;62(1):64–9.

ITTMANN M. Anatomy and histology of the human and murine prostate. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;8(5).

JAMES ND, SYDES MR, CLARKE NW, MASON MD, DEARNALEY DP, SPEARS MR, et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): Survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. *Lancet.* 2016;387:1163–77.

JAN AT, LEE EJ, CHOI I. Fibromodulin: A regulatory molecule maintaining cellular architecture for normal cellular function. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;80:66–70.

JANICZEK M, SZYLBERG Ł, KASPERSKA A, KOWALEWSKI A, PAROL M, ANTOSIK P, et al. Immunotherapy as a Promising Treatment for Prostate Cancer: A Systematic Review. *J Immunol Res.* 2017;2017:1–6.

JIAN J, ZHENG Z, ZHANG K, RACKOHN TM, HSU C, LEVIN A, et al. Fibromodulin promoted in vitro and in vivo angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;436(3):530–5.

JIAN X, BOERWINKLE E, LIU X. In silico tools for splicing defect prediction - A survey from the viewpoint of end-users. *Genet Med.* 2014;16(7):497–503.

JIANG N, ZHU S, CHEN J, NIU Y, ZHOU L. A-methylacyl-CoA racemase (AMACR) and prostate-cancer risk: a meta-analysis of 4,385 participants. *PLoS One.* 2013;8(10):e74386.

KACHAKOVA D, MITKOVA A, POPOV E, BELTCHEVA O, VLAHOVA A, DIKOV T, et al. Polymorphisms in androgen metabolism genes AR, CYP1B1, CYP19, and SRD5A2 and prostate cancer risk and aggressiveness in Bulgarian patients. *Turkish journal of medical sciences.* 2016;46(3):626-640.

KALAMAJSKI S, BIHAN D, BONNA A, RUBIN K, FARNDAL RW. Fibromodulin interacts with collagen cross-linking sites and activates lysyl oxidase. *J Biol Chem.* 2016;291(15):7951–60.

KARSCH-BLUMAN A, FEIGLIN A, ARBIB E, STERN T, SHOVAL H, SCHWOB O, et al. Tissue necrosis and its role in cancer progression. *Oncogene.* 2018;38(11):1920–35.

KARYADI DM, ZHAO S, HE Q, MCINTOSH L, WRIGHT JL. Confirmation of Genetic Variants Associated with Lethal Prostate Cancer in a Cohort of Men from Hereditary Prostate Cancer Families. *Int J Cancer.* 2015;136(9):2166–71.

KASHYAP A, KLUŻNIAK W, WOKOŁORCZYK D, GOŁĄB A, SIKORSKI A, SŁOJEWSKI M, et al. The presence of prostate cancer at biopsy is predicted by a number of genetic variants. *International journal of cancer.* 2014;134(5):1139-1146.

KASTENHUBER E, LOWE S. Putting p53 in context. *Cell.* 2017;170(6):1062–78.

KIM EH, LARSON JA, ANDRIOLE GL. Management of Benign Prostatic Hyperplasia. *Annu Rev Med.* 2016;67:137–51.

KLAP J, SCHMID M, LOUGHLIN KR. The relationship between total testosterone levels and prostate cancer: a review of the continuing controversy. *The Journal of urology*. 2015;193(2):403-414.

KLEIN EA, COOPERBERG MR, MAGI-GALLUZZI C, SIMKO JP, FALZARANO SM, MADDALA T, et al. A 17-gene assay to predict prostate cancer aggressiveness in the context of Gleason grade heterogeneity, tumor multifocality, and biopsy undersampling. *European urology*. 2014;66(3):550-560.

KNEZEVIC D, GODDARD AD, NATRAJ N, CHERBAVAZ DB, CLARK-LANGONE KM, SNABLE J, et al. Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC Genomics*. 2013;14(690):1-12.

KOO KM, MAINWARING PN, TOMLINS SA, TRAU M. Merging new-age biomarkers and nanodiagnosics for precision prostate cancer management. *Nat Rev Urol*. 2019;16(5):302-17.

KRÖGER C, AFEYAN A, MRAZ J, EATON EN, REINHARDT F, KHODOR YL, et al. Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(15):7353-62.

KRYZA T, SILVA ML, LOESSNER D, HEUZÉ-VOURC'H N, CLEMENTS JA. The kallikrein-related peptidase family: Dysregulation and functions during cancer progression. *Biochimie*. 2016;122:283-99.

LEE EJ, JAN AT, BAIG MH, ASHRAF JM, NAHM SS, KIM YW, et al. Fibromodulin: A master regulator of myostatin controlling progression of satellite cells through a myogenic program. *FASEB J*. 2016;30(8):2708-19.

LEE YH, SCHIEMANN WP. Fibromodulin suppresses nuclear factor- κ B activity by inducing the delayed degradation of IKBA via a JNK-dependent pathway coupled to fibroblast apoptosis. *J Biol Chem*. 2011;286(8):6414-22.

LI J, COATES RJ, GWINN M, KHOURY MJ. Steroid 5- α -reductase type 2 (SRD5a2) gene polymorphisms and risk of prostate cancer: A HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2010;171(1):1-13.

LI MM, DATTO M, DUNCAVAGE EJ, KULKARNI S, LINDEMAN NI, ROY S. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagnostics*. 2017;19(1):4-23.

LI R, QIN Z, TANG J, HAN P, XING Q, WANG F, et al. Association between 8q24 Gene Polymorphisms and the Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Cancer*. 2017;8(16):3198.

LIMA MM, OLIVEIRA MNL, GRANJA F, TRINDADE ACG, SANTOS LEMD, WARD LS. Lack of association of GSTT1, GSTM1, GSTO1, GSTP1 and CYP1A1 polymorphisms for susceptibility and outcome in Brazilian prostate cancer patients. *Folia Biol (Praha)*. 2008;54(3):102-8.

LIN HJ, WAN L, TSAI Y, LIU SC, CHEN WC, TSAI SW, et al. Sclera-related gene polymorphisms in high myopia. *Molecular vision*. 2009;15,1655.

LIU X, HUA RX, WANG F, AN H, ZHANG W, ZHU JH. Association of three 8q24 polymorphisms with prostate cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis with 50,854 subjects. *Scientific reports*. 2015;5:12069.

MA G, GU D, LV C, CHU H, XU Z, TONG N, et al. Genetic variant in 8q24 is associated with prognosis for gastric cancer in a Chinese population. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(4):689-695.

MACINNIS RJ, ANTONIOU AC, EELES RA, SEVERI G, GUY M, MCGUFFOG L, et al. Prostate cancer segregation analyses using 4390 families from UK and Australian population-based studies. *Genet Epidemiol*. 2010;34(1):42–50.

MANNION S, MTINTSILANA A, POSTHUMUS M, VAN DER MERWE W, HOBBS H, COLLINS M, et al. Genes encoding proteoglycans are associated with the risk of anterior cruciate ligament ruptures. *Br J Sports Med*. 2014;48(22),1640-1646.

MARCHEWKA Z, PIWOWAR A, RUZIK, DŁUGOSZ A. Glutathione S-transferases class Pi and Mi and their significance in oncology. *Postepy higieny i medycyny*. 2017; 71:541-550.

MCGRANAHAN N, SWANTON C. Clonal heterogeneity and tumor evolution: past, present, and the future. *Cell*. 2017;168(4), 613-628.

MCNEAL JE. Normal histology of the prostate. *The American journal of surgical pathology*. 1988; 12(8), 619-633.

MENDONCA BB, BATISTA RL, DOMENICE S, COSTA EMF, ARNHOLD IJP, RUSSELL DW, et al. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;163:206–11.

MEYER MS, PENNEY KL, STARK JR, SCHUMACHER FR, SESSO HD, LODA M, et al. Genetic variation in RNASEL associated with prostate cancer risk and progression. *Carcinogenesis*. 2010;31(9):1597–603.

MI Y, YU Q, MIN Z, XU B, ZHANG L, ZHANG W, et al. Arg462Gln and Asp541Glu polymorphisms in ribonuclease L and prostate cancer risk: a meta-analysis. *Journal of biomedical research*. 2010;24(5):365-373.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (SVS/DASIS/CGIAE) - Sistema de Informação sobre Mortalidade, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 15 out. 2019.

MITTAL RD, MANDAL RK, GANGWAR R. Base excision repair pathway genes polymorphism in prostate and bladder cancer risk in North Indian population. *Mechanisms of ageing and development*. 2012;133(4):127-132.

MITTAL RD, MISHRA DK, MANDHANI, A. Evaluating polymorphic status of glutathione-S-transferase genes in blood and tissue samples of prostate cancer patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2006;7(3):444-6.

MITTAL V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol.* 2018;13:395–412.

MO Z, GAO Y, CAO Y, GAO F, JIAN L. An updating meta-analysis of the GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and prostate cancer: a HuGE review. *The Prostate.* 2009;69(6):662-688.

MOGHADDAM AS, NAZARZADEH M, MOGHADDAM HS, BIDEI Z, KARAMATINIA A, DARVISH H, et al. XRCC1 gene polymorphisms and breast cancer risk: A systematic review and meta- analysis study. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2016;17:323–35.

MOHAMMAD RM, MUQBIL I, LOWE L, YEDJOU C, HSU H-Y, LIN L-T, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2015;35(0):S78–103.

MOHLER JL, ANTONARAKIS ES, ARMSTRONG AJ, D’AMICO AV, DAVIS BJ, DORFF T, et al. Prostate cancer, version 2.2019. *NCCN Clin Pract Guidel Oncol Prostate.* 2019;17(5):479–505.

MONTGOMERY ND, SELITSKY SR, PATEL NM, HAYES DN, PARKER JS, WECK KE. Identification of Germline Variants in Tumor Genomic Sequencing Analysis. *J Mol Diagnostics.* 2018;20(1):123–5.

MOTTET N, BELLMUNT J, BOLLA M, BRIERS E, CUMBERBATCH MG, DE SANTIS M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol.* 2017;71(4):618–29.

MURPHY AB, UKOLI F, FREEMAN V, BENNETT F, AIKEN W, TULLOCH T, et al. 8q24 risk alleles in West African and Caribbean men. *The Prostate.* 2012;72(12):1366-1373.

MUTATION TASTER. Disponível em: <http://www.mutationtaster.org/>. Acesso em: 10 out. 2019.

NAKAZATO H, SUZUKI K, MATSUI H, OHTAKE N, NAKATA S, YAMANAKA H. Role of genetic polymorphisms of the RNASEL gene on familial prostate cancer risk in a Japanese population. *British journal of cancer.* 2003;89(4):691.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NIH). The Cancer Genome Atlas (TCGA). Disponível em: <https://portal.gdc.cancer.gov/>. Acesso em: 10 jun. 2019.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) - 1000 GENOMES BROWSER. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/>. Acesso em: 10 de dez. 2019.

NEDOOSHAN JJ, YAZDI MF, NEAMATZADEH H, SHEHNEH MZ, KARGAR S, SEDDIGHI N. Genetic association of XRCC1 gene rs1799782, rs25487 and rs25489 polymorphisms with risk of thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP.* 2017;18(1):263.

NEGRINI S, GORGOULIS VG, HALAZONETIS TD. Genomic instability an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(3):220–8.

NEJAD LD, BIGLARI A, ANNESE T, RIBATTI D. Recombinant fibromodulin and decorin effects on NF- κ B and TGF β 1 in the 4T1 breast cancer cell line. *Oncol Lett.* 2017;13(6):4475–80.

NIETO MA, HUANG RYYJ, JACKSON RAA, THIERY JPP. EMT: 2016. *Cell.* 2016;166(1):21–45.

NISSAR S, SAMEER AS, RASOOL R, RASHID F. DNA repair gene - XRCC1 in relation to genome instability and role in colorectal carcinogenesis. *Oncol Res Treat.* 2014;37(7–8):418–22.

NIU Y, CHANG T, YEH S, MA W, WANG YZ, CHANG C. Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails. *Oncogene.* 2010;29:3593–604.

NOUREDDINI M, MOBASSERI N, KARIMIAN M, BEHJATI M, NIKZAD H. Arg399Gln substitution in XRCC1 as a prognostic and predictive biomarker for prostate cancer: Evidence from 8662 subjects and a structural analysis. *J Gene Med.* 2018;20(10–11).

OKUGI H, NAKAZATO H, MATSUI H, OHTAKE N, NAKATA S, SUZUKI K. Association of the polymorphisms of genes involved in androgen metabolism and signaling pathways with familial prostate cancer risk in a Japanese population. *Cancer detection and prevention.* 2006;30(3):262-268.

OLIGONUCLEOTIDE PROPERTIES CALCULATOR (OligoCalc). Disponível em: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>. Acesso em: 15 jan. 2018.

OMABE M, EZEANI M. Infection, inflammation and prostate carcinogenesis. *Infect Genet Evol.* 2011;11(6):1195–8.

ONONOGBU U, ALMUJTABA M, MODIBBO F, LAWAL I, OFFIONG R, OLANIYAN O, et al. Cervical cancer risk factors among HIV-infected Nigerian women. *BMC Public Health.* 2013;582:1–10.

ØRSTED DD, BOJESEN SE. The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2012;10(1):49–54.

OSKINA NA, ERMOLENKO NA, BOYARSKIH UA, LAZAREV AF, PETROVA VD, GANOV DI, et al. Associations between SNPs within antioxidant genes and the risk of prostate cancer in the Siberian region of Russia. *Pathology & Oncology Research.* 2014a;20(3):635-640.

OSKINA NA, BOYARSKIKH UA, LAZAREV AF, PETROVA VD, GANOV DI, TONACHEVA OG, et al. A replication study examining association of rs6983267, rs10090154, and rs1447295 common single nucleotide polymorphisms in 8q24 region with prostate cancer in Siberians. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* 2014b;32(1):37-e7.

- PACKER JR, MAITLAND NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(6):1238–60.
- PARK SC, SHIN YS, ZHANG LT, KIM DS, KIM SZ, PARK NC, et al. Prospective investigation of change in the prostate-specific antigens after various urologic procedures. *Clin Interv Aging*. 2015;10:1213–8.
- PAROLIA A, CIESLIK M, CHU SC, XIAO L, OUCHI T, ZHANG Y, et al. Distinct structural classes of activating FOXA1 alterations in advanced prostate cancer. *Nature*. 2019;571(7765):413-418.
- PEITZSCH C, TYUTYUNNYKOVA A, PANTEL K, DUBROVSKA A. Cancer stem cells: the root of tumor recurrence and metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2017;44:10–24.
- PENNATI M, CIMINO-REALE G, GATTI L, CASSINELLI, G. Strategies to strike survival networks in cancer. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*. 2016;21:3-4.
- PENNEY KL, SCHUMACHER FR, KRAFT P, MUCCI LA, SESSO HD, MA J, et al. Association of KLK3 (PSA) genetic variants with prostate cancer risk and PSA levels. *Carcinogenesis*. 2011;32(6):853-859.
- PERDANA NR, MOCHTAR CA, UMBAS R, HAMID ARA. The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review. *Acta Med Indones*. 2016;48(3):228–38.
- PLOUSSARD G, DE LA TAILLE A. The role of prostate cancer antigen 3 (PCA3) in prostate cancer detection. Expert review of anticancer therapy. 2018;18(10):1013-1020.
- PLUMMER M, DE MARTEL C, VIGNAT J, FERLAY J, BRAY F, FRANCESCHI S. Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet Glob Heal*. 2016;4(9):e609–16.
- PRAJAPATI P, LAMBERT DW. Cancer-associated fibroblasts – Not-so-innocent bystanders in metastasis to bone? *J Bone Oncol*. 2016;5(3):128–31.
- PREDICTION OF FUNCTIONAL EFFECTS OF HUMAN NSSNPS (PolyPhen–2). Disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. Acesso em: 10 out. 2019.
- PRENSNER JR, RUBIN MA, WEI JT, CHINNAIYAN AM. Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med*. 2012;4(127):127rv3.
- PRIMER3WEB. Disponível em: <http://primer3.ut.ee/>. Acesso em: 15 jan. 2018.
- PRITCHARD CC, MATEO J, WALSH MF, SARKAR N DE, ABIDA W, BELTRAN H, et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(5):443–53.
- QADRI Q, SAMEER AS, SHAH ZA, HAMID A, ALAM S, MANZOOR S, et al. Genetic polymorphism of the glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) and susceptibility to prostate cancer in the Kashmiri population. *Genet Mol Res*. 2011;10(4): 3038-3045.

- RAGHAVAN D. First-line use of novel hormonal agents in prostate cancer: a critical appraisal. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018;16(4):289–295.
- RAJENDER S, VIJAYALAKSHMI K, POOJA S, MADHAVI S, PAUL SF, VETTRISELVI V, et al. Longer (TA)_n repeat but not A49T and V89L polymorphisms in SRD5A2 gene may confer prostate cancer risk in South Indian men. *J Androl*. 2009;30(6):703–710
- RAJPUT AB, MILLER MA, DE LUCA A, BOYD N, LEUNG S, HURTADO-COLL A, et al. Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *J Clin Pathol*. 2007;60(11):1238–43.
- RÄSÄNEN K, VAHERI A. Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp Cell Res*. 2010;316(17):2713–22.
- REBBECK TR. Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. *Semin Radiat Oncol*. 2017;27(1):3–10.
- REN XQ, ZHANG JG, XIN SY, CHENG T, LI L, REN WH. Variants on 8q24 and prostate cancer risk in Chinese population: a meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(6):8561.
- REYES N, BENEDETTI I, BETTIN A, REBOLLO J, GELIEBTER J. The small leucine rich proteoglycan fibromodulin is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue. *Cancer Biomarkers*. 2016;16(1):191–202.
- RIEMANN A, SCHNEIDER B, IHLING A, NOWAK M, SAUVANT C, GEKLE M. Acidic Environment Leads to ROS-Induced MAPK Signaling in Cancer Cells. *PLoS One*. 2011;6(7).
- ROBINSON D, VAN ALLEN EM, WU Y-M, SCHULTZ N, LONIGRO RJ. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*. 2015;161(5):1215–28.
- ROBINSON JL, HICKEY TE, WARREN AY, VOWLER SL, CARROLL T, LAMB AD, et al. Elevated levels of FOXA1 facilitate androgen receptor chromatin binding resulting in a CRPC-like phenotype. *Oncogene*. 2014.33(50):5666.
- ROEHRBORN CG. Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH). *Medical Clinics*. 2011;95(1):87–100.
- SALAM MT, URSIN G, SKINNER EC, DESSISSA T, REICHARDT JK. Associations between polymorphisms in the steroid 5- α reductase type II (SRD5A2) gene and benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2005;23(4):246-253.
- SAN FRANCISCO IF, ROJAS PA, TORRES-ESTAY V, SMALLEY S, CERDA-INFANTE J, MONTECINOS VP, et al. Association of RNASEL and 8q24 variants with the presence and aggressiveness of hereditary and sporadic prostate cancer in a hispanic population. *J Cell Mol Med*. 2014;18(1):125–33.

- SÄVBLOM C, HALLDÉN C, CRONIN AM, SÄLL T, SAVAGE C, VERTOSICK EA, et al. Genetic variation in KLK2 and KLK3 is associated with concentrations of hK2 and PSA in serum and seminal plasma in young men. *Clinical chemistry*. 2014;60(3):490-499.
- SCARIANO JK, TREAT E, ALBA F, NELSON H, NESS SA, SMITH, AY. The SRD5A2 V89L polymorphism is associated with severity of disease in men with early onset prostate cancer. *The Prostate*.2008;68(16):1798-1805.
- SCHENK JM, KRISTAL AR, ARNOLD KB, TANGEN CM, NEUHOUSER ML, LIN DW, et al. Association of symptomatic benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: Results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol*. 2011;173(12):1419–28.
- SCHUMACHER FR, AL OLAMA AA, BERNDT SI, BENLLOCH S, AHMED M, SAUNDERS EJ. Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. *Nat Genet*. 2018;50(7):928–36.
- SCHWARZ JM, RÖDELSPERGER C, SCHUELKE M, SEELOW D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575–6.
- SELMAN SH. The McNeal prostate: A review. *Urology*. 2011;78(6):1224–8.
- SEQUENCE MANIPULATION SUITE: PCR PRIMER STATS. Disponível em: http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html. Acesso em: 15 jan. 2018.
- SHAIKHIBRAHIM Z, WERNERT N. ETS transcription factors and prostate cancer: the role of the family prototype ETS-1. *International journal of oncology*. 2012;40(6), 1748-1754.
- SHARMA P, HU-LIESKOVAN S, WARGO JA, RIBAS A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*. 2017;168(4):707–23.
- SHIAO SL, CHU GCY, CHUNG LWK. Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment. *Cancer Lett*. 2016;380(1):340–8.
- SHIOTA M, FUJIMOTO N, YOKOMIZO A, TAKEUCHI A, ITSUMI M, INOKUCHI J, et al. SRD5A gene polymorphism in Japanese men predicts prognosis of metastatic prostate cancer with androgen-deprivation therapy. *European Journal of Cancer*. 2005;51(14):1962-1969.
- SHIOZAWA Y, BERRY JE, EBER MR, JUNG Y, CACKOWSKI FC, YOON HJ, et al. The marrow niche controls the cancer stem cell phenotype of disseminated prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(27):41217–32.
- SIM NL, KUMAR P, HU J, HENIKOFF S, SCHNEIDER G, NG PC. SIFT web server: Predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(W1):452–7.
- SKINDER D, ZACHARIA I, STUDIN J, COVINO J. Benign prostatic hyperplasia: A clinical review. *J Am Acad Physician Assist*. 2016;29(8):19–23.

SOMMARIVA S, TARRICONE R, LAZZERI M, RICCIARDI W, MONTORSI F. Prognostic Value of the Cell Cycle Progression Score in Patients with Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol*. 2016;69:107–15.

SONG B, PARK SH, ZHAO JC, FONG KW, LI S, LEE Y, et al. Targeting FOXA1-mediated repression of TGF- β signaling suppresses castration-resistant prostate cancer progression. *The Journal of clinical investigation*. 2018;129(2).

SORTING INTOLERANT FROM TOLERANT (SIFT). Disponível em: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>. Acesso em: 10 out. 2019.

STEGEMAN S, AMANKWAH E, KLEIN K, O'MARA TA, KIM D, LIN HY, et al. A large-scale analysis of genetic variants within putative miRNA binding sites in prostate cancer. *Cancer Discovery*. 2015;5(4):368-379.

STONE OA, CARTER JG, LIN PC, PALEOLOG E, MACHADO MJC, BATES DO. Differential regulation of blood flow-induced neovascularization and mural cell recruitment by vascular endothelial growth factor and angiopoietin signalling. *J Physiol*. 2017;595(5):1575–91.

TANIGUCHI H, SUZUKI Y, NATORI Y. The Evolving Landscape of Cancer Stem Cells and Ways to Overcome Cancer Heterogeneity. *Cancers (Basel)*. 2019;11(532):1–16.

TAURIELLO DVF, PALOMO-PONCE S, STORK D, BERENQUER-LLERGO A, BADIA-RAMENTOL J, IGLESIAS M, et al. TGF β drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature*. 2018;554:538–43.

TELANG JM, LANE BR, CHER ML, MILLER DC, DUPREE JM. Prostate cancer family history and eligibility for active surveillance: a systematic review of the literature. *BJU Int*. 2017;120(4):464–7.

TERADA N, TSUCHIYA N, MA Z, SHIMIZU Y, KOBAYASHI T, NAKAMURA E, et al. Association of genetic polymorphisms at 8q24 with the risk of prostate cancer in a Japanese population. *The Prostate*. 2008;68(15):1689-1695.

TERESE WISLOW LLC: Medical and Scientific Illustration. Disponível em: <https://www.teresewinslow.com>. Acesso em: 16 out. 2019.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell*. 2015;163(4):1011–1025.

THE NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – DATA BASE SNP (NCBI - dbSNP). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Acesso em: 10 nov. 2017.

THOMPSON IM, GOODMAN PJ, TANGEN CM, PARNES HL, MINASIAN LM, GODLEY PA, et al. Long-term survival of participants in the prostate cancer prevention trial. *New England Journal of Medicine*. 2013;369(7):603-610.

THUSBERG J, OLATUBOSUN A, VIHINEN M. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat.* 2011;32(4):358–68.

TILLGREN V, ÖNNERFJORD P, HAGLUND L, HEINEGÅRD D. The tyrosine sulfate-rich domains of the LRR proteins fibromodulin and osteoadherin bind motifs of basic clusters in a variety of heparin-binding proteins, including bioactive factors. *J Biol Chem.* 2009;284(42):28543–53.

TOIVANEN R, SHEN MM. Prostate organogenesis: Tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Dev.* 2017;144(8):1382–98.

TONG M, JIN YY, LI G, LIU SM, JI CD. V89L Polymorphism of the Testosterone 5-alpha-reductase II Gene and Prognostic Factors of Prostate Cancer. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2010;16(11):990–993.

TOSOIAN JJ, GORIN MA, ROSS AE, PIANTA KJ, TRAN PT, SCHAEFFER EM, et al. Oligometastatic prostate cancer: definitions, clinical outcomes, and treatment considerations. *Nat Rev Urol.* 2017;14(1):15–25.

UALCAN: Analyze, Integrate, Discover. Disponível em: <http://ualcan.path.uab.edu/index.html>. Acesso em: 10 jun. 2019.

UCSC IN SILICO PCR. Disponível em: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>. Acesso em: 15 jan. 2018.

UMBREIT E, SHIMKO M, GETTMAN M. Prostate Anatomy and Prostate Cancer Screening, Diagnosis, Staging, and Prevention. *Robotic Radiosurgery: Treating Prostate Cancer and Related Genitourinary Applications.* 2012;29–40

UROLOGY CARE FOUNDATION. Disponível em: [https://www.urologyhealth.org/urologic-conditions/prostatitis-\(infectionoftheprostate\)](https://www.urologyhealth.org/urologic-conditions/prostatitis-(infectionoftheprostate)). Acesso em: 15 nov. 2019.

VALASTYAN S, WEINBERG RA. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell.* 2011;147(2):275–92.

VAN ROY F. Beyond E-cadherin: Roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(2):121–34.

VERZE P, CAI T, LORENZETTI S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol.* 2016;13(7):379–86.

VIALARD C, LARRIVÉE B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis.* 2017;20(4):409–26.

VICENTE-DUEÑAS C, ROMERO-CAMARERO I, COBALEDA C, SÁNCHEZ-GARCÍA I. Function of oncogenes in cancer development: A changing paradigm. *EMBO J.* 2013;32(11):1502–13.

WALTERS KA, SIMANAINEN U, HANDELSMAN DJ. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Hum Reprod Update*. 2010;16(5):543–58.

WANG G, ZHAO D, SPRING DJ, DEPINHO RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev*. 2018;32(17–18):1105–40.

WANG J, CAI Y, REN C, ITTMANN M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66(17):8347–51.

WANG K, FAN DD, JIN S, XING NZ, NIU YN. Differential expression of 5-alpha reductase isozymes in the prostate and its clinical implications. *Asian J Androl*. 2014;16(2):274–9.

WANG L, MCDONNELL SK, ELKINS DA, SLAGER SL, CHRISTENSEN E, MARKS AF, et al. Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer. *The American Journal of Human Genetics*. 2002;71(1):116–123.

WANG X, MA KW, ZHAO YG, WANG GJ, LI W. XRCC1 rs25487 polymorphism is associated with lung cancer risk in epidemiologically susceptible Chinese people. *Genet Mol Res*. 2015;14(4):15530–15538.

WANG Z, JENSEN MA, ZENKLUSEN JC. A Practical Guide to The Cancer Genome Atlas (TCGA). *Stat Genomics Methods Protoc*. 2016;1418:111–41.

WANG Z, WANG Y, ZHANG J, HU Q, ZHI F, ZHANG S, et al. Significance of the TMPRSS2: ERG gene fusion in prostate cancer. *Mol Med Rep*. 2017;16(4):5450–8.

WATTS EL, APPLEBY PN, PEREZ-CORNAGO A, BUENO-DE-MESQUITA HB, CHAN JM, CHEN C, et al. Low free testosterone and prostate cancer risk: a collaborative analysis of 20 prospective studies. *European urology*. 2018;74(5):585–594.

WEI B, XU Z, RUAN J, ZHU M, JIN K, ZHOU D, et al. RNASEL Asp541Glu and Arg462Gln polymorphisms in prostate cancer risk: evidences from a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2012;39(3):2347–2353.

WEI B, ZHOU Y, XU Z, RUAN J, CHENG H, ZHU M, et al. GSTP1 Ile105Val polymorphism and prostate cancer risk: evidence from a meta-analysis. *PloS One*. 2013;8(8):e71640.

WEI L, WANG J, LAMPERT E, SCHLANGER S, DEPRIEST AD, HU Q. Intratumoral and Intertumoral Genomic Heterogeneity of Multifocal Localized Prostate Cancer Impacts Molecular Classifications and Genomic Prognosticators. *Eur Urol*. 2017;71(2):183–92.

WILSON JD. The role of 5 α -reduction in steroid hormone physiology. *Reprod , Fertil Dev*. 2001;13:673–8.

YACOUB JH, OTO A. MR Imaging of Prostate Zonal Anatomy. *Radiol Clin North Am*. 2017;56(2):197–209.

YAN J, WANG X, TAO H, DEN, Z, YANG W, LIN F. Meta-analysis of the relationship between XRCC1-Arg399Gln and Arg280His polymorphisms and the risk of prostate cancer. *Scientific Reports*. 2015;5:9905.

YANG L, LIN PC. Mechanisms that drive inflammatory tumor microenvironment, tumor heterogeneity, and metastatic progression. *Semin Cancer Biol*. 2017;47:185–95.

YU Z, LI Z, CAI B, WANG Z, GAN W, CHEN H, et al. Association between the GSTP1 Ile105Val polymorphism and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Tumor Biology*. 2013;34(3):1855-1863.

YU Z, LI Z, CAI B, WANG Z, GAN W, CHEN H, et al. Association between the GSTP1 Ile105Val polymorphism and prostate cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Tumor Biol*. 2013;34(3):1855–63.

YUAN Y, JIANG Y, SUN C, CHEN Q. Role of the tumor microenvironment in tumor progression and the clinical applications. *Oncol Rep*. 2016;35:2499–515.

ZENG XT, SU XJ, LI S, WENG H, LIU TZ, WANG XH. Association between SRD5A2 rs523349 and rs9282858 Polymorphisms and Risk of Benign Prostatic Hyperplasia: A Meta-Analysis. *Frontiers in physiology*. 2017;8:688.

ZHANG L, QI M, FENG T, HU J, WANG L, LI X, et al. IDH1R132H Promotes Malignant Transformation of Benign Prostatic Epithelium by Dysregulating MicroRNAs: Involvement of IGF1R-AKT/STAT3 Signaling Pathway. *Neoplasia (United States)*. 2018;20(2):207–17.

ZHANG LF, MI YY, QIN C, WANG Y, CAO Q, WEI JF, et al. RNASEL– 1385G/A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 21 case–control studies. *Molecular biology reports*. 2011;38(8):5099-5105.

ZHANG LL, SUN L, ZHU XQ, XU Y, YANG K, YANG F, et al. rs10505474 and rs7837328 at 8q24 cumulatively confer risk of prostate cancer in Northern Han Chinese. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(7):3129-3132.

ZHANG Y, YUAN Y, CHEN Y, WANG Z, LI F, ZHAO Q. Association between GSTP1 Ile105Val polymorphism and urinary system cancer risk: Evidence from 51 studies. *OncoTargets and therapy*. 2016;9:3565–9.

ZHOU J, YU Y, ZHU A, WANG F, KANG S, PEI Y, et al. Meta-analysis of association between rs1447295 polymorphism and prostate cancer susceptibility. *Oncotarget*. 2017;8(40):67029.

ZHOU Y, BOLTON EC, JONES JO. Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. *J Mol Endocrinol*. 2015;54(1):R15–29.

ZHU H, JIU T, WANG D. Impact of polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and their role in the risk of prostate cancer. *Pakistan journal of medical sciences*. 2015;31(2):290.

ZITVOGEL L, PIETROCOLA F, KROEMER G. Nutrition, inflammation and cancer. *Nat Immunol*. 2017;18(8):843–50.

ZUO L, REN KW, BAI Y, ZHANG LF, ZOU JG, QIN XH, et al. Association of a common genetic variant in RNASEL and prostate cancer susceptibility. *Oncotarget*. 2017;8(43):75141.

ZVEREVA MI, SHCHERBAKOVA DM, DONTSOVA OA. Telomerase: Structure, functions, and activity regulation. *Biochem*. 2010;75(13):1563–83.

9 APÊNDICES

Apêndice A – Questionário de histórico clínico e familiar do paciente



Questionário de Histórico Clínico do Paciente “Análise de fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento do Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna”

Código Paciente: _____ Data da Coleta: ____/____/____

Nome:	Número de Prontuário:		
Nascimento: / /	Idade: anos	Idade ao Diagnóstico:	anos
Cor/Raça: () Branca () Amarela () Parda () Preta () Indígena (IBGE)			
Estado Civil: () Solteiro () Casado () Divorciado () Viúvo			
Escolaridade: () 0 () 1–4 () 5–8 () 9–12 () mais de 12 anos. Profissão:			
Grupo Amostral:			
Queixa Principal:			
OBS:			

Medicamentos Usados:		
Alergias: () Não () Sim Qual?		
Tabagista: () Não () Sim		Etilista: () Não () Sim
Atividade Física: () Não () Sim Frequência:		
PA: ____x____ mmHg. Peso: ____ kg. Altura: ____ m. IMC: ____ kg/m.		
Antecedentes Pessoais () Nenhum () Obesidade () Hipertensão Arterial () Diabetes () Apneia Obstrutiva do Sono () Litíase () Cirurgia. Qual?		Antecedentes Familiares () Nenhum () Câncer de Próstata () Hiperplasia Prostática Benigna () Câncer de Mama () Outro. Qual? _____ () Não sabe informar
I-PSS () Leve: 0 a 7 pontos () Moderado: 8 a 19 pontos () Grave: 20 a 35 pontos	Esvaziamento (Obstrutivos) Jato Fraco () Não () Sim Jato Interrompido () Não () Sim Jato Afilado () Não () Sim Esforço Miccional () Não () Sim Hesitância () Não () Sim	Irritativos (Armazenamento) Polaciúria () Não () Sim Poliúria () Não () Sim Noctúria () Não () Sim Disúria () Não () Sim Urgência () Não () Sim DorSuprapúbica () Não () Sim
Pós-miccional Sensação de esvaziamento vesical incompleto () Não () Sim Gotejamento Pós-miccional () Não () Sim		

Questionário de Histórico Clínico do Paciente
“Análise de fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento do Câncer de
Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna”

Score Internacional de Sintomas Prostáticos
(I-PSS – International Prostate Symptom Score)

		Nenhuma vez	Menos que 1 vez em cada 5	Menos que a metade das vezes	Cerca de metade das vezes	Mais que a metade das vezes	Quase sempre
	No último mês, quantas vezes você teve a sensação de não esvaziar completamente a bexiga após terminar de urinar?	0	1	2	3	4	5
	No último mês, quantas vezes você teve de urinar novamente em menos de 2 horas após ter urinado?	0	1	2	3	4	5
	No último mês, quantas vezes você observou que, ao urinar, parou e recomeçou várias vezes?	0	1	2	3	4	5
	No último mês, quantas vezes você observou que foi difícil conter a urina?	0	1	2	3	4	5
	No último mês, quantas vezes você observou que o jato urinário estava fraco ?	0	1	2	3	4	5
	No último mês, quantas vezes você teve de fazer força para começar a urinar?	0	1	2	3	4	5
		Nenhuma	1 vez	2 vezes	3 vezes	4 vezes	5 vezes
	No último mês, quantas vezes em média você teve de se levantar à noite para urinar ?	0	1	2	3	4	5

Score I-PSS

- () Sintomas leves: 0 a 7 pontos
 () Sintomas moderados: 8 a 19 pontos
 () Sintomas graves: 20 a 35 pontos

Referência: Adaptado de BARRY, M. J. *et al.* The American Urological Association symptom index for benign prostatic hyperplasia. **The Journal of Urology**, v. 148, p. 1549–1557, 1992.

“Análise de fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento do Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna”

Questionário de Histórico Clínico do Paciente

Exames

Datas	/ /	/ /	/ /
Hemácias (milhões/mm ³)			
Hematócrito (%)			
Hemoglobina (g/dL)			
Leucócitos Totais (mil/mm ³)			
Plaquetas (mil/mm ³)			
Glicose (mg/dL)			
Hemoglobina Glicada (% Hb Total)			
Ureia (mg/dL)			
Creatinina (mg/dL)			
Ácido Úrico (mg/dL)			
Colesterol Total (mg/dL)			
Colesterol LDL (mg/dL)			
Colesterol HDL (mg/dL)			
Triglicerídeos (mg/dL)			
TGO/AST (U/L)			
TGP/ALP (U/L)			
PSA Total (ng/mL)			
PSA Livre (ng/mL)			
Relação PSA_{Livre}PSA_{Total} (%)			
EAS			
Ultrassonografia de Próstata	Data: ___/___/___ Dimensões da Próstata: ___ x ___ x ___ cm Peso: ___g Resíduo pós-miccional: _____ Comentários: _____ _____ _____		
Biópsia de Próstata	Data: ___/___/___ Negativa () Positiva () Score de Gleason: _____ Número de Fragmentos: _____ Comentários: _____ _____ _____		
Outros			
Tratamento e Conduta			

Apêndice B – Descrição das amostras da análise PAN-Câncer

Tecido Primário	Tumoral (N)	Não-tumoral (N)
Bexiga	408	19
Mama	1097	114
Cervical	305	3
Via biliar	36	9
Cólon	286	41
Esôfago	184	11
Cérebro	156	5
Cabeça/Pescoço	520	44
Cromóforo renal (CR)	67	25
Células claras de rim	533	72
Células papilares de rim	290	32
Fígado	371	50
Adenocarcinoma de pulmão	515	59
Carcinoma de pulmão	503	52
Pâncreas	178	4
Próstata	497	52
Feocromocitoma e Paraganglioma (PCPG)	179	3
Reto	166	10
Sarcoma	260	2
Melanoma	472	1
Tireoide	505	59
Timo	120	2
Estômago	415	34
Endométrio	546	35
Total	8609	738

Descrição do número de amostras tumorais e não-tumorais (pareadas) da análise PAN-Câncer do TCGA. **N:** número de amostras. **Fonte:** elaborada pelo autor.

Apêndice C – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs1695 (GSTPI)

Variáveis	Controle – rs1695 (GSTPI)			<i>p</i>
	AA	AG	GG	
IMC (kg/m²)	26,50 (23,72;28,62)	25,82 (24,39;29,32)	25,44 (23,84;28,37)	0,74
PSA_{total} (ng/mL)	0,87 (0,49;1,56)	0,97 (0,72;2,14)	1,29 (0,59;2,09)	0,61
PSA_{livre} (ng/mL)	0,26 (0,14;0,49)	0,32 (0,18;0,50)	0,34 (0,18;0,35)	0,99
Peso da Próstata* (g)	28,00 (23,00;42,00)	30,00 (22,00;32,00)	26,50 (26,00;27,00)	0,95

Variáveis	HPB – rs1695 (GSTPI)			<i>p</i>
	AA	AG	GG	
IMC (kg/m²)	26,20 (23,65;28,75)	25,85 (23,61;28,65)	26,22 (25,00;27,05)	1,00
PSA_{total} (ng/mL)	2,34 (1,13;3,97)	2,76 (1,15;5,72)	1,03 (0,65;3,34)	0,13
PSA_{livre} (ng/mL)	0,52 (0,24;0,93)	0,53 (0,18;0,92)	0,26 (0,12;1,00)	0,53
Peso da Próstata* (g)	47,60 (37,60;68,75)	47,00 (33,50;63,50)	42,5 (29,50;62,76)	0,62

Variáveis	CaP – rs1695 (GSTPI)			<i>p</i>
	AA	AG	GG	
IMC (kg/m²)	28,31 (21,44;30,05)	26,45 (24,73;30,33)	26,96 (26,96;26,96)	0,95
PSA_{total} (ng/mL)	9,96 (2,12;20,73)	15,30 (8,70;32,17)	5,37 (5,31;5,43)	0,15
PSA_{livre} (ng/mL)	0,51 (0,01;1,38)	1,29 (1,01;2,79)	0,15 (0,15;0,15)	0,07
Peso da Próstata* (g)	45,00 (23,25;80,03)	35,00 (27,50;50,95)	53,00 (53,00;53,00)	0,68

Os valores indicam a mediana (1º quartil; 3º quartil). *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste de Kruskal-Wallis. **IMC**: índice de massa corporal; **PSA**: antígeno específico da próstata. *Peso da próstata foi avaliado por ultrassonografia transretal.

Apêndice D – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1695 (*GSTP1*)

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – HPB					
Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>	
AA	22	31	21	74	0,40	
AG	15	11	18	44		
GG	4	3	4	11		
Total	41	45	43	129		

rs1695
(*GSTP1*)

Cor/Raça (IBGE) – CaP					
Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>
AA	5	7	2	14	0,83
AG	13	12	8	33	
GG	1	1	0	2	
Total	19	20	10	49	

SNP ID	I-PSS – HPB					
Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>	
AA	35	17	24	76	0,36	
AG	19	8	17	44		
GG	4	5	2	11		
Total	58	30	43	131		

rs1695
(*GSTP1*)

I-PSS – CaP					
Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>
AA	2	0	4	6	0,44
AG	9	5	8	22	
GG	0	0	1	1	
Total	11	5	13	29	

SNP ID	Score de Gleason – CaP					
Genótipo	2 - 6	7 (3+4)	7 (4+3)	8 -10	Total	<i>p</i>
AA	2	1	3	2	8	0,43
AG	2	5	7	5	19	
GG	1	0	0	0	1	
Total	5	6	10	7	28	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. O I-PSS (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason entre 2 e 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10.

Apêndice E – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs1058205 (KLK3)

Variáveis	Controle – rs1058205 (KLK3)			p
	CC	CT	TT	
IMC (kg/m²)	25,82 (22,86;29,76)	26,14 (24,81;28,65)	25,99 (23,65;28,89)	0,86
PSA_{total} (ng/mL)	3,01 (0,22;5,79)	0,92 (0,50;1,60)	1,00 (0,58;1,83)	0,94
PSA_{livre} (ng/mL)	0,41 (0,03;0,79)	0,24 (0,14;0,38)	0,32 (0,19;0,50)	0,63
Peso da Próstata* (g)	24,50 (23,00;26,00)	31,00 (26,00;45,25)	27,50 (22,00;31,25)	0,35

Variáveis	HPB – rs1058205 (KLK3)			p
	CC	CT	TT	
IMC (kg/m²)	27,03 (23,13;28,75)	25,80 (23,84;28,80)	26,22 (23,62;28,52)	0,99
PSA_{total} (ng/mL)	2,58 (0,69;3,06)	2,82 (1,13;5,93)	2,12 (1,06;3,70)	0,29
PSA_{livre} (ng/mL)	0,48 (0,16;0,74)	0,63 (0,26;1,42)	0,48 (0,18;0,84)	0,34
Peso da Próstata* (g)	55,00 (35,70;73,50)	48,60 (36,23;62,25)	45,00 (35,40;56,00)	0,85

Variáveis	CaP – rs1058205 (KLK3)			p
	CC	CT	TT	
IMC (kg/m²)	30,04 (28,73;33,09)	26,85 (24,24;27,55)	25,95 (24,51;28,69)	0,15
PSA_{total} (ng/mL)	21,90 (9,71;28,13)	31,81 (5,31;85,77)	10,62 (5,99;16,80)	0,25
PSA_{livre} (ng/mL)	1,02 (1,00;1,03)	1,73 (0,09;5,09)	1,08 (0,85;2,36)	0,83
Peso da Próstata* (g)	22,00 (21,00;86,70)	31,00 (25,50;64,75)	37,00 (33,10;56,50)	0,43

Os valores indicam a mediana (1º quartil; 3º quartil). *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste de Kruskal-Wallis. **IMC**: índice de massa corporal; **PSA**: antígeno específico da próstata. *Peso da próstata foi avaliado por ultrassonografia transretal.

Apêndice F – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1058205 (*KLK3*)

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – HPB					
	Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>
rs1058205 (<i>KLK3</i>)	CC	1	3	8	12	0,08
	CT	13	18	15	46	
	TT	27	24	20	71	
	Total	41	45	43	129	

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – CaP					
	Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>
rs1058205 (<i>KLK3</i>)	CC	1	3	2	6	0,33
	CT	4	8	4	16	
	TT	14	9	4	27	
	Total	19	20	10	49	

SNP ID	I-PSS – HPB					
	Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>
rs1058205 (<i>KLK3</i>)	CC	4	2	7	13	0,54
	CT	2	11	13	46	
	TT	32	17	23	72	
	Total	58	30	43	131	

SNP ID	I-PSS – CaP					
	Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>
rs1058205 (<i>KLK3</i>)	CC	2	0	1	3	0,15
	CT	1	3	7	11	
	TT	8	2	5	15	
	Total	11	5	13	29	

SNP ID	Score de Gleason – CaP						
	Genótipo	2 - 6	7 (3+4)	7 (4+3)	2 - 6	Total	<i>p</i>
rs1058205 (<i>KLK3</i>)	CC	1	0	1	2	4	0,22
	CT	1	4	1	2	8	
	TT	3	2	8	3	16	
	Total	5	6	10	7	28	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. O **I-PSS** (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason entre 2 e 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL.

Apêndice F – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1058205 (KLK3) (continuação)

SNP ID	Níveis de PSA – HPB					
	Genótipo	<4	4-10	>10	Total	<i>p</i>
rs1058205 (KLK3)	CC	9	1	1	11	0,39
	CT	21	10	3	34	
	TT	43	10	2	55	
	Total	73	21	6	100	
	<hr/>					
SNP ID	Níveis de PSA – CaP					
	Genótipo	<4	4-10	>10	Total	<i>p</i>
rs1058205 (KLK3)	CC	0	1	4	5	0,71
	CT	2	2	7	11	
	TT	3	8	13	24	
	Total	5	11	21	40	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. O **I-PSS** (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason entre 2 e 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL.

Apêndice G – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs486907 (RNASEL)

Variáveis	Controle – rs486907 (RNASEL)			<i>p</i>
	GG	GA	AA	
IMC (kg/m ²)	25,83 23,70;28,56	26,53 24,06;29,02	27,59 19,63;29,76	0,84
PSA_{total} (ng/mL)	0,96 0,54;1,76	1,10 0,54;1,98	0,37 0,37;0,37	0,33
PSA_{livre} (ng/mL)	0,31 0,19;0,40	0,36 0,15;0,67	0,06 0,06;0,06	0,17
Peso da Próstata* (g)	27,00 23,50;30,10	29,00 21,75;42,25	31,00 31,00;31,00	0,78

Variáveis	HPB – rs486907 (RNASEL)			<i>p</i>
	GG	GA	AA	
IMC (kg/m ²)	25,80 23,43;27,76	27,55 24,80;29,38	24,83 24,09;28,90	0,23
PSA_{total} (ng/mL)	2,34 1,08;4,82	2,60 1,03;4,98	3,06 1,46;5,27	0,75
PSA_{livre} (ng/mL)	0,51 0,23;0,89	0,45 0,18;0,93	0,67 0,57;1,03	0,59
Peso da Próstata* (g)	47,00 35,00;57,84	48,95 37,50;73,00	39,00 32,00;60,00	0,41

Variáveis	CaP – rs486907 (RNASEL)			<i>p</i>
	GG	GA	AA	
IMC (kg/m ²)	26,45 24,58;27,98	28,12 24,63;31,79	26,96 24,22;31,18	0,70
PSA_{total} (ng/mL)	14,21 6,65;27,91	12,69 3,05;21,90	16,14 6,94;333,32	0,71
PSA_{livre} (ng/mL)	1,49 1,03;2,91	1,00 0,02;2,43	0,91 0,15;1,03	0,24
Peso da Próstata* (g)	35,00 27,50;52,00	50,90 26,00;100,00	33,10 31,20;35,00	0,47

Os valores indicam a mediana (1º quartil; 3º quartil). *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste de Kruskal-Wallis. **IMC**: índice de massa corporal; **PSA**: antígeno específico da próstata. *Peso da próstata foi avaliado por ultrassonografia transretal.

Apêndice H – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs486907 (RNASEL)

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – HPB					
Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>	
GG	25	20	29	74	0,23	
GA	14	20	12	46		
AA	2	5	2	9		
Total	41	45	43	129		

rs486907 (RNASEL)

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – CaP					
Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>	
GG	12	12	8	32	0,79	
GA	5	6	2	13		
AA	2	2	0	4		
Total	19	20	10	49		

SNP ID	I-PSS – HPB					
Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>	
GG	37	15	23	75	0,40	
GA	18	11	18	47		
AA	3	4	2	9		
Total	58	30	43	131		

rs486907 (RNASEL)

SNP ID	I-PSS – CaP					
Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>	
GG	7	2	7	16	0,88	
GA	3	2	5	10		
AA	1	1	1	3		
Total	11	5	13	29		

SNP ID	Score de Gleason – CaP					
Genótipo	2 - 6	7 (3+4)	7 (4+3)	2 - 6	Total	<i>p</i>
GG	5	4	8	5	22	0,13
GA	0	2	2	0	4	
AA	0	0	0	2	2	
Total	5	6	10	7	28	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. O **I-PSS** (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason entre 2 e 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10.

Apêndice I – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs523349 (SRD5A2)

Variáveis	Controle – rs523349 (SRD5A2)			<i>p</i>
	CC	CG	GG	
IMC (kg/m²)	25,80 (24,55;28,41)	26,26 (23,56;29,36)	26,53 (22,18;27,92)	0,97
PSA_{total} (ng/mL)	0,85 (0,49;2,31)	1,34 (1,34;1,89)	0,60 (0,39;0,88)	0,21
PSA_{livre} (ng/mL)	0,29 (0,17;0,55)	0,32 (0,18;0,47)	0,27 (0,09;0,36)	0,74
Peso da Próstata* (g)	26,00 (25,00;46,00)	28,00 (21,00;31,10)	31,00 (27,00;32,00)	0,50

Variáveis	HPB – rs523349 (SRD5A2)			<i>p</i>
	CC	CG	GG	
IMC (kg/m²)	26,40 (23,62;28,39)	25,60 (23,78;28,73)	25,61 (23,31;29,92)	0,99
PSA_{total} (ng/mL)	2,56 (1,04;5,79)	2,4 (1,12;4,75)	2,72 (0,99;3,69)	0,93
PSA_{livre} (ng/mL)	0,43 (0,18;1,01)	0,57 (0,24;0,87)	0,48 (0,23;0,48)	0,90
Peso da Próstata* (g)	47,00 (36,15;66,60)	48,00 (34,50;68,94)	49,10 (37,35;60,75)	0,93

Variáveis	CaP – rs523349 (SRD5A2)			<i>p</i>
	CC	CG	GG	
IMC (kg/m²)	26,67 (25,26;30,50)	26,45 (24,22;28,72)	30,04 (30,04;30,04)	0,53
PSA_{total} (ng/mL)	11,23 (5,50;35,38)	17,20 (6,81;23,50)	12,46 (9,91;15,01)	0,90
PSA_{livre} (ng/mL)	1,50 (1,02;6,04)	0,95 (0,28;2,08)	1,03 (1,03;1,03)	0,27
Peso da Próstata* (g)	36,55 (27,75;36,55)	32,00 (25,00;50,95)	60,00 (60,00;60,00)	0,43

Os valores indicam a mediana (1º quartil; 3º quartil). *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste de Kruskal-Wallis. **IMC**: índice de massa corporal; **PSA**: antígeno específico da próstata. *Peso da próstata foi avaliado por ultrassonografia transretal.

Apêndice J – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs523349 (SRD5A2)

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – HPB					
	Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>
rs523349 (SRD5A2)	CC	23	22	16	61	0,21
	CG	13	14	22	49	
	GG	5	9	5	19	
	Total	41	45	43	129	

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – CaP					
	Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>
rs523349 (SRD5A2)	CC	9	11	5	25	0,93
	CG	9	8	5	22	
	GG	1	1	0	2	
	Total	19	20	10	49	

SNP ID	I-PSS – HPB					
	Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>
rs523349 (SRD5A2)	CC	25	15	21	61	0,40
	CG	25	13	13	51	
	GG	8	2	9	19	
	Total	58	30	43	131	

SNP ID	I-PSS – CaP					
	Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>
rs523349 (SRD5A2)	CC	7	1	8	16	0,25
	CG	3	4	5	12	
	GG	1	0	0	1	
	Total	11	5	13	29	

SNP ID	Score de Gleason – CaP						
	Genótipo	2 - 6	7 (3+4)	7 (4+3)	2 - 6	Total	<i>p</i>
rs523349 (SRD5A2)	CC	2	3	5	3	13	0,64
	CG	3	2	5	4	14	
	GG	0	1	0	0	1	
	Total	5	6	10	7	28	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. O **I-PSS** (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason entre 2 e 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL.

Apêndice J – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs523349 (SRD5A2) (continuação)

SNP ID	Níveis de PSA – HPB				
Genótipo	<4	4-10	>10	Total	<i>p</i>
CC	33	10	5	48	0,24
CG	25	10	0	35	
GG	14	22	1	17	
Total	72	22	6	100	

rs523349 (SRD5A2)	Níveis de PSA – CaP				
Genótipo	<4	4-10	>10	Total	<i>p</i>
CC	4	5	12	21	0,70
CG	1	5	11	17	
GG	0	1	1	2	
Total	5	11	24	40	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. O **I-PSS** (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason entre 2 e 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL.

Apêndice K – Comparação das variáveis quantitativas em relação ao rs25487 (XRCCI)

Variáveis	Controle – rs25487 (XRCCI)			<i>p</i>
	AA	AG	GG	
IMC (kg/m ²)	27,61 (24,50;29,92)	25,90 (23,84;28,37)	25,80 (23,81;29,12)	0,71
PSA_{total} (ng/mL)	0,59 (0,45;0,74)	1,17 (0,67;1,98)	0,79 (0,49;1,49)	0,29
PSA_{livre} (ng/mL)	0,17 (0,14;0,20)	0,34 (0,20;0,47)	0,29 (0,13;0,50)	0,39
Peso da Próstata* (g)	25,00 (25,00;25,00)	27,00 (22,00;30,20)	31,00 (23,00;46,00)	0,49

Variáveis	HPB – rs25487 (XRCCI)			<i>p</i>
	AA	AG	GG	
IMC (kg/m ²)	27,68 (25,88;28,69)	25,39 (23,15;28,28)	26,40 (24,22;29,72)	0,23
PSA_{total} (ng/mL)	2,55 (1,15;6,18)	2,4 (1,06;3,76)	2,76 (1,08;6,75)	0,59
PSA_{livre} (ng/mL)	0,14 (0,30;0,62)	0,52 (0,25;0,83)	0,77 (0,77;1,47)	0,30
Peso da Próstata* (g)	39,50 (32,25;50,69)	43,50 (43,50;56,33)	55,00 (45,00;68,20)	0,09

Variáveis	CaP – rs25487 (XRCCI)			<i>p</i>
	AA	AG	GG	
IMC (kg/m ²)	26,49 (25,28;34,25)	25,02 (23,78;28,13)	27,42 (26,06;30,90)	0,17
PSA_{total} (ng/mL)	9,91 (5,50;16,38)	11,23 (5,24;26,85)	14,61 (8,23;33,23)	0,64
PSA_{livre} (ng/mL)	1,00 (0,47;1,73)	1,28 (0,95;2,20)	1,03 (0,55;4,00)	0,77
Peso da Próstata* (g)	37,00 (26,50;56,50)	35,55 (28,00;63,17)	35,00 (28,00;76,20)	0,99

Os valores indicam a mediana (1º quartil; 3º quartil). *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste de Kruskal-Wallis. **IMC**: índice de massa corporal; **PSA**: antígeno específico da próstata. *Peso da próstata foi avaliado por ultrassonografia transretal.

Apêndice L – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs25487 (XRCCI)

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – HPB					
	Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>
rs25487 (XRCCI)	AA	8	2	2	12	0,10
	AG	22	30	30	82	
	GG	10	12	11	33	
	Total	40	44	43	127	

SNP ID	Cor/Raça (IBGE) – CaP					
	Genótipo	Branca	Parda	Preta	Total	<i>p</i>
rs25487 (XRCCI)	AA	4	2	0	6	0,35
	AG	9	7	4	20	
	GG	6	11	6	23	
	Total	19	20	10	49	

SNP ID	I-PSS – HPB					
	Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>
rs25487 (XRCCI)	AA	4	3	7	14	0,62
	AG	38	18	26	82	
	GG	16	8	9	33	
	Total	58	29	42	129	

SNP ID	I-PSS – CaP					
	Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>
rs25487 (XRCCI)	AA	1	0	2	3	0,26
	AG	5	0	5	10	
	GG	5	5	6	16	
	Total	11	5	13	29	

SNP ID	Score de Gleason – CaP						
	Genótipo	2 - 6	7 (3+4)	7 (4+3)	2 - 6	Total	<i>p</i>
rs25487 (XRCCI)	AA	1	1	2	0	4	0,76
	AG	2	1	4	4	11	
	GG	2	4	4	3	13	
	Total	5	6	10	7	28	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. O **I-PSS** (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason entre 2 e 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL.

Apêndice L – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs25487 (XRCCI) (continuação)

SNP ID	Níveis de PSA – HPB				
Genótipo	<4	4-10	>10	Total	<i>p</i>
AA	8	2	1	11	0,27
AG	48	12	1	61	
GG	16	7	3	26	
Total	72	21	5	98	

rs25487 (XRCCI)	Níveis de PSA – CaP				
Genótipo	<4	4-10	>10	Total	<i>p</i>
AA	0	3	2	5	0,45
AG	3	4	10	17	
GG	2	4	12	18	
Total	5	11	24	40	

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. O **I-PSS** (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason entre 2 e 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL.

Apêndice M – Comparação das variáveis qualitativas em relação ao rs1447295 (CASC8)

SNP ID	I-PSS – HPB						
Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>		
AA	3	3	2	8	0,67		
AC	12	4	11	27			
CC	43	22	30	95			
Total	58	29	43	130			
rs1447295 (CASC8)	I-PSS – CaP						
	Genótipo	Leve	Moderado	Grave	Total	<i>p</i>	
AA	0	1	1	2	0,25		
AC	2	0	0	2			
CC	9	4	12	25			
Total	11	5	13	29			
SNP ID	Score de Gleason – CaP						
Genótipo	2 - 6	7 (3+4)	7 (4+3)	8 - 10	Total	<i>p</i>	
AA	0	1	0	0	1	0,16	
AC	0	0	1	3	4		
CC	4	5	8	4	21		
Total	4	6	9	7	26		
SNP ID	Níveis de PSA – HPB						
Genótipo	<4	4-10	>10	Total	<i>p</i>		
AA	4	0	0	4	0,45		
AC	20	3	2	25			
CC	48	18	4	70			
Total	72	21	6	99			
rs1447295 (CASC8)	Níveis de PSA – CaP						
	Genótipo	<4	4-10	>10	Total	<i>p</i>	
AA	0	0	1	1	0,74		
AC	0	1	4	5			
CC	5	9	18	32			
Total	5	10	23	38			

Os valores mostram a distribuição de indivíduos em cada grupo. *p* é o valor de significância das diferenças entre os grupos, avaliado através do teste do qui-quadrado. O **I-PSS** (Score Internacional de Sintomas Prostáticos) foi dividido de acordo com o quadro sintomático do paciente. O **Score de Gleason** foi organizado nos seguintes grupos: Gleason entre 2 e 6, 7(3+4), 7(4+3) e entre 8 e 10. Os **níveis de PSA** (antígeno específico da próstata) foram divididos em: PSA abaixo de 4 ng/mL, entre 4 e 10 ng/mL e acima de 10 ng/mL.

10 ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, da pesquisa “**Análise de fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento do Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna**”, no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador (a) ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço do pesquisador(a) principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

Os objetivos desse estudo são:

- 1) Este projeto se propõe estudar fatores genéticos que possam estar influenciando o desenvolvimento de doenças características da população idosa masculina como o Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna.
- 2) Pretende-se ainda, estudar fatores que modulem o risco de desenvolver tais doenças.
- 3) Compreender a forma de atuação de todos esses fatores de maneira a identificar a doença de maneira precoce que permita adotar os tratamentos e cuidados médicos mais adequados para atenuar ou diminuir esses riscos.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em realizar a leitura e assinatura do termo de consentimento para que sejam coletadas amostras de 5 ml de sangue total e utilizadas para posterior extração de DNA, podendo ser solicitada uma segunda coleta, caso o material não seja suficiente ou sofra algum tipo de alteração (coagulação, hemólise), **sem que isto acarrete nenhum prejuízo ou risco para a saúde do paciente, exceto aqueles relacionados com um pequeno desconforto comum à retirada rotineira de sangue, que será realizada por pessoal previamente treinado.**

O material biológico coletado (sangue) será encaminhado ao LabGen (Laboratório de Genética Humana da UNIGRANRIO para o estudo molecular. Serão respeitadas as normas vigentes para Pesquisa em Seres Humanos segundo a resolução do Ministério da Saúde 196/96, especialmente relevantes aos estudos de caráter genético.

Custo/Reembolso para o participante: A participação nesta pesquisa não envolverá custo adicional com sua participação. As consultas, exames, tratamentos serão totalmente gratuitos, não recebendo nenhuma cobrança com o que será realizado. Você também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

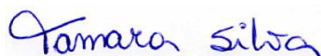
Confidencialidade da pesquisa: O sigilo e a confidencialidade das informações obtidas pelo estudo serão preservados. A identidade dos participantes não será revelada, pois cada amostra de material biológico fará parte de um banco de dados identificados por códigos específicos. Os resultados serão utilizados com fins científicos, podendo ser

publicados em revistas científicas. Os indivíduos que se opuserem a ingressar no projeto, ou que quiserem se retirar do mesmo, não sofrerão nenhum tipo de penalidade referente ao seu atendimento clínico, acesso a tratamentos disponíveis, ou acesso a qualquer outro tipo de atividade assistencial e/ou de pesquisa que por ventura possam existir no futuro.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis.

Pesquisadora responsável: Tamara Silva

Endereço: LabGen – Laboratório de Genética Humana/Escola de Ciências da Saúde / Universidade do Grande Rio – Bloco F – Rua José de Souza Herdy 1160, Duque de Caxias, RJ; CEP 25071–202; Telefone: (21) 2672–7881; Email: bio.tamarasilva@gmail.com



Tamara Silva
Pesquisadora Responsável
Tel.: (21) 2672–7881
Email: bio.tamarasilva@gmail.com

Eu, _____, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado pelos procedimentos que serão realizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento. Poderei consultar a pesquisadora responsável (acima identificada), a quem poderei contatar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone (021) 2672–7881 ou e-mail bio.tamarasilva@gmail.com sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo. A pesquisadora me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071–202 – Telefone (021) 2672–7733 – Endereço Eletrônico: cep@unigranrio.com.br.

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

_____, _____ de _____ de 20____.

ASSINATURA DO VOLUNTÁRIO

Anexo B – Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Unigranrio)



Duque de Caxias, 23 de agosto de 2018

Do: Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO

Para Pesquisadora Principal: Tamara Silva


Para Orientadores: Prof. Dr. Pedro Hernán Cabello Acero

Prof. Dr. Paulo Emílio Correa Leite

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO, após avaliação considerou **aprovado** o projeto de pesquisa **“RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES EM GENES ASSOCIADAS AO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA E DA HIPERPLASIA BENIGNA PROSTÁTICA E AVALIAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS QUANTO A EFICIÊNCIA E CITOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA”**, protocolado sob o número de CAAE 88510618.8.0000.5283, encontrando-se a referida pesquisa e o Termo de consentimento Livre e Esclarecido em conformidade com a Resolução N.º 466, de 12 de Dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

Os pesquisadores deverão informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética em Pesquisa solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa, conforme cronograma apresentado, encaminhe a este comitê um sumário dos resultados do projeto, a fim de que seja expedido o certificado de aprovação final.


Prof. Renato C. Zambrotti
Coordenador do CEP-UNIGRANRIO


Andreia Peter Christo
Secretária do CEP/UNIGRANRIO

CEP/UNIGRANRIO – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA da UNIGRANRIO
Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – 25 de Agosto – Duque de Caxias – CEP: 25071-202
Tel.: 21 2672-7733 – E-mail: cep@unigranrio.com.br

Anexo C – Comprovante de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (INCA)



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER JOSÉ ALENCAR
GOMES DA SILVA - INCA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Rastreamento de mutações em genes associados ao desenvolvimento do Câncer de Próstata e da Hiperplasia Benigna Prostática e avaliação de nanopartículas quanto a eficiência e citotoxicidade da doxorubicina.

Pesquisador: TAMARA SILVA

Área Temática: Genética Humana;
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 5

CAAE: 88510618.8.3002.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.659.168

Apresentação do Projeto:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado CEP/INCA nº 3.410.724 de 25/06/2019.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado CEP/INCA nº 3.410.724 de 25/06/2019.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado CEP/INCA nº 3.410.724 de 25/06/2019.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de resposta ao Parecer Consubstanciado CEP/INCA nº 3.639.061 de 14/10/2019

Estudo exploratório para investigar a associação de polimorfismos genéticos (SNP) com o

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 204
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br

Continuação do Parecer: 3.659.168

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 24 de Outubro de 2019

Assinado por:
Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador(a))