

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

KELLY GOMES DUARTE

**Análise da presença de mutações germinativas em genes de reparo do DNA
em pacientes portadores de câncer de próstata localizado**

Ribeirão Preto

2019

KELLY GOMES DUARTE

**Análise da presença de mutações germinativas em genes de reparo do DNA
em pacientes portadores de câncer de próstata localizado**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Morfologia e Cirurgia experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Borges Reis

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Duarte, Kelly Gomes

Análise da presença de mutações germinativas em genes de reparo do DNA em pacientes portadores de câncer de próstata localizado/ Kelly Gomes Duarte; orientador, Rodolfo Borges dos Reis – 2019.

104 f. il 30cm

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Versão original

1.Câncer de próstata. 2. Genes de reparo do DNA. 3. Sequenciamento de nova geração. 4. Rastreamento. 5. Medicina personalizada.

I. Borges, Rodolfo Borges dos, orient. II. Título.

II.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Duarte, Kelly Gomes

Análise da presença de mutações germinativas em genes de reparo do DNA em pacientes portadores de câncer de próstata localizado

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Julgamento _____

DEDICATÓRIA

Á minha família, com muito amor, carinho, gratidão e incansável apoio durante a elaboração deste trabalho. Em especial a minha mãe, por ser esse ser de luz, que me apoia durante minhas lutas, me acolhe durante as derrotas e sempre me incentiva a ser melhor. Palavras não seriam capazes de expressar minha eterna gratidão. E ao meu pai que não se encontra mais presente entre nós, mas que sempre foi meu principal motivador e responsável por esse meu desejo de contribuir com a ciência.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela oportunidade da vida, saúde e amparo. Por me ajudar a ter resiliência diante as dificuldades e aprender com elas, buscando evoluir diariamente.

Á minha família que é minha base, sempre me apoiando e auxiliando. Responsáveis por esta oportunidade de estar concluindo mais essa etapa na minha vida profissional.

Ao Marcos Vinícius, por toda a compreensão e suporte durante essa etapa, gratidão por todo o amor e carinho dedicado a mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodolfo Borges, por me conceder a oportunidade de realizar o mestrado. Por todos os ensinamentos, paciência, auxílio e atenção. Obrigada por toda a orientação durante esses anos, tenho certeza que estou concluindo essa etapa como uma profissional melhor em relação à quando entrei, e isso agradeço ao senhor. O admiro por todo o conhecimento e entusiasmo no campo da pesquisa científica.

A Dra. Claudia Sares por ser uma pessoa importante no meu crescimento pessoal e profissional. Sempre presente ao meu lado durante esses anos de laboratório, por todos os ensinamentos, puxões de orelha e principalmente por estar sempre à disposição a me ajudar.

Ao meu colega de laboratório Renato De Lucca, pela companhia durante esses anos, e por todo apoio durante minha admissão no mestrado.

A equipe do laboratório do professor Dr. Wilson Araújo, por todo o auxílio prestado durante a minha pesquisa, em especial ao professor Dr. Wilson Araújo e a Kamilla Peronni.

A equipe de enfermagem e residentes por todo apoio e auxílio durante a coleta das amostras do meu trabalho, em especial a Ivana, Camila, Marli e Meire.

Aos pacientes que voluntariamente fizeram parte do trabalho, contribuindo assim para o progresso das pesquisas científicas e para a realização do meu mestrado.

A Juliana Pischiotin por todos os momentos de auxílio e esclarecimentos durante esses anos no programa de clínica cirúrgica e a Lauceia Conrado por todo apoio prestado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro com a disponibilização da bolsa durante a pesquisa.

“A ciência serve para nos dar uma ideia de quão extensa é a nossa
ignorância.”

(Félicité Robert de Lamennais)

RESUMO

Duarte, Kelly Gomes. **Análise da presença de mutações germinativas em genes de reparo do DNA em pacientes portadores de câncer de próstata localizado.** 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Introdução: No Brasil, o câncer de próstata é a neoplasia mais prevalente entre os homens excluindo-se os tumores de pele não melanoma, as estimativas segundo o Instituto Nacional de Câncer são de 68.220 novos casos para o biênio 2018-2019. As recomendações para o rastreamento é o esclarecimento quanto aos riscos e benefícios ao paciente em homens a partir dos 50 anos. A estratificação de risco com base nos achados genéticos, podem auxiliar na detecção de indivíduos com maior chance de desenvolver a doença, direcionando o rastreamento, bem como selecionar pacientes para determinadas terapias (medicina personalizada). Não existem dados brasileiros relativos à análise de variantes patogênicas em genes de reparo do DNA nos pacientes portadores de câncer de próstata localizado, assim como nenhum outro estudo publicado teve como alvo apenas pacientes jovens.

Objetivo: analisar a presença de variantes germinativas em 8 genes de reparo do DNA (*BRCA1*, *BRCA2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *TP53*), em pacientes portadores de câncer de próstata localizado com idade inferior a 60 anos. **Pacientes e Métodos:** Foram selecionados 30 pacientes diagnosticados com câncer de próstata localizado no Hospital das Clínicas da FMRP com a participação de forma voluntária mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O sequenciamento de nova geração em painel multigênico foi realizado a partir do DNA extraído das amostras. **Resultados:** Os dados clínicos e demográficos dos pacientes foram obtidos, para a caracterização das amostras. Foi analisado as variantes presentes nos genes alvos, e após a aplicação dos filtros, 102 variantes foram identificadas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH6* e *PMS2*, sendo o *BRCA1* o gene mais mutado. Quatro novas variantes foram identificadas em nosso estudo, juntamente com inúmeros polimorfismos nunca antes associados ao câncer de próstata. Variantes descritas na literatura associada ao câncer foram relacionadas ao histórico familiar de alguns pacientes. **Conclusão:** Nossos dados contribuem para a comunidade genética com um perfil de mutações em pacientes com câncer de próstata localizado no Brasil, bem como três quatro novas variantes.

Palavras chave: câncer de próstata, genes de reparo do DNA, sequenciamento de nova geração, rastreamento, medicina personalizada.

ABSTRACT

Duarte, K. G. **Germeline mutations of DNA repair genes in patients with localized prostate cancer**. 2019. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019

Introduction: In Brazil, prostate cancer is the most prevalent cancer among men, excluding non-melanoma skin tumors, according to the National Cancer Institute estimates of 68,220 new cases for the 2018-2019 biennium. Recommendations for screening are clarification on the risks and benefits to the patient in men aged 50 and over. Risk stratification based on genetic findings may help detect individuals most likely to develop the disease by directing screening as well as selecting patients for certain therapies (personalized medicine). There are no Brazilian data on the analysis of pathogenic variants in DNA repair genes in patients with localized prostate cancer, as no other published study has targeted only young patients.

Objective: To analyze the presence of germline variants in 8 DNA repair genes (BRCA1, BRCA2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 and TP53) in patients with localized prostate cancer under 60 years of age. **Patients and Methods:** Thirty patients diagnosed with prostate cancer located at the FMRP Hospital das Clínicas were selected, with voluntary participation by signing the Informed Consent Form. Next generation sequencing in multigenic panel was performed from the extracted DNA of the samples. **Results:** The clinical and demographic data of the patients were obtained for the characterization of the samples. The variants present in the target genes were analyzed, and after the application of the filters, 102 variants were identified in the genes BRCA1, BRCA2, EPCAM, MLH1, MSH6 and PMS2, with BRCA1 being the most mutated gene. Four new variants were identified in our study, along with numerous polymorphisms never before associated with prostate cancer. Variants described in the literature associated with cancer were related to the family history of some patients. **Conclusion:** Our data contribute to the genetic community with a mutation profile in prostate cancer patients located in Brazil, as well as three four new variants.

Key words: prostate cancer, DNA repair genes, next generation sequencing, screening, personalized medicine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Localização do gene BRCA1 no cromossomo 17.	6
Figura 2.	Localização do gene BRCA2 no cromossomo 13.	7
Figura 3.	Localização do gene EPCAM no cromossomo 2.	8
Figura 4.	Localização do gene MLH1 no cromossomo 3.	9
Figura 5.	Localização do gene MSH2 no cromossomo 2.	10
Figura 6.	Localização do gene MSH6 no cromossomo 2.	11
Figura 7.	Localização do gene PMS2 no cromossomo 7.	11
Figura 8.	Localização do gene TP53 no cromossomo 17.	12
Figura 9.	Desenho do estudo.	20
Figura 10.	Etapas de construção da biblioteca.	25
Figura 11.	Diagrama esquemático do processo de amplificação clonal através das etapas do PCR emulsão e enriquecimento das amostras para obtenção das ISPs positivas.	26
Figura 12.	Etapas do processo de sequenciamento na plataforma Ion Torrent PGM.	28
Figura 13.	Sistema de estadiamento TNM para o câncer de próstata critério de extensão do tumor primário (T).	35
Figura 14.	Gel de agarose a 1% do DNA extraído das amostras analisadas.	37
Figura 15.	Porcentagem das variantes presente nos genes de reparo do DNA selecionados no estudo, sem aplicação dos filtros.	38
Figura 16.	Porcentagem das variantes presente nos genes de reparo do DNA selecionados no estudo, com aplicação dos filtros.	39
Figura 17.	Oncoprint com os dados obtidos no estudo.	41
Figura 18.	Heredograma do probando I.	53
Figura 19.	Heredograma do probando II.	54
Figura 20.	Heredograma do probando III.	55
Figura 21.	Heredograma do probando IV.	56
Figura 22.	Heredograma do probando IV.	57
Figura 23.	<i>Protein Protein Interaction</i> dos genes de reparo do DNA selecionados para o estudo.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados clínicos e demográficos dos pacientes analisados.....	37
Tabela 2.	Variantes identificadas no estudo.	42
Tabela 3.	Variantes encontradas e já relacionadas a neoplasias na literatura pesquisada.	45
Tabela 4.	Variantes relacionadas com o câncer de próstata.	49
Tabela 5.	Variantes não relacionada a neoplasias na literatura.	51
Tabela 6.	Variantes não descritas.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. Câncer de Próstata.....	2
1.3. Câncer Hereditário.....	4
1.4. Reparo do DNA e câncer de próstata	4
1.5. Genes de reparo do DNA	5
1.6. Implicações Clínicas	13
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVO.....	18
4. DESENHO DO ESTUDO.....	20
5. PACIENTES E MÉTODOS	22
5.1. Pacientes.....	22
5.3. Extração do DNA.....	23
5.4. Purificação das amostras.....	24
5.5. Gel de agarose	24
5.6. Quantificação das amostras	24
5.7. Construção da biblioteca	24
5.8. Preparo do <i>Template</i>	26
5.9. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	27
5.10. Análise dos dados.....	29
6. RESULTADOS	33
6.1. Caracterização da amostra.....	33
6.1.1. Idade ao diagnóstico e Etnia	33
6.1.2. Índice de Massa Corporal (IMC) ao diagnóstico	33
6.1.3. Histórico familiar de câncer	33
6.1.4. PSA sérico ao diagnóstico	33
6.1.5. Tratamento.....	34
6.1.6. Estadiamento patológico após o tratamento cirúrgico (pT)	34
6.1.7. Escore <i>Gleason</i>	35
6.2. Integridade do DNA	37
6.3. Genes mutados	38
6.4. Variantes	40

6.5. Genealogia	53
7. DISCUSSÃO	59
8. CONCLUSÃO	67
9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO	69
10. PRÓXIMOS PASSOS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
ANEXOS	82

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Próstata

O câncer é um problema de saúde pública, sua prevalência aumenta não só devido ao crescimento e envelhecimento populacional como também a presença de fatores de risco genéticos e comportamentais. Apesar dos altos investimentos em pesquisa e campanhas de educação, o número de casos novos de diversas neoplasias continua a aumentar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A glândula prostática faz parte do aparelho reprodutor masculino, sendo responsável a produção do líquido prostático, responsável pela alcalinização da uretra. O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia mais frequente do homem excetuando os tumores cutâneos não melanoma. Foram estimados 1.276.106 casos novos de CaP no mundo em 2018, estes correspondem a 7,1% de todos casos novos de câncer; e 358.989 mortes, que representam 3,8% de todos as mortes por neoplasias no mundo (BRAY et al., 2018). O *National Cancer Institute* estimou 174.650 novos casos de CaP e 31.620 mortes nos Estados Unidos para ano 2019 (HOWLADER et al., 2019). O Brasil é um dos países em que a doença apresenta maior prevalência, com aproximadamente 68.000 casos novos estimados para cada ano do biênio 2018-2019, equivalente a um risco estimado de 66,12 novos casos para cada 100 mil homens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

As políticas de rastreamento têm contribuído para a queda da mortalidade devido ao CaP. A Sociedade Brasileira de Urologia recomenda o rastreamento para a detecção precoce do CaP, após esclarecimento quanto aos riscos e benefícios ao paciente, para homens a partir dos 50 anos, indivíduos com fatores de risco devem iniciar o rastreamento a partir dos 45 anos. As ferramentas utilizadas para a detecção precoce são: o toque retal e a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA). Utilizando esta abordagem, a mediana da idade ao diagnóstico tem apresentado queda, caindo de 72 para 66 anos (HOWLADER et al., 2019). Entretanto, homens jovens, com menos de 60 anos, apresentam maior mortalidade câncer específica, levantando a hipótese que o processo de carcinogênese possa

ser biologicamente diferente quando comparado aos indivíduos mais velhos (THORSTENSON et al., 2017).

A etnia também aparece como marcador para o desenvolvimento e presença de doença mais agressiva. Nos Estados Unidos homens afro-americanos (AA) apresentam maior risco e doença mais agressiva ao diagnóstico quando comparados aos caucasianos. Fatores genéticos, moleculares e socioeconômicos têm sido imputados como causadores destes achados (SMITH; EGGENER; MURPHY, 2017).

1.2. Genética x Câncer de Próstata

Várias causas têm sido imputadas na gênese do CaP. Devido a fraca relação entre os fatores comportamentais e o desenvolvimento desta neoplasia, alterações genéticas têm sido cada vez mais estudadas. Dentre os fatores genéticos estão aqueles relacionados com a etnia dos pacientes. Genes e vias de sinalização importantes, relacionadas ao desenvolvimento do CaP, estão expressos diferentemente em grupos étnicos distintos (POWELL et al., 2013).

A variação na sequência de DNA que afeta somente uma base, é denominada como *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs). Os SNPs tem sido relacionados ao aumento do risco de várias neoplasias, a presença de polimorfismos específicos pode aumentar o risco de CaP em até 46% (ZHENG et al., 2008). Mais de 100 polimorfismos associados ao maior risco de CaP já foram descritos identificados, principalmente em homens jovens com histórico familiar para a doença (EELES et al., 2008; EELES; RAGHALLAIGH, 2018; ZHANG et al., 2019; ZHENG et al., 2008).

Polimorfismos específicos também estão vinculados a etnia, este fato pode ser evidenciado pelo aumento do risco de CaP na população asiática estar relacionado a polimorfismos diferentes dos apontados como fator de risco para a população afro-americana (CHEN et al., 2018; DAREMIPOURAN et al., 2019; KANG et al., 2018).

A importância das informações genéticas geradas pode ser observada com a construção de ferramentas com o intuito de prever o risco de um indivíduo apresentar CaP. O *Genetic Risk Score (GRS)*, através da análise de polimorfismos específicos, estima o risco de um indivíduo vir a apresentar CAP (HELFAND et al., 2018).

O surgimento do *Next Generation Sequencing (NGS)* foi um marco importante para o estudo genético de diversas doenças. Esta metodologia, amplamente disseminada, é utilizada cada vez mais com o intuito de se conhecer assinaturas genéticas e as vias envolvidas nos processos de gênese e disseminação de diversos tumores (BACA et al., 2014; BERGER et al., 2011; LAPOINTE et al., 2007; NETWORK, 2016; TAYLOR et al., 2011).

1.3. Câncer Hereditário

A compreensão dos fatores hereditários envolvidos no aparecimento de diversas neoplasias têm sido foco de interesse. O advento das ferramentas moleculares e genéticas têm auxiliado no entendimento e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e diagnósticas.

A maioria dos casos de CaP é causado por variantes esporádicas (GANDHI et al., 2018), entretanto, mutações germinativas em genes de reparo do DNA têm sido descritas como responsáveis pelo CaP na sua forma hereditária. (PETRIDIS et al., 2019; SOKOLENKO et al., 2015). Até o momento estudos descreveram 167 *loci* relacionados à susceptibilidade ao CaP (BENAFIF; KOTE-JARAI; EELES, 2018; SCHUMACHER et al., 2018).

1.4. Reparo do DNA e câncer de próstata

O reparo do DNA é um conjunto de processos que tem como objetivo a identificação e correção de danos no DNA. Os mecanismos de reparo estão constantemente ativos durante o ciclo celular, mais precisamente durante a fase G2 após a replicação, antes da divisão dos cromossomos. Quando esses mecanismos

falham a apoptose celular não ocorre, e lesões como *single-strand break*, *single-base damage*, *crosslinks*, *bulky lesions*, *mismatch* e *double-strand break* podem perpetuar uma célula danificada. A Capacidade de reparação de danos é imprescindível para manter a estabilidade genômica (BERNSTEIN et al., 2002).

Vários são os fatores causadores de danos ao DNA. Os agentes alquilantes, a radiação eletromagnética, as espécies reativas de oxigênio, a radiação ultravioleta, mutagênicos químicos e colapsos na forquilha de replicação, são os principais agressores do material genético. Uma vez detectado o erro vias específicas de reparo são ativadas.

As principais vias de reparo são *Mismatch Repair (MMR)*, *Base Excision Repair (BER)*, *Nucleotide Excision Repair (NER)* e *Double-Strand Break (DSB) Recombinational Repair*, que inclui a via *Nonhomologous End-Joining (NHEJ)* e a *Homologous Recombinational Repair (HHR)* (BERNSTEIN et al., 2002; MATEO et al., 2017).

Em caso de falha nos mecanismos de reparo, a vulnerabilidade celular aumenta, aumentando a instabilidade do genoma, podendo desencadear o processo de tumorigênese. Variantes nos genes de reparo foram encontradas em aproximadamente 8 a 10% no tecido tumoral de pacientes portadores de CAP localizado, e em 20 a 25% de tumores metastáticos (FRASER et al., 2017; NETWORK, 2016; PRITCHARD et al., 2016a). Entretanto, aproximadamente 8% a 12% dos pacientes com CaP avançado podem ser portadores de mutações germinativas relacionadas ao controle de proliferação celular (PRITCHARD et al., 2016b).

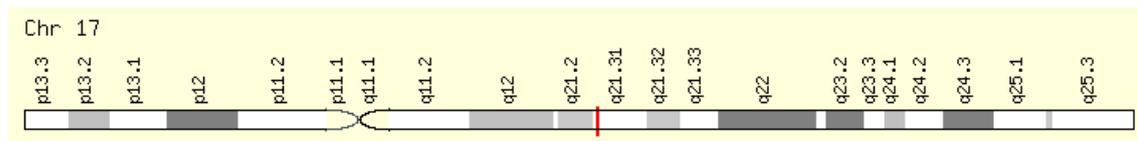
1.5. Genes de reparo do DNA

- *BRCA1*

O *BRCA1* é um gene codificador constituído por 24 éxons e está localizado no cromossomo 17q21.31 (Figura 1). Esse gene é dividido em três regiões: um domínio N-terminal conhecido como *RING*, uma parte central com estrutura não codificadora, e domínio *BRCT* no C-terminal (VENKITARAMAN, 2014). O domínio

RING interage com outras proteínas, como o *BARD1*, e formam um complexo que atua no processo de reparo das *DSBs* (WU et al., 1996). (WU et al., 1996). O outro domínio BRCT, com 85 a 95 aminoácidos, medeia as interações entre proteínas, esse domínio também é encontrado em proteínas envolvidas no processo de reparo e regulação do ciclo celular (HUYTON et al., 2000).

Figura 1. Localização do gene *BRCA1* no cromossomo 17.



Fonte: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRCA1&keywords=brca1>>.

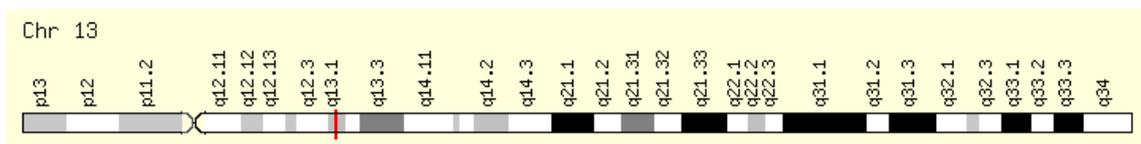
O gene *BRCA1* é considerado um supressor tumoral apresentando função nos mecanismos de reparo do DNA, controle do ciclo celular, remodelamento de cromatina, ubiquitinação. O mecanismo de ação do *BRCA1* consiste na neutralização de um fator do *NHEJ* após a formação de *DSBs*, podendo ocasionar a interrupção da funcionalidade do gene, consequentemente ocasionando defeitos nas suas funções (ANANTHA et al., 2017).

As variantes germinativas no *BRCA1* apresentam uma relação bem sedimentada nos tumores de mama e ovário, além do mais, diversas decisões terapêuticas são baseadas na presença ou ausência de mutações neste gene (METCALFE et al., 2010; POVEDA et al., 2019; URBINA-JARA et al., 2019). Variantes no *BRCA1* foram identificadas em judeus Ashkenazi portadores de neoplasia prostática. Outros autores também demonstram que alterações neste gene além de aumentar o risco de CaP, podem a manifestação da doença na sua forma mais agressiva (KIRCHHOFF et al., 2004; LECARPENTIER et al., 2017; LEONGAMORNLEERT et al., 2012).

- *BRCA 2*

O *BRCA2* é um gene constituído por 27 éxons e está localizado no cromossomo 13q13.1 (Figura 2). Este gene atua como um supressor tumoral, codificando proteínas importantes para a estabilidade genômica, reparo do DNA e regulação transcricional. Mutações no *BRCA2* estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento de neoplasias, principalmente os tumores de mama e ovário (LORD; ASHWORTH, 2016). Os produtos gênicos do *BRCA1* e *BRCA2* atuam em uma via comum importante para a integridade do genoma e manutenção da estabilidade cromossômica.

Figura 2. Localização do gene *BRCA2* no cromossomo 13.



Fonte: < <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRCA2&keywords=brca2>>.

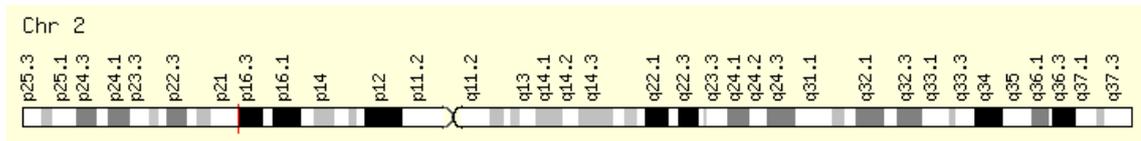
No CaP variantes no *BRCA2* são mais frequentes em tumores metastáticos do que em tumores localizados, estando associado a menor sobrevida e progressão rápida da doença (EDWARDS et al., 2010; PRITCHARD et al., 2016b; TRYGGVADÓTTIR et al., 2007). Pacientes portadores de variantes no *BRCA2* apresentam maior risco de mortalidade câncer específica quando comparados aos pacientes com variantes no *BRCA1* (OH et al., 2019). Fatores comportamentais como etilismo, tabagismo e a incidência de câncer familiar de CaP foram associados a presença de variantes patogênicas do *BRCA2* (MOMOZAWA et al., 2019).

- *EPCAM*

Estruturalmente o gene *EPCAM* é composto por um domínio N-terminal de 242 aminoácidos, um domínio transmembrana e outro citoplasmático com um C-

terminal, e está localizado no braço curto do cromossomo 2p21 (Figura 3) (SCHNELL; CIRULLI; GIEPMANS, 2013).

Figura 3. Localização do gene *EPCAM* no cromossomo 2.



Fonte: < <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=EPCAM&keywords=epcam>>.

O *EPCAM* é responsável pela produção de uma proteína que atua na adesão celular, nomeada *Epithelial cell adhesion molecule* (*EpCAM*). A *EpCAM* é uma glicoproteína transmembrana do tipo I que foi originalmente identificada como um antígeno tumoral devido ao seu alto nível de expressão em neoplasias epiteliais (SCHNELL; CIRULLI; GIEPMANS, 2013; STRNAD et al., 1989). Essa proteína libera um domínio intracelular, que auxilia na retransmissão de sinais extracelulares para o núcleo da célula, esse domínio se associa a outras proteínas no núcleo, formando um complexo capaz de regular a atividade de diversos genes envolvidos na proliferação, diferenciação e migração celular (NI et al., 2012). Seu papel como um oncogene também tem sido evidenciado por regular positivamente o gene *c-myc* e o um *cluster* de ciclinas (LINNENBACH et al., 1993; MÜNZ et al., 2004).

Em estudos de linhagens celulares, a *EpCAM* foi altamente expressa em tumores primários e metastáticos de CaP, bem como associada a um pior prognóstico da doença (BENKO et al., 2013). A expressão da *EpCAM* em células tumorais circulantes (CTCs) de amostras de pacientes com CaP metastático resistente à castração tratados com docetaxel, também foi associada a alterações na proliferação celular, gênese tumoral e quimiossíntese (OKEGAWA et al., 2016).

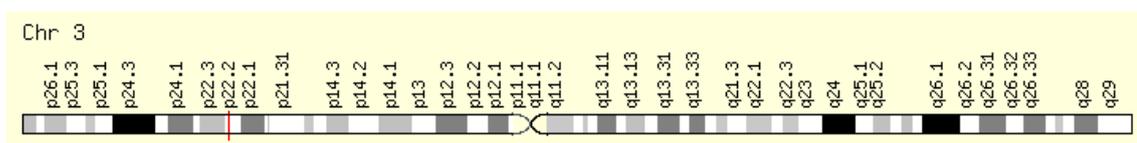
- *Mismatch Repair (MMR)*

O *Mismatch Repair (MMR)* constitui o mecanismo de vigilância do genoma, responsável por reparar os nucleotídeos que foram erroneamente incorporados durante o processo de replicação do DNA. Para a realização das funções de reparo, o *MMR* necessita fundamentalmente de seis proteínas: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* e *MLH3* (BELTRAN et al., 2015).

Danos ou *perda da heterozigose (LOH)* em genes do complexo *MMR* na linha germinativa é comumente associado ao risco de desenvolvimento de CaP em pacientes portadores da Síndrome Lynch (*SL*) (DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2016; HARALDSDOTTIR et al., 2014). Estudos em linhagens celulares de CaP demonstraram perda da expressão proteica do *MLH1*, *MLH2* e *PMS2* (CHEN et al., 2001). Somando-se a este fato, a presença de *SNPs* também pode influenciar no processo de tumorigênese, principalmente quando as alterações ocorrem nos genes *MLH1*, *MLH2* e *PMS2* (LANGEBERG et al., 2010; ROSTY et al., 2014).

O *MutL homolog 1 (MLH1)* é um gene supressor tumoral composto por 21 éxons, localizado no cromossomo 3p22,2, (Figura 4). Mutações neste gene são frequentes no câncer de cólon hereditário não poliposo (CCHNP). Um estudo revelou variantes nos genes *MSH2*, *MLH1* e *MSH6* em 28 pacientes que apresentavam CaP em uma amostra e 1609 portadores de *SL* (PILIÉ et al., 2017). Uma variante patogênica do *MLH1* também foi detectada em portadores de CAP com menos de 55 anos.

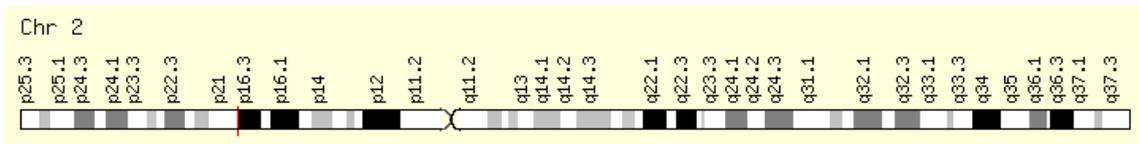
Figura 4. Localização do gene *MLH1* no cromossomo 3.



Fonte: < <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MLH1&keywords=mlh1> >.

O *MutS homolog 2 (MSH2)* é composto por 21 éxons e está localizado no cromossomo 2p21 (Figura 5). Variantes nesse gene têm sido relacionadas a diversas neoplasias do trato gênito-urinário, gastrointestinal e tumores cerebrais (DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2019). Também foram encontradas mutações patogênicas bi alélicas nos genes *BRCA2*, *NBN*, *MSH2* e *MLH1* em pacientes portadores adenocarcinoma prostático (LOTAN et al., 2019).

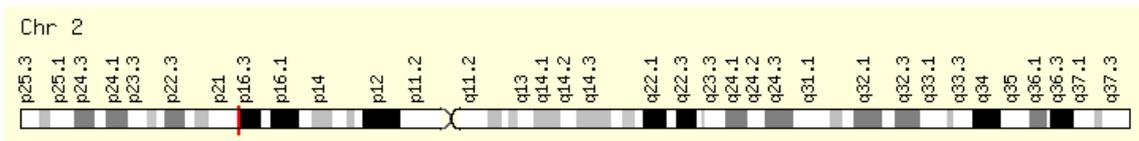
Figura 5. Localização do gene *MSH2* no cromossomo 2.



Fonte: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSH2&keywords=msh2>>.

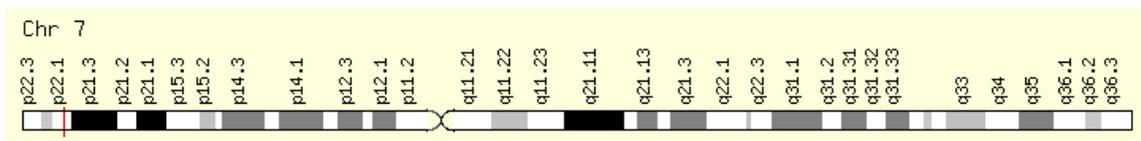
Variantes em sequências repetitivas em trechos do DNA são definidas como instabilidade de microssatélite (MSI), um estudo utilizando técnicas de imunohistoquímica revelou que indivíduos com adenocarcinoma prostático primário e carcinoma prostático de pequenas células apresentavam MSI, perda da proteína *MSH2*, e inativação bialélica do gene *MSH2*, os achados foram validados posteriormente por NGS (GUEDES et al., 2017). Em linhagens celulares de CaP a proteína *hMSH2* igualmente apresentou perda de expressão, bem como deleções homozigóticas dos éxons 9 a 16, causando truncamento proteico (LEACH et al., 2000).

O *MutS Homolog 6 (MSH6)* é um gene constituído por 12 éxons, encontra-se localizado no cromossomo 2p16.3 (Figura 6). As proteínas do *MMR*, como *MSH6*, *PMS2* e *MLH1* apresentam um papel fundamental na regulação da carcinogênese, evidenciado em um estudo com 11.000 amostras analisadas de tecidos prostáticos normais e neoplásicos (WILCZAK et al., 2016). A superexpressão do *MSH6* foi identificada nas células neoplásicas em 42,1% dos casos analisados, este achado também foi associado ao pior prognóstico da doença (ALBERO-GONZÁLEZ et al., 2019).

Figura 6. Localização do gene *MSH6* no cromossomo 2.

Fonte: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MSH6&keywords=msh6>>.

O *PMS1* homolog 2 (*PMS2*), localizado no cromossomo 7p22.1 (Figura 7), possui 16 éxons, e forma um heterodímero *MutL-alfa* com o *MLH1*. A proteína codificada por este gene é um componente importante para o sistema de reparo do DNA (NICOLAIDES et al., 1995). Alberto e colaboradores observaram a perda de expressão do *PMS2* em 2% dos pacientes com CaP. Também foi encontrado associação positiva entre a perda de expressão e o menor tempo para recorrência bioquímica (ALBERO-GONZÁLEZ et al., 2019).

Figura 7. Localização do gene *PMS2* no cromossomo 7.

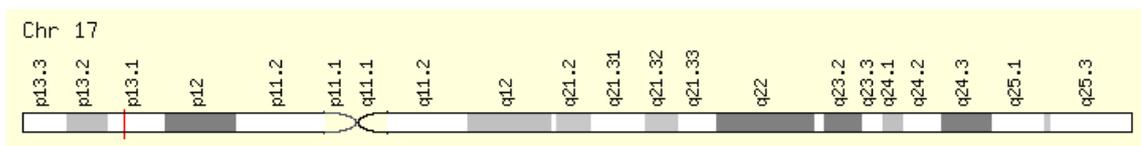
Fonte: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PMS2&keywords=pms2>>.

O *MSH6*, *MLH1* e *PMS2* apresentaram níveis elevados de expressão gênica em tecidos de pacientes portadores de CaP avançado, com alto escore de *Gleason* (WILCZAK et al., 2016).

- *TP53*

O *tumor protein p53 (TP53)* é conhecido como o guardião do genoma, esse gene está localizado no cromossomo 17p13., constituído por 12 éxons (Figura 8). O *TP53* codifica uma proteína supressora tumoral, esta responde ao estresse celular, regulando a expressão de genes alvos e induzindo a parada do ciclo celular, controla o mecanismo de apoptose e senescência, e influencia diretamente no reparo de DNA (LANE, 1992). Quando danos no DNA ocorrem, o nível da proteína p53 aumenta, induzindo a parada do ciclo celular ou a apoptose. Células com deficiência funcional nessa proteína, são geneticamente instáveis (KUERBITZ et al., 1992).

Figura 8. Localização do gene *TP53* no cromossomo 17.



Fonte:< <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TP53&keywords=tp53>>.

Mutações germinativas no *TP53* estão associadas a síndrome de câncer familiar Li-Fraumeni, caracterizada pelo risco aumentado de desenvolvimento de diversas neoplasias (MALKIN, 1994).

O gene *TP53* foi o mais frequentemente alterado em uma análise do perfil genômico de pacientes com CaP primário e metastático, estando presente em 43,5% das variantes encontradas (CHUNG et al., 2019). Mutações no *TP53* também foram descritas no tecido prostático de pacientes portadores de CaP. Neste estudo foram detectadas 148 variantes em 63 genes, entretanto 55,2% dos pacientes apresentaram mutações no *TP53* (IKEDA et al., 2018). Outro estudo detectou a presença de diferentes variantes como *truncating*, *deep deletion*, and *missense* no *TP53* em 18% dos pacientes portadores de CaP. O baixo nível de expressão do

TP53 correlacionou-se aos escores de *Gleason* mais elevado e ao pior prognóstico da doença (SUN et al., 2019).

1.6. Implicações Clínicas

A identificação de mutações em genes de reparo do DNA tem recebido cada vez mais atenção devido as suas implicações clínicas, pois pode influenciar o aconselhamento genético de famílias, políticas de rastreamento e a decisão terapêutica a ser tomada. Nas recomendações de 2019 do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), a investigação da presença de variantes nos genes de reparo é sugerida para pacientes com histórico familiar de CaP, doença de alto risco ou muito alto risco, localizada ou localmente avançada (independente da história familiar), presença de componente histológico intraductal, ou ancestrais judeus Ashkenazi (GIRI et al., 2018; MOHLER et al., 2019).

Segundo as recomendações do NCCN o painel de genes avaliados deve incluir: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2 (SL)* e a recombinação homóloga dos genes *BRCA2*, *BRCA1*, *ATM*, *PALB* e *CHEK2*. Para verificar a predisposição ao CaP em indivíduos não portadores, o painel deve conter no mínimo os genes *BRCA2*, *BRCA1*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* (MOHLER et al., 2019).

1.7. Implicações terapêuticas

A *Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)* é constituída por uma família de proteínas envolvidas em importantes processos celulares, sua principal função é detectar e iniciar uma resposta celular das *single stranded binding proteins (SSB)* (AME; SPENLEHAUER; MURCIA, 2004). A via PARP quando bloqueada, dificultam os processos de reparo em células tumorais, desencadeando o fenômeno da “letalidade sintética”. Esse evento ocorre quando a perda da função de um gene é compatível com a viabilidade celular, porém a perda da funcionalidade de dois genes pode causar morte celular seletiva (AME; SPENLEHAUER; MURCIA, 2004).

Um estudo retrospectivo verificou que pacientes portadores de mutações no gene *BRCA2* tratados com inibidores de *PARP*, apresentaram respostas significativamente melhor ao tratamento e declínio do nível do PSA sérico, em comparação aos indivíduos com danos em outros genes de reparo (LU et al., 2018). Olaparib é uma droga que atua como inibidor de *PARP*, aprovada pelo *Food and Drug Administration (FDA)* em 2014 como terapia para pacientes com câncer de ovário tratados com quimioterapia e portadores de variantes no *BRCA* (KIM et al., 2015). Estudos comprovam a eficiência dos inibidores de *PARP* no câncer de próstata resistente à castração (CPRC), quando mutações dos genes de reparo do DNA estão presentes (FONG et al., 2015; KAUFMAN et al., 2015; MATEO et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A presença de variantes germinativas patogênicas em genes de reparo do DNA ocorre em aproximadamente 10% dos pacientes portadores de CaP localizado (ROBINSON et al., 2015). A alta prevalência do CaP no Brasil, a miscigenação da população brasileira, e a ausência de estudos envolvendo mutações germinativas em genes de reparo do DNA nos pacientes portadores de CaP localizado no Brasil, justificam o nosso estudo.

3. OBJETIVO

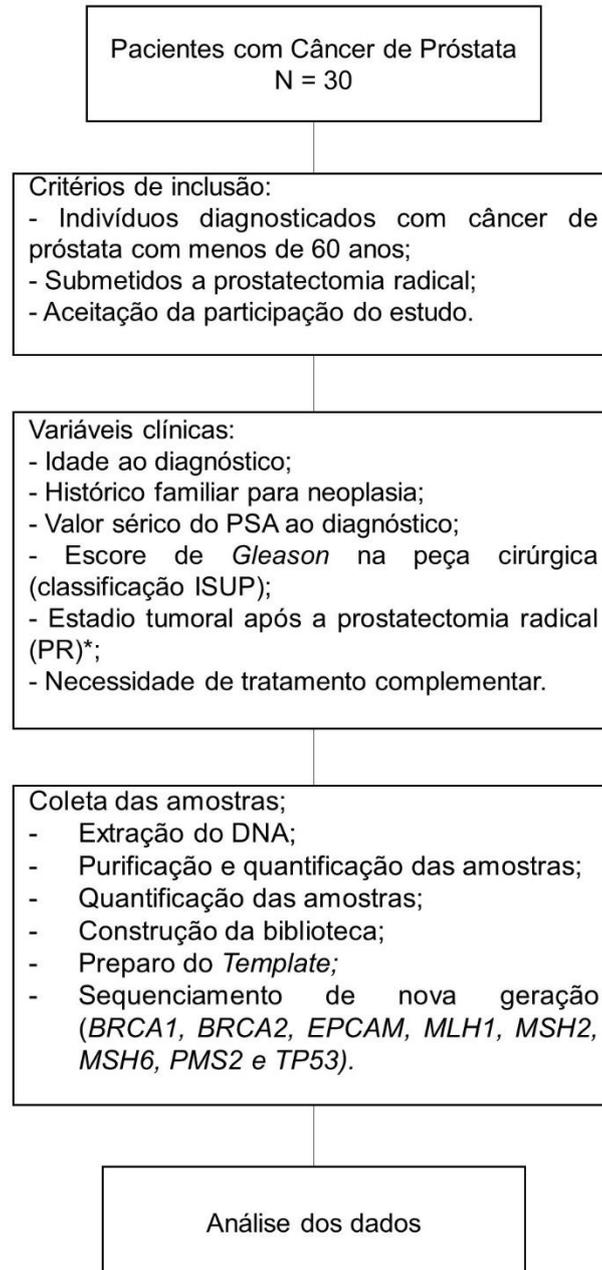
3. OBJETIVO

- Verificar a presença de variantes germinativas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *TP53*, em pacientes portadores de câncer de próstata localizado com menos de 60 anos de idade, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

4. DESENHO DO ESTUDO

4. DESENHO DO ESTUDO

Figura 9. Desenho do estudo.



5. PACIENTES E MÉTODOS

5. PACIENTES E MÉTODOS

5.1. Pacientes

Foram selecionados 30 pacientes portadores de câncer de próstata localizado com menos de 60 anos de idade recrutados no ambulatório de Uro-Oncologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, a participação ocorreu de forma voluntária e mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

I. Critérios de inclusão:

- indivíduos portadores de CaP;
- idade inferior a 60 anos;
- submetidos a prostatectomia radical;
- aceitação na participação do estudo.

II. Variáveis clínicas:

Os parâmetros clínicos avaliados foram:

- idade ao diagnóstico;
- histórico familiar para neoplasia;
- valor sérico do PSA ao diagnóstico;
- escore de *Gleason* na peça cirúrgica (classificação *ISUP*);
- estadio tumoral após a prostatectomia radical (PR)*;
- índice de massa corporal (IMC);
- necessidade de tratamento complementar.

O escore *Gleason* é o sistema comumente utilizado para classificar histologicamente o CaP, baseado na pontuação atribuída a forma da célula e a preservação da arquitetura do tecido prostático. O escore total consiste na soma dos resultados da classificação de 3 a 5 das duas áreas mais frequentes do tumor,

variando de 6 a 10. Quanto menor a pontuação melhor é o prognóstico do paciente, pontuações entre 8 e 10 retratam a alta agressividade (EGEVAD et al., 2016).

O estadio tumoral foi classificado utilizando o sistema *Tumor Node Metastasis (TNM) 2018* do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*

Os parâmetros do IMC adotados pela Organização Mundial de Saúde para avaliar adultos entre 20 a 59 anos de idade, considera como peso normal indivíduos que apresentam o IMC entre 18,5 a 24,9 kg/m², sobrepeso de 25 a 29,9, obesidade grau I de 30 a 34,9, obesidade grau II de 35 a 39,9 e obesidade grau III acima de 40 kg/m².

5.2. Coleta das amostras

As amostras de sangue venoso dos participantes foram obtidas no ambulatório de Uro-Oncologia do Hospital das Clínicas. Para a coleta de 10 ml de sangue venoso foi utilizado tubo com EDTA. A punção venosa foi realizada na face anterior do membro superior do paciente por um profissional qualificado mediante assinatura do TCLE, conforme aprovado pelo comitê de ética em pesquisa, com o número de registro 92224618.7.0000.5440/2018.

O paciente foi devidamente orientado aos cuidados após a coleta para evitar hematomas posteriores. O aparecimento de hematomas pode ocorrer de forma esporádica sendo o único fator de risco pontual do estudo.

5.3. Extração do DNA

O DNA genômico foi obtido por meio das amostras de sangue coletadas, e isolado pelo método *salting out* (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988), para ser utilizado nas etapas subsequentes do sequenciamento de nova geração.

5.4. Purificação das amostras

Para a purificação das amostras utilizamos o kit *DNA Clean & Concentrator™-100* da *Zymo Research*. Usamos o DNA Wash Buffer (24 ml) e a *Microcentrifuge Protocol*, seguindo as orientações do protocolo (RESEARCH, [s.d.]). Após as amostras estarem purificadas, quantificamos-as no Espectrofotômetro NanoDrop 2000 da Thermo Fisher Scientific.

5.5. Gel de agarose

Para a verificação de integridade do DNA, as amostras diluídas foram submetidas á eletroforese em gel de agarose a 1% para 50 ng de amostra, contendo brometo de etídio. E observadas em um transiluminador com luz ultravioleta (Kodak digital Science 120™).

5.6. Quantificação das amostras

As amostras purificadas foram quantificadas por meio do equipamento de fluorímetro *Qubit® 2.0* (*Life Technologies*), para a realização do procedimento preparamos um mix de solução contendo 199 µl de *Buffer* e 1 µl de fluoróforo para cada amostra. Em cada tubo *Qubit®*, foram pipetado 190 µl da solução mix, 2 µl da amostra e 10 µl de cada *standart*, após 2 minutos de incubação realizamos a leitura em *ng/µl*.

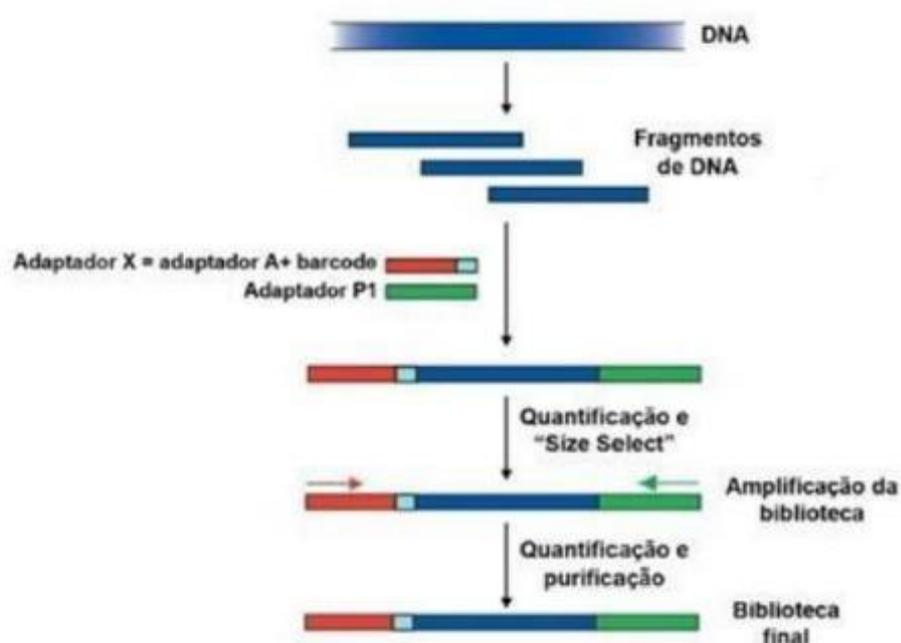
5.7. Construção da biblioteca

Para o preparo das amostras realizamos inicialmente a digestão enzimática do DNA, com a finalidade de obter fragmentos com tamanhos iguais. Em seguida, houve a ligação dos adaptadores em cada extremidade dos fragmentos de DNA contendo regiões de ligação para os *primers*, um adaptador P1 que complementa a cadeia de DNA foi utilizado para ligar-se nas *Ion Sphere Particles (ISPs)*. Os códigos de barras específicos para a identificação de cada amostra (*Barcodes*) ligaram-se

aos adaptadores, capazes de permitir o sequenciamento de amostras no mesmo chip (Figura 10).

Para a construção da biblioteca foi seguido o protocolo do *Ion Ampliseq DNA and RNA Library Preparation 2.0*. E o programa *Microsoft Office Excel* foi utilizado para a realização dos cálculos das concentrações das amostras.

Figura 10. Etapas de construção da biblioteca.



Fonte: Figura adaptada de (Ion Torrent™ Sequencing Workflow; Thermo Fisher, 2016).

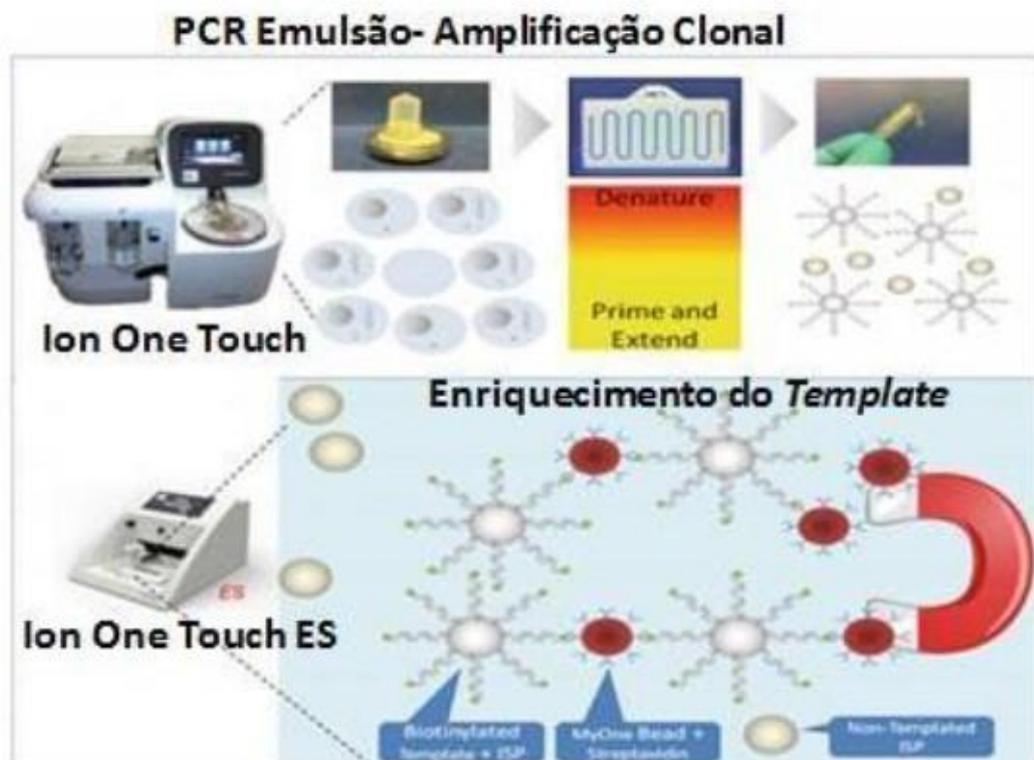
O painel de genes utilizado foi o CMG-PGM 1- 64 genes – IAD65549_210 (99.96% Cobertura) – 1.204 amplicons – 3 pools – 375 pb, de câncer de próstata, fornecido pelo Centro de Medicina Genômica (CMG) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

5.8. Preparo do Template

Os *templates* foram produzidos por meio de um sistema em emulsão a partir do *Ion OneTouch 200 Template Kit* e em seguida as amostras foram processadas no equipamento *Ion OneTouch™ 2 System* (Life Technologies), segundo o *Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit*. Esse procedimento é importante para promover a ligação de um único fragmento de 200 bp em uma única *ISPs*.

A reação da *Polymerase Chain Reaction (PCR)* em emulsão foi realizada para amplificar cada fragmento, e uma reação de enriquecimento para excluir as *ISPs* que não se ligaram a nenhum fragmento de DNA. Ao fim deste processo foram obtidas *ISPs* ligadas a inúmeros fragmentos idênticos, preparadas para o sequenciamento (Figura 11).

Figura 11. Diagrama esquemático do processo de amplificação clonal através das etapas do PCR emulsão e enriquecimento das amostras para obtenção das *ISPs* positivas.

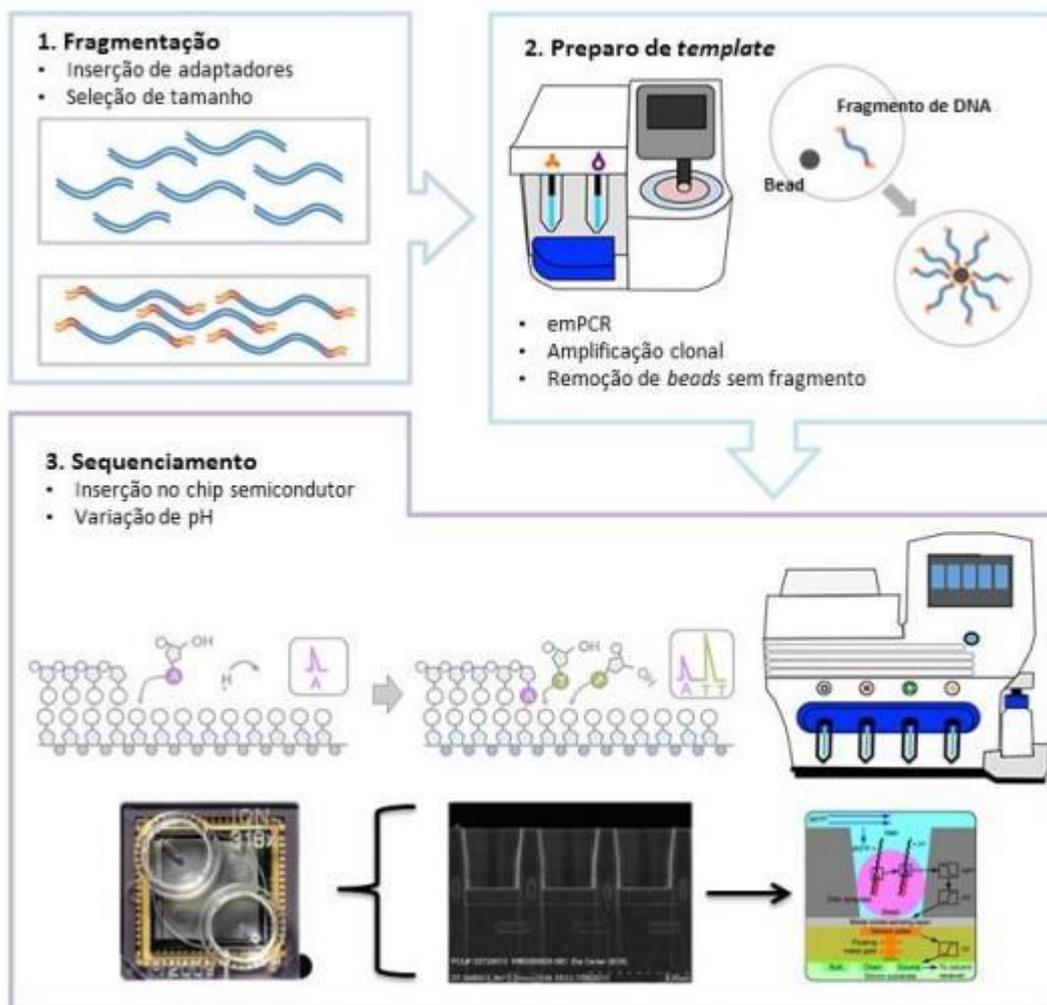


Fonte: Figura adaptada de (KOHN et al., 2013).

5.9. Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

O sequenciamento ocorre por meio da ligação específica de um *primer* ao seu respectivo adaptador, assim cada fragmento enriquecido com *ISPs* poderá ser sequenciado, para a realização deste processo utilizamos o kit *Ion PGM HiQ Sequencing Kit* (Life technologies). O sequenciamento ocorreu no interior de um chip semicondutor 318 V2, com capacidade para sequenciar até 600 Mb. Cada chip contém milhões de microporos formados por uma camada sensível a variações iônicas, cada microporo foi preenchido por uma *ISP*. O Ion PGM adiciona um tipo diferente base por vez, e se o nucleotídeo for incorporado haverá liberação de H⁺ e consequentemente alterações iônicas. Por meio dessas variações, o chip capta qual nucleotídeo foi incorporado em cada microporo, consistindo no processo de sequenciamento de cada fragmento (Figura 12). Essas variações químicas são transformadas pelo *Ion PGM* em informação digital, ou seja, em sequências de DNA para posteriores análises.

Figura 12. Etapas do processo de sequenciamento na plataforma Ion Torrent PGM



Fonte: (OLIVEIRA, 2015).

5.10. Análise dos dados

Os resultados obtidos no sequenciamento genético foram transmitidos através do sistema *Torrent Suite do Ion Reporter Software* (Life Technology), em arquivo VCF. Os plug-ins de bioinformática *coverage analysis*, *variant caller* e *file exporter* disponíveis no sistema *Ion Reporter*, foram selecionados no momento da programação dos dados da corrida.

As sequências obtidas no sequenciamento foram filtradas a partir de critérios, como:

- Variantes localizadas nos genes selecionados do estudo (*BRCA1*, *BRCA2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *TP53*);
- Variantes não-sinônimas;
- Cobertura acima de 200x.

A cobertura corresponde ao número de leituras de uma região de interesse, para painéis direcionados é recomendado uma cobertura média superior a 100x para que seja obtida uma leitura mais fidedigna (JENNINGS et al., 2017; STROM, 2016). Em nosso estudo adotamos como critério uma cobertura mínima de 200x.

As variantes foram analisadas manualmente pelo banco de dados Varsome, disponível no site <https://varsome.com/>, baseada nos critérios da *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*, para a classificação quanto a patogenicidade das alterações encontradas (RICHARDS et al., 2015).

As sequência obtidas também foram analisadas pelo *Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)*, disponível no site <https://cadd.gs.washington.edu/score>. O CADD verificar a patogenicidade a partir da pontuação em escala *PHRED*, que classifica uma variante em relação a todas as possíveis substituições do genoma humano. Escolhemos adotar a pontuação 15 como critério de inclusão para as variantes em nosso estudo (MARTIN KIRCHER et al., 2014; RENTZSCH et al., 2019).

A visualização gráfica das variantes encontradas e anotadas (*oncoprint*) e dos dados clínicos dos pacientes foi feita por um *script R in-house* utilizando a

biblioteca *waterfall*. Foram consideradas somente as variantes com cobertura acima de 200 e CADD > 15 encontradas nos genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *TP53*.

As variantes selecionadas foram submetidas a um levantamento de bibliográfico utilizando como base de dados o Pubmed, disponível no site:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>> e o Clinvar

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>>.

As redes de integração foram visualizadas pela a *protein protein interaction* (*PPI*), utilizando o banco de dados *STRING*, disponibilizado no site: <<https://string-db.org>>.

As informações do histórico familiar foram coletadas do prontuário médico e complementadas pelos pacientes através de contato telefônico quando necessário.

Confidencialidade e Proteção da Privacidade

Os registros do estudo foram mantidos confidenciais conforme permitido por lei. Teve acesso aos dados apenas o pesquisador e o sigilo foi garantido.

Riscos:

1. No estudo foi utilizado sangue venoso dos participantes, a partir de uma punção venosa, com finalidade exclusiva para pesquisa. Os riscos inerentes a este projeto estão relacionados ao possível aparecimento de hematomas e desconfortos ocasionados pela agulha no momento da punção venosa;

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização da amostra

6.1.1. Idade ao diagnóstico e Etnia

A idade média ao diagnóstico foi de 54,5 anos, com mediana de 55,5 e variando de 45 a 60 anos. A classificação étnica dos pacientes autodeclarada foram: 18 caucasianos (54,55%), 5 negros (18,18%) e 7 mulatos (27,27%) (Tabela 1).

6.1.2. Índice de Massa Corporal (IMC) ao diagnóstico

Não foi possível obter o IMC de 3 pacientes da amostra. O IMC médio ao diagnóstico dos 27 pacientes analisados foi de 28,21 kg/m², com a mediana de 27,99, variando de 20,83 a 39,47 (Tabela 1).

6.1.3. Histórico familiar de câncer

Em relação ao histórico familiar para neoplasia, os antecedentes de 3 pacientes não foram encontrados (informações incompletas no prontuário médico, incapacidade de fornecer informação após contato telefônico).

Dos 27 pacientes analisados, 14 (51,85%) apresentaram histórico familiar para tumores malignos, sendo que 9 indivíduos (64,2%) relataram familiares com câncer de mama ou próstata. (Tabela 1).

6.1.4. PSA sérico ao diagnóstico

A média do PSA sérico ao diagnóstico dos pacientes foi de 9,82 ng/ml e a mediana de 5,83, variando de 1,71 a 43,6 (Tabela 1).

6.1.5. Tratamento

Todos os pacientes foram submetidos a prostatectomia radical (PR) como tratamento inicial, sendo um dos critérios de inclusão do estudo. No entanto, 2 pacientes (6,67%), após a análise do anatomopatológico, foram submetidos a tratamento adjuvante com radioterapia.

6.1.6. Estadiamento patológico após o tratamento cirúrgico (pT)

A necessidade de se classificar os casos de câncer em estádios baseia-se na constatação de que as taxas de sobrevida são diferentes quando a doença está restrita ao órgão de origem ou quando ela se estende a outros órgãos. O estadiamento avalia o grau de disseminação local e a distância do tumor. O sistema de estadiamento utilizado para o CaP é o TNM da *American Joint Committee on Cancer* baseado em cinco critérios, sendo o T correspondente a extensão do tumor primário, conforme classificado na Figura 13 (FAY et al., [s.d.]). Foi encontrada grande predominância de indivíduos com estadiamento tumoral confinado à próstata, estádios pT2a, pT2b e pT2c (Tabela 1).

Figura 13. Sistema de estadiamento TNM para o câncer de próstata critério de extensão do tumor primário (T).

ESTADIAMENTO		
T - Tumor primário		
Tx	Tumor primário não acessível	
T0	Sem evidência de tumor primário	
Ta	Carcinoma papilar não invasivo	
Tis	Carcinoma in situ: "flat tumour"	
T1	Tumor invade tecido conectivo sub-epitelial	
T2	Tumor invade camada muscular	T2a Tumor invade camada muscular superficial
		T2b Tumor invade camada muscular profunda
T3	Tumor invade tecido peri-vesical	T3a Microscopicamente
		T3b Macroscopicamente (massa extra-vesical)
T4	Tumor invade qualquer um dos órgãos: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal	T4a Tumor invade próstata, útero ou vagina
		T4b Tumor invade parede pélvica, parede abdominal

Fonte: (FAY et al., [s.d.])

6.1.7. Escore Gleason

O escore de *Gleason* dos pacientes analisados variou de 6 a 10. O escore 6 foi o mais frequente, presente em 14 pacientes (46,67%). A pontuação 8 (3 +5), 9 (5 + 4) e 10 (3 + 7), foram encontradas em um indivíduo cada (Tabela 1).

6.1.8. Invasão Perineural

A invasão perineural é denominada quando as células neoplásicas estão presentes no feixe vículo nervoso em íntimo contato com a cápsula prostática. Foi encontrada invasão perineural em 19 pacientes, correspondente a 63,33% dos indivíduos analisados (Tabela 1).

6.1.9. Recidiva Bioquímica

O aumento na dosagem do PSA sérico do paciente após o tratamento com cirurgia ou radioterapia é definido como recidiva bioquímica. A recidiva após o tratamento definitivo foi detectada em 8 pacientes (26,67%) da nossa amostra (Tabela 1).

Tabela 1. Dados clínicos e demográficos dos pacientes analisados.

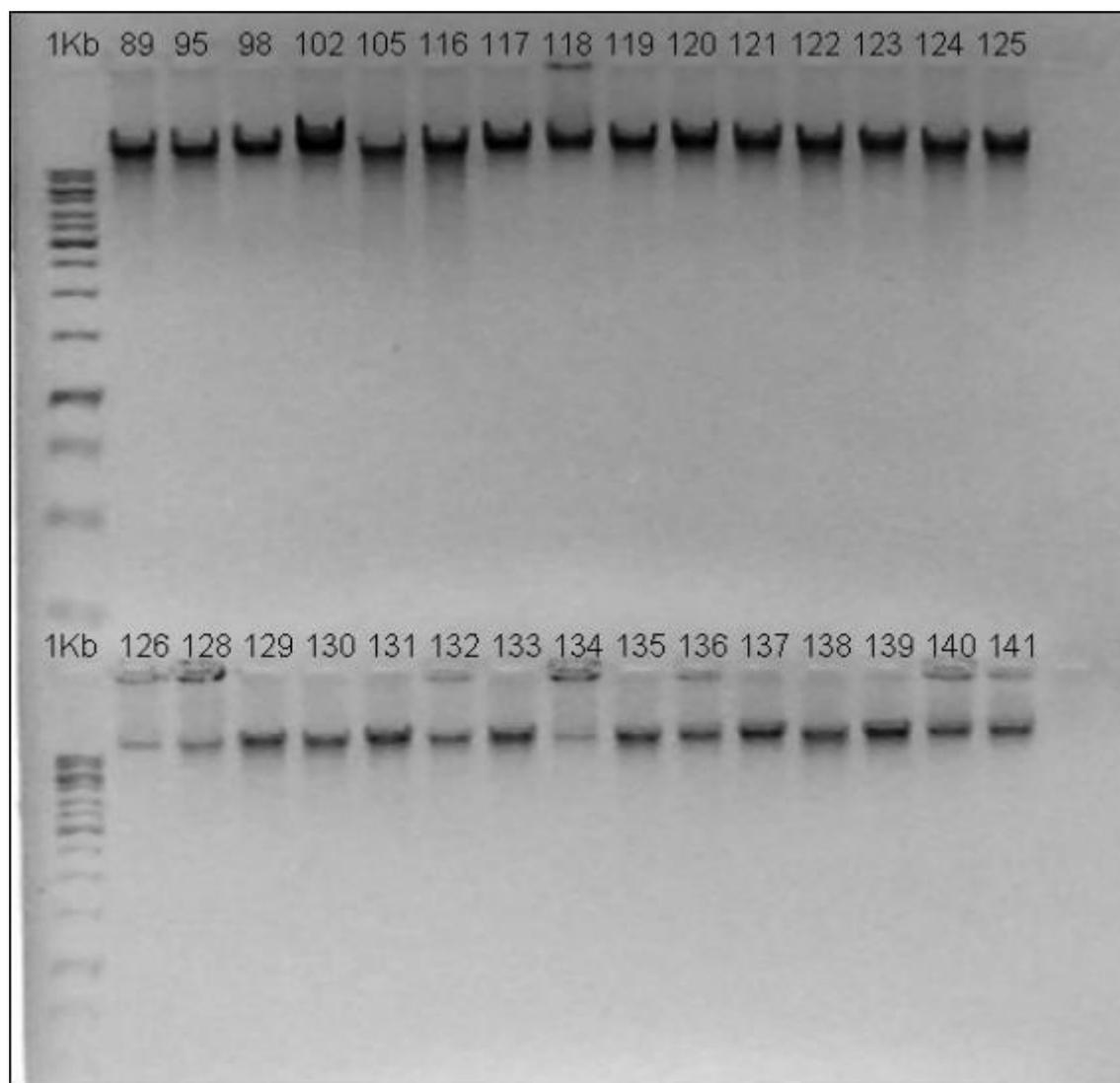
Características	n (%)
Idade ao diagnóstico (anos)	
Média	55,5 (45 – 60)
Etnia	
Branco	18 (54,55)
Mulato	5 (18,18)
Negro	7 (27,27)
IMC (kg/m ²)	
Média	28,21 (20,83 – 39,47)
Histórico familiar de câncer (N)	14 (51,85)
Câncer de Próstata	6 (67)
Câncer de Mama	3 (33)
PSA (ng/ml)	
Média	9,82 (1,71– 43,6)
Estadiamento	
T2a	3 (10)
T2b	2 (7)
T2c	19 (63)
T3a	2 (7)
T3b	4 (13)
Escore Gleason	
6	14 (46,67)
7	13 (43,33)
≥ 8	3 (10)
Presença de invasão perineural	19 (63,33)
Recidiva Bioquímica	8 (26,67)

Fonte: Duarte, K. (2019).

6.2. Integridade do DNA

A Figura 14 exemplifica a integridade do DNA das amostras obtido para análise.

Figura 14. Gel de agarose a 1% do DNA extraído das amostras analisadas.

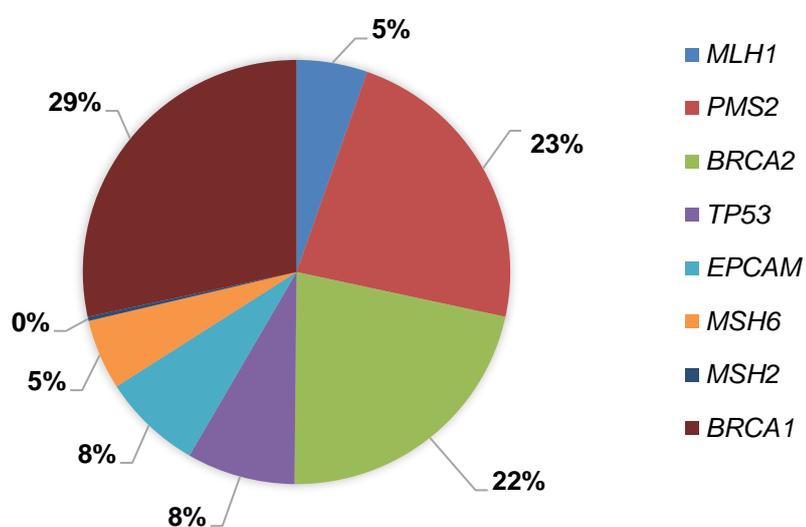


Fonte: Duarte, K. (2019).

6.3. Genes mutados

A análise bruta dos dados, sem a aplicação dos filtros, identificou 317 variantes não-sinônimas, nos 8 genes de reparo de DNA analisados, sendo o *BRCA1* o gene mais frequentemente acometido (Figura 15). Dentre todas as variantes encontradas após a aplicação de todos os filtros 3,89% do total apresentaram potencial patogênico.

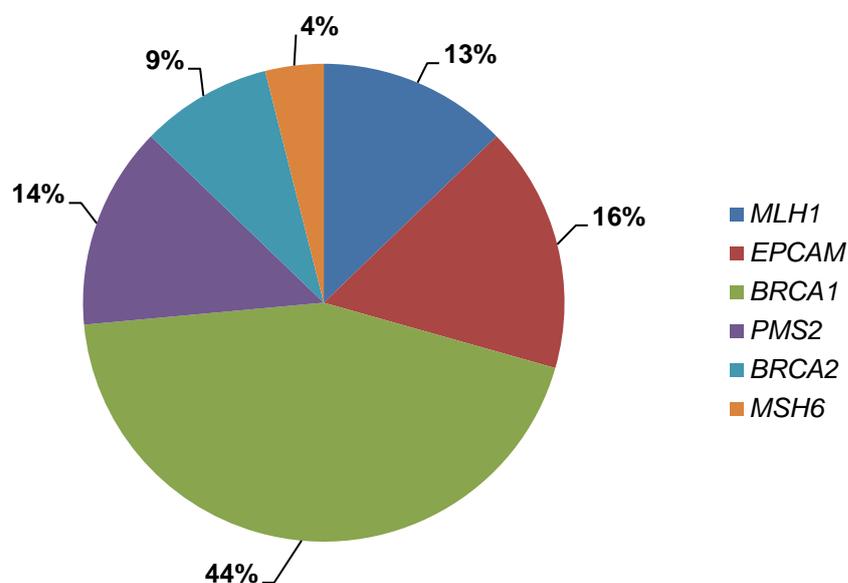
Figura 15. Porcentagem das variantes presente nos genes de reparo do DNA selecionados no estudo, sem aplicação dos filtros.



Fonte: Duarte, K. (2019).

O *BRCA1* foi o gene que apresentou mais alterações, correspondendo a 44% do total de variantes encontradas, e presente em 25 pacientes, seguido do *EPCAM* com 16 %, *PMS2* 14%, *MLH1* 13%, *BRCA2* 9% e *MSH6* 4% (Figura 16).

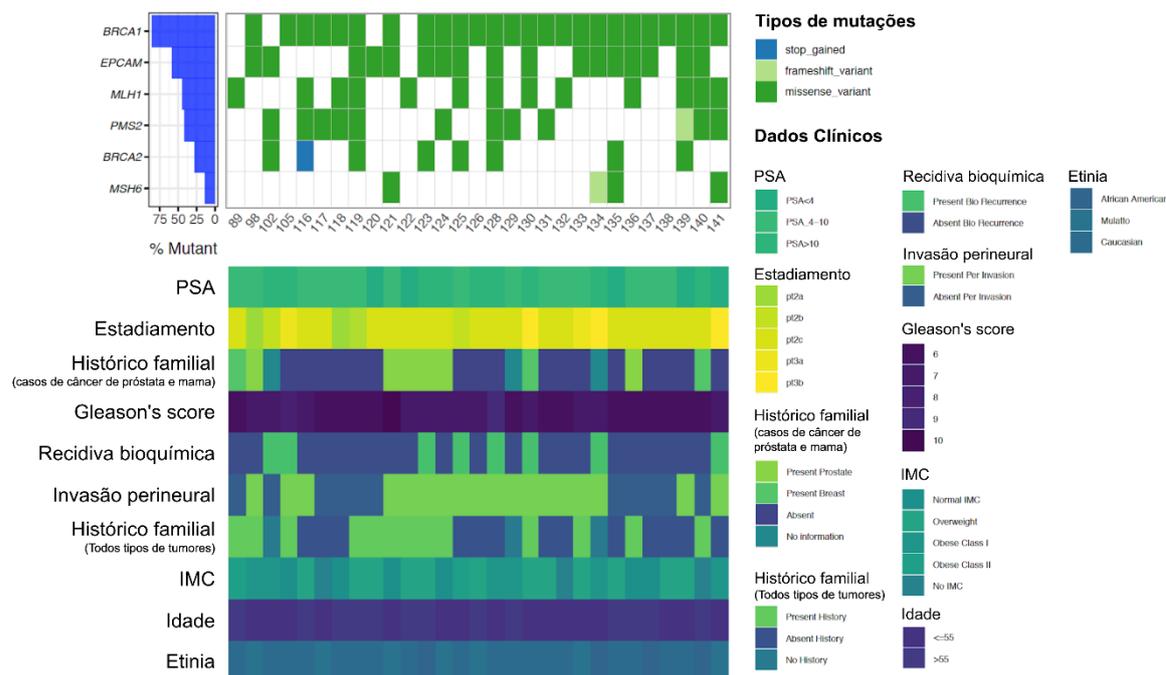
Figura 16. Porcentagem das variantes presente nos genes de reparo do DNA selecionados no estudo, com aplicação dos filtros.



Fonte: Duarte, K. (2019).

6.4. Variantes

Após os filtros aplicados nos dados obtidos no sequenciamento, 102 variantes foram selecionadas em toda a amostra estudada. Noventa e nove foram classificadas como *missenses*, uma *nonsense*, uma *frameshiftInsertion* e uma *frameshiftDeletion*. A média de variantes por paciente foi de 3,4. A visualização das variantes encontradas por gene e paciente, bem como os dados clínicos e demográficos é apresentada a partir do *oncoprint* (Figura 17).

Figura 17. *Oncoprint* com os dados obtidos no estudo.

Fonte: Duarte, K. (2019).

Oitenta e seis variantes foram classificadas como benignas, dez como provavelmente benignas, duas de significado incerto como (*VUS*) e uma como provavelmente patogênica. Quatro variantes não foram descritas anteriormente, portanto ainda não possuem classificação, dentre elas, uma que não atendeu aos filtros aplicados devido à baixa cobertura, no entanto não foi compatível aos bancos de dados, e posteriormente será validada. A tabela 2 apresenta o *gene*, *dbSNP*, *locus*, *coding*, *protein*, *Minor Allele Frequency (MAF)*, *CADD*, veredito do *Varsome* e *Function* de cada variante identificada em nosso estudo.

Um indivíduo foi excluído das análises após os filtros aplicados, pois não apresentou nenhuma variante dentro dos critérios.

Tabela 2. Variantes identificadas no estudo.

<i>Gene</i>	<i>Dbsnp</i>	<i>Locus</i>	<i>Coding</i>	<i>Protein</i>	<i>MAF</i>	<i>CADD</i>	<i>Varsome</i>	<i>Function</i>
BRCA1	rs799917	chr17:41244936	c.2612C>T	p. Pro871Leu	0.334	17.97	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
EPCAM	rs1126497	chr2:47601106	c.344T>C	p. Met115Thr	0.456	15.35	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA1	rs16941	chr17:41244435	c.3113A>G	p. Glu1038Gly	0.336	15.19	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
PMS2	rs1802683	chr7:6013049	c.2570G>C	p. Gly857Ala	0.44	15.43	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
MLH1	rs1799977	chr3:37053568	c.655A>G	p. Ile219Val	0.13	21.8	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA2	rs766173	chr13:32906480	c.865A>C	p. Asn289His	0.074	17.23	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA1	rs1799950	chr17:41246481	c.1067A>G	p. Gln356Arg	0.022	17.80	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA2	rs1799954	chr13:32914592	c.6100C>T	p. Arg2034Cys	0.001	20.4	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA1	rs4986850	chr17:41245471	c.2077G>A	p. Asp693Asn	0.034	15.84	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA1	rs1799967	chr17:41222975	c.5019G>A	p. Met1673Ile	0.011	22.0	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA2	rs11571833	chr13:32972626	c.9976A>T	p.Lys3326Ter	0.004	36	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>nonsense</i>

BRCA1	rs1800709	chr17:41245027	c.2521C>T	p.Arg841Trp	0.002	21.8	Provavelmente Benigna	missense
MSH6	rs34625968	chr2:48033700	c.3911G>A	p.Arg1304Lys p.?	0.003	23.4	Provavelmente Benigna	missense
BRCA2	rs4987047	chr13:32953529	c.8830A>T	p.Ile2944Phe	0.009	24.2	Provavelmente Benigna	missense
BRCA1	rs56158747	chr17:41223249	c.4745C>T	p.Thr1582Ile	0.002	21.9	Provavelmente Benigna	missense
MLH1	rs63750447	chr3:37067240	c.1151T>A	p.Val384Asp	0.005	29.2	Provavelmente Benigna	missense
BRCA2	rs11571769	chr13:32953550	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	0.01	26.2	Provavelmente Benigna	missense
MSH6	rs730881801	chr2:48028226	c.3104G>T	p.Arg1035Leu	_	27.0	Significado Incerto	missense
MLH1	rs35502531	chr3:37089130	c.1852_1853delA AinsGC	p.Lys618Ala	0.003 _	27.2	Provavelmente Patogênica	missense
PMS2	rs141893001	chr7:6018320	c.2182A>G	p.Thr728Ala	_	17.43	Benigna	missense
MSH6	rs1800938	chr2:48025782	c.660A>C	p.Glu220Asp	_	18.88	Provavelmente Benigna	missense
BRCA2	rs1310128359	chr13:32950918	c.8744C>T	p.Ala2915Val	_	15.95	Significado Incerto	missense

Legenda: () MAF não encontrado.

Fonte: Duarte, K. (2019).

Duas variantes estiveram presentes em pelo menos 50% (15/30) dos pacientes analisados: a c.2612C>T no gene *BRCA1*, encontrada em 24 pacientes, caracterizada por uma mudança do aminoácido Prolina (Pro) 871 para Leucina (Leu) 871; e o c.344T>C no gene *EPCAM*, presente em 17 pacientes, que resultou na mudança do aminoácido Metionina (Met) 115 para Treonina (Thr) 115. De todas as mutações encontradas, dezoito já haviam sido relacionadas a outros tipos de neoplasia na literatura pesquisada (Tabela 3).

Tabela 3. Variantes encontradas e já relacionadas a neoplasias na literatura pesquisada.

Gene	dbSNP	Locus	Coding	Protein	MAF	CAD D	Varsome	Function	Cancer
BRCA1	rs799917	chr17:41244936	c.2612C>T	p. Pro871Leu	0.334	17.97	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>	Mama*; Ovário Gástrico; Esofágico*; Leucemia; Glioblastoma*; Linfoma*; Pulmão*
EPCAM	rs1126497	chr2:47601106	c.344T>C	p. Met115Thr	0.456	15.35	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>	Mama*; Colo de útero*; Pulmão*; Carcinoma hepatocelular*; Vesícula biliar
BRCA1	rs16941	chr17:41244435	c.3113A>G	p. Glu1038Gly	0.336	15.19	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>	Mama; Ovário Linfoma Gástrico Câncer geral;
MLH1	rs1799977	chr3:37053568	c.655A>G	p. Ile219Val	0.13	21.8	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>	CAP* Mama* Ovário Leucemia linfoblástica aguda* Colorretal Tireoide Pulmão* Endometrial
BRCA2	rs766173	chr13:32906480	c.865A>C	p. Asn289His	0.074	17.23	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>	Mama* Pâncreas

BRCA1	rs1799950	chr17:41246481	c.1067A>G	p. Gln356Arg	0.022	17.80	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>	CAP* Mama* Ovário*
BRCA2	rs1799954	chr13:32914592	c.6100C>T	p. Arg2034Cys	0.001	20.4	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>missense</i>	Mama Leucemia linfocítica crônica*
BRCA1	rs4986850	chr17:41245471	c.2077G>A	p. Asp693Asn	0.034	15.84	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>	Mama* Ovário
BRCA1	rs1799967	chr17:41222975	c.5019G>A	p. Met1673Ile	0.011	22.0	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>	Mama*
BRCA2	rs11571833	chr13:32972626	c.9976A>T	p.Lys3326Ter	0.004	36	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>nonsense</i>	CAP Mama* Ovário* Pulmão* Trato urinário Adenoma ductal esporádico* Trato aerodigestivo Melanoma Pâncreas*
BRCA1	rs1800709	chr17:41245027	c.2521C>T	p.Arg841Trp	0.002	21.8	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>missense</i>	Mama Ovário
BRCA2	rs4987047	chr13:32953529	c.8830A>T	p. Ile2944Phe	0.009	24.2	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>missense</i>	CAP Mama Ovário
MLH1	rs63750447	chr3:37067240	c.1151T>A	p.Val384Asp	0.005	29.2	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>missense</i>	Mama Colorretal* Síndrome de Lynch Gástrico Pâncreas Câncer Geral
BRCA2	rs11571769	chr13:32953550	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	0.01	26.2	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>missense</i>	CAP Mama

MLH1	rs35502531	chr3:37089130	c.1852_1853delAAinsGC	p.Lys618Ala	0.003	27.2	Provavelmente Patogênica	missense	Colorretal Síndrome de Lynch Rim Gástrico
MSH6	rs1800938	chr2:48025782	c.660A>C	p.Glu220Asp	_	18.88	Provavelmente Benigna	missense	Colorretal
PMS2	rs1802683	chr7:6013049	c.2570G>C	p. Gly857Ala	0.44	15.43	Benigna	missense	Câncer Geral Síndrome de Lynch
MSH6	rs34625968	chr2:48033700	c.3911G>A	p.Arg1304Lys	0.003	23.4	Provavelmente Benigna	missense	Ovário

Legenda: () MAF não encontrado;(*) Neoplasia associada estatisticamente a variante.

Fonte: Duarte, K. (2019).

Das variantes encontradas no nosso estudo 5 já foram relacionadas ao CaP. A tabela 4 relaciona as variantes encontradas na nossa amostra e já descritas em pacientes portadores de CaP.

Tabela 4. Variantes relacionadas com o câncer de próstata.

Gene	dbSNP	Locus	Coding	Protein	MAF	CADD	Varsome	Function
MLH1	rs1799977	chr3:37053568	c.655A>G	p. Ile219Val	0.13	21.8	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA1	rs1799950	chr17:41246481	c.1067A>G	p. Gln356Arg	0.022	17.80	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA2	rs11571833	chr13:32972626	c.9976A>T	p.Lys3326Ter	0.004	36	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>nonsense</i>
BRCA2	rs4987047	chr13:32953529	c.8830A>T	p. Ile2944Phe	0.009	24.2	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA2	rs11571769	chr13:32953550	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	0.01	26.2	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>missense</i>

Fonte: Duarte, K. (2019).

Segundo os bancos de dados utilizados para a realização do levantamento bibliográfico das variantes, quatro nunca foram relacionadas a algum tipo de neoplasia (Tabela 5).

A mutação *missense* Thr1582Ile, localizada no gene *BRCA1*, foi identificada no banco de dados *Clinvar* a partir do seu dbsnp, no entanto o código (c.1370C>T) e a proteína (Thr457Ile) encontrados não foram correspondentes aos achados em nosso estudo.

A mutação Thr728Ala não foi relacionada ao câncer na plataforma Clinvar. Dois laboratórios a classificaram como benignas, dois como provavelmente benigna e um como *VUS*. Igualmente, a variante que substitui o aminoácido Alanina (Ala) 2915 em Valina (Val), localizada no gene *BRCA2* está classificada como *VUS* na plataforma Clinvar e nunca foi relacionada a alguma neoplasia (Tabela 5).

Tabela 5. Variantes não relacionada a neoplasias na literatura.

Gene	dbSNP	Locus	Coding	Protein	MAF	CADD	Varsome	Function
BRCA1	rs56158747	chr17:41223249	c.4745C>T	p.Thr1582Ile	0.002	21.9	<i>Provavelmente Benigna</i>	<i>missense</i>
MSH6	rs730881801	chr2:48028226	c.3104G>T	p.Arg1035Leu	_	27.0	<i>Significado Incerto</i>	<i>missense</i>
PMS2	rs141893001	chr7:6018320	c.2182A>G	p.Thr728Ala	_	17.43	<i>Benigna</i>	<i>missense</i>
BRCA2	rs1310128359	chr13:32950918	c.8744C>T	p.Ala2915Val	_	15.95	<i>Significado Incerto</i>	<i>missense</i>

Legenda: (_) MAF não encontrado.

Fonte: Duarte, K. (2019).

Quatro mutações nunca descritas foram identificadas em nosso estudo, as mesmas serão validadas pelo método de sequenciamento de *Sanger* para que possam ser anexadas aos bancos de dados públicos (Tabela 6).

Tabela 6. Variantes não descritas

Gene	<i>dbSNP</i>	Locus	Coding	Protein	Function
EPCAM	rs111849096:rs1126497:rs115212523	chr2:47601106	c.344_345delTGinsCA	p.Met115Thr	missense
MSH6	rs751838296	chr2:48010487	c.115_116insA	p.Gly39fs	frameshiftInsertion
MSH2	*	chr2:47641555	c.941_942insA	p.Gln314fs	frameshiftInsertion
PMS2	rs373630535:rs587779335:rs63751666	chr7:6018314	c.2186_2187delTC	p.Leu729fs	frameshiftDeletion

Legenda: (*) Não encontrado.

Fonte: Duarte, K. (2019).

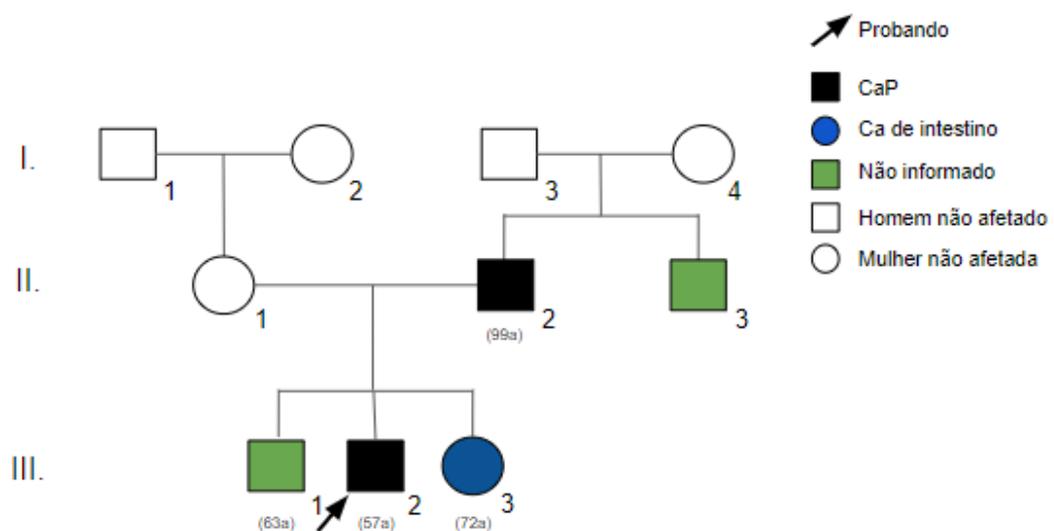
6.5. Genealogia

Selecionamos 5 casos dentro do nosso estudo para representar a genealogia. Três probandos foram escolhidos devido ao número de indivíduos acometidos por neoplasia no histórico familiar. Os outros dois casos estudados apresentavam também histórico familiar para neoplasia, sendo que um paciente apresentou uma mutação não descritas previamente e o outro uma mutação classificada como provavelmente patogênica.

- **Probando I**

O probando recebeu o diagnóstico de CaP aos 57 anos, seu IMC era 30,23 kg/m² (obesidade grau II). O estadiamento patológico revelou tratar-se de neoplasia localmente avançada (pT3b). O escore de *Gleason* foi 7 (3 + 4). Esse probando foi excluído pois não apresentou nenhuma variante dentro dos critérios, no entanto apresentou casos de neoplasia na família (Figura 18).

Figura 18. Heredograma do probando I.

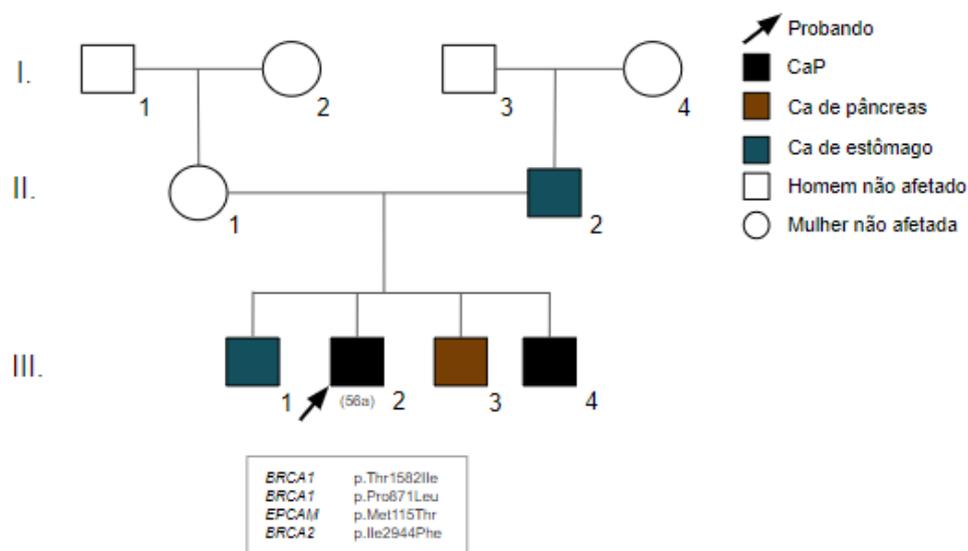


Fonte: Duarte, K. (2019).

- Probando II

O probando foi diagnosticado aos 56 anos, apresentava IMC de 27,99 kg/m², considerado como sobrepeso (Figura 19). O estadiamento patológico revelou doença em ambos os lobos da próstata, entretanto confinado a mesma (pT2c). O escore de *Gleason* foi 7 (4 + 3). Esse paciente apresentou recidiva bioquímica (Figura 18). Neste probando também foram detectadas duas variantes classificadas como benignas e duas provavelmente benignas, localizadas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *EPCAM*. Das variantes encontradas duas foram as mais frequentes descritas no nosso estudo, sendo uma nunca associada a qualquer neoplasia (Thr1582Ile) e outra já relacionada ao CaP (Ile2944Phe) (KOTE-JARAI et al., 2011).

Figura 19. Heredograma do probando II.



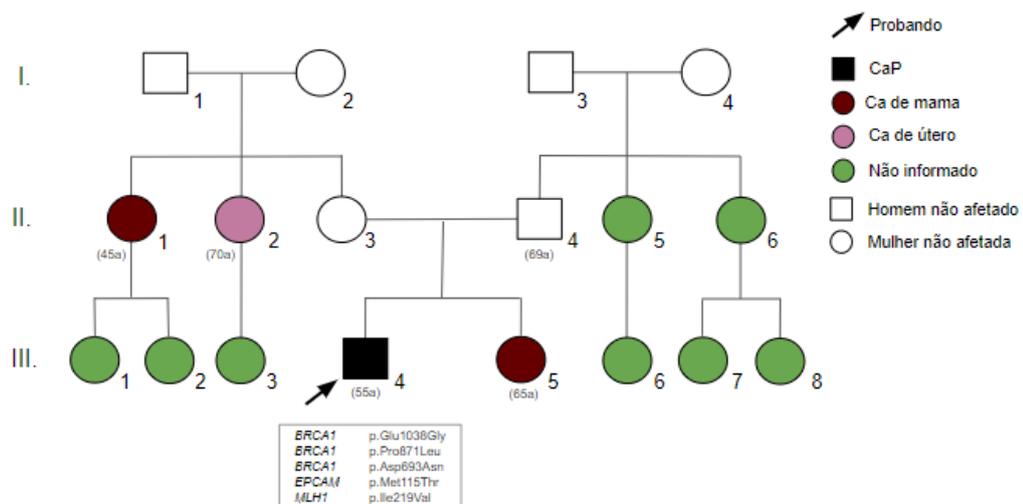
Fonte: Duarte, K. (2019).

- Probando III

Nessa família, o probando foi diagnosticado aos 55 anos, realizou radioterapia adjuvante após o tratamento o tratamento cirúrgico (Figura 20). O IMC era 25,86 kg/m² ao diagnóstico (sobrepeso), o escore *Gleason* totalizou 7 (3 + 4). O

estadiamento patológico revelou doença localmente avançada (pT3b). O paciente estava com suspeita de metástase na coluna no momento das análises. O probando apresentou cinco variantes benignas nos genes *BRCA1*, *MLH1* e *EPCAM*. Sendo duas mutações frequentes em mais de 50% dos pacientes do estudo. Cabe salientar que a variante I219V é uma das mais frequentes na literatura relacionada ao CaP e a outras neoplasias (BURMESTER et al., 2004; FREDRIKSSON et al., 2006; LI et al., 2017; MATHONNET et al., 2003; SAPKOTA et al., 2013). Neste probando duas variantes (Glu1038Gly e Asp693Asn) relacionadas ao câncer de mama também foram identificadas (KONECNY; MILLY; ZAVODNA, 2011; RICKS-SANTI et al., 2013; SAGNA et al., 2019).

Figura 20. Heredograma do probando III.



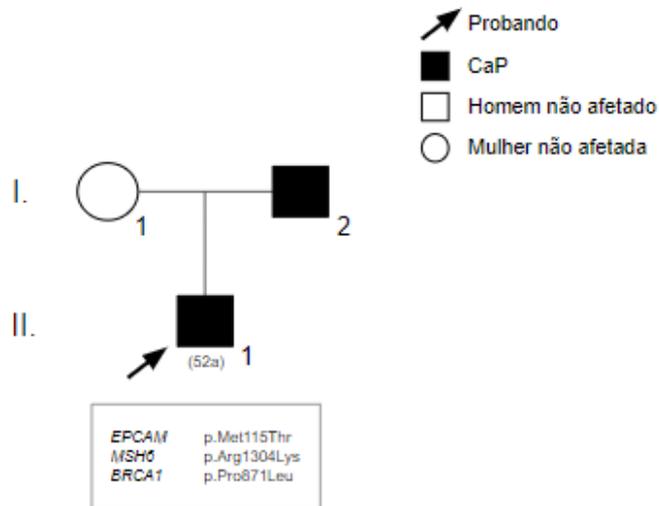
Fonte: Duarte, K. (2019).

- Probando IV

O probando diagnosticado aos 52 anos (Figura 21). O estadiamento patológico revelou a presença de neoplasia localizada acometendo ambos os lobos da próstata (pT2c). O IMC ao diagnóstico foi de 23, 46 kg/m², e o escore de *Gleason* totalizou 7 (3 + 4). O probando IV apresentou uma variante classificada como benigna no gene *BRCA1*, outra provavelmente benigna no *MSH6* já descritas em pacientes com tumor de ovário (HUO et al., 2009; PAL et al., 2012; SHI et al., 2017;

SIRISENA et al., 2018; XU et al., 2018). Outra mutação ainda não descrita no gene *EPCAM* também foi detectada.

Figura 21. Heredograma do probando IV.

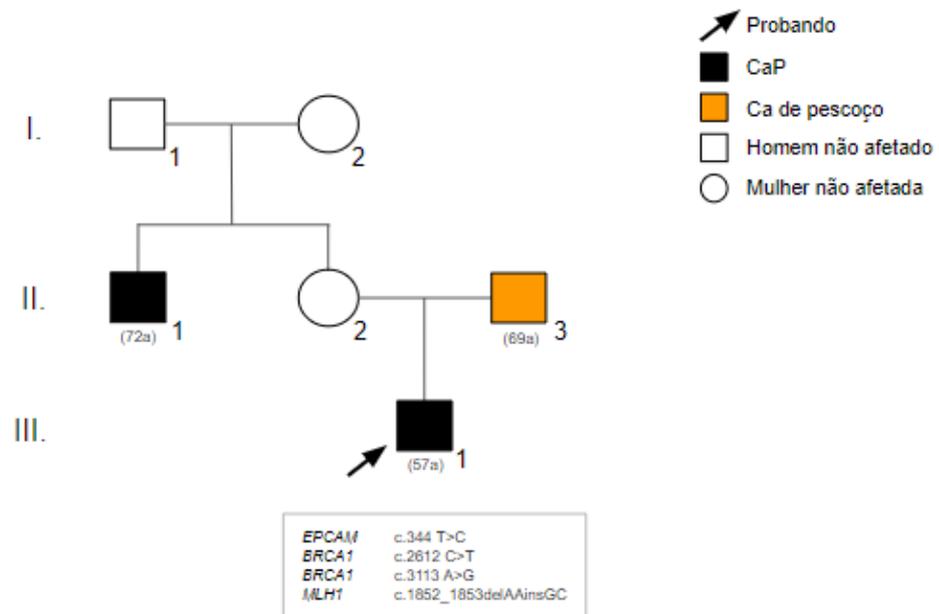


Fonte: Duarte, K. (2019).

- Probando V

O probando V recebeu o diagnóstico de CaP aos 57 anos (Figura 22). O estadiamento patológico revelou doença acometendo ambos os lobos prostáticos, porém confinada a glândula (pT2c). O escore *Gleason* totalizou 6 (3 + 3), sendo IMC 20, 83 kg/m² ao diagnóstico. O probando apresentou três variantes *benignas* nos genes *EPCAM* e *BRCA1* e uma provavelmente patogênica no gene *MLH1*. As mutações benignas Met115Thr, Pro871Leu e Glu1038Gly foram detectadas respectivamente em 17, 24 e 14 indivíduos da nossa amostra. Já mutação descrita como provavelmente patogênica Lys618Ala foi associada a *SL* e ao câncer de colorretal (ANDERSEN et al., 2012; THOMPSON et al., 2013).

Figura 22. Heredograma do probando IV.



Fonte: Duarte, K. (2019).

7. DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

7.1. BRCA1 como o gene mais mutado

O *BRCA1* foi o gene mais mutado em nosso estudo, responsável por 44% do total das alterações encontradas. Grande parte dos estudos de análise de variantes germinativas em CaP, apresentam o *BRCA2* como o gene que apresenta o maior número de mutações, e associado ao elevado risco de desenvolvimento da doença (LECARPENTIER et al., 2017; LEONGAMORNLEERT et al., 2012; NYBERG et al., 2019; OH et al., 2019). No entanto essa controvérsia em relação aos nossos resultados pode estar associada a população estudada. Além do número reduzido da nossa amostra, nossa população é extremamente miscigenada levantando a hipótese de um perfil genético diferente do já descrito em outros estudos.

A variante *missense* Pro871Leu localizada no *BRCA1* foi identificada em 24 de 29 pacientes. Esse polimorfismo também foi detectado em pacientes portadores de inúmeras neoplasias, principalmente no câncer de mama (HUO et al., 2009; SIRISENA et al., 2018; SMOLARZ et al., 2017). O estudo de SHI et al. (2017) verificou a associação da progressão do câncer de mama triplo-negativo com a variante genética funcional Pro871Leu, e concluiu que esta variante está associada ao risco aumentado do avanço da doença (SHI et al., 2017). Autores também sugeriram que esse polimorfismo, localizado no C-terminal (BRCT) do gene *BRCA1*, pode interferir na interação do *BRCA1* com Acetil Coenzima A Carboxilase (ACCA). O *BRCA1* interage com a forma fosforilada da ACCA, a (P-ACCA), e a formação desse complexo afeta a atividade do ACCA, que conseqüentemente afeta a lipogênese celular (MOREAU et al., 2006). Os ácidos graxos são necessários para a biogênese da membrana celular, especialmente em células tumorais, devido ao seu alto nível de divisão. O CaP está relacionado a desregulação do metabolismo dos ácidos graxos, e a alta taxa de síntese de ácidos graxos foi observada em amostras de tecido tumoral obtidos após a prostatectomia radical (EPSTEIN; CARMICHAEL; PARTIN, 1995; LIU, 2006; WU et al., 2014). Sugerindo que a presença desse polimorfismo em 82,7% da nossa amostra pode ter contribuído no processo de desenvolvimento tumoral.

A variante Gln356Arg no gene *BRCA1* foi identificada em nosso estudo. Essa variante é comumente descrita em pacientes com câncer de mama (RICKS-SANTI et al., 2011; ROMANOWICZ et al., 2016). Bem como, associada ao risco de CaP em homens portadores da doença localizada (SANCHEZ et al., 2016). Douglas e colaboradores também associaram essa variante a neoplasia prostática, e estimaram que homens portadores desse polimorfismo apresentavam duas vezes mais chances de desenvolver essa doença (DOUGLAS et al., 2007).

Presente em 48,3% dos pacientes em nosso estudo a variante Glu1038Gly no *BRCA1* foi descrita na literatura em pacientes com câncer de mama em diversas populações, alemã, italiana, norte americana, sueca, grega, espanhola, chinesa e brasileira, sendo mais prevalente na população espanhola, sugerindo que a presença desse polimorfismo pode representar um efeito fundador de origem espanhola (BORG et al., 2010; GHAFOURI-FARD; DIANATPOUR; FARAMARZI, 2018; JARA et al., 2004; KONSTANTOPOULOU et al., 2000). Estudos mostram que a heterogeneidade genética das populações é derivada da ancestralidade, principalmente em populações miscigenadas que possuem ascendência oriunda de vários continentes (HUNTER et al., 2018; MCHUGH; BROWN; THORNTON, 2016). O Brasil detém de uma população altamente miscigenada, essa variabilidade genética pode impactar a biologia tumoral, no entanto o tamanho de nossa amostra foi fator limitante para conclusões.

7.2. EPCAM

O *EPCAM* foi o segundo gene mais mutado em nosso estudo, confirmando dados da literatura. As variantes detectadas no *EPCAM* foram responsáveis por 16% de todas as alterações identificadas, a variante Met115Thr localizada nesse gene, foi encontrada em 17 de 29 pacientes. Outros autores mostram que o *EPCAM* desempenha um importante papel nos processos de proliferação, adesão, sinalização e migração de células cancerígenas (TRZPIS et al., 2007). A superexpressão do *EPCAM* induz o oncogene *c-myc* e genes reguladores do ciclo celular como as ciclinas A e E, sugerindo que o *EPCAM* regula positivamente o *c-myc* em células epiteliais, resultando no aumento da proliferação e metabolismo celular em neoplasias (LINNENBACH et al., 1993; MÜNZ et al., 2004). O aumento

de sua expressão é comumente encontrado em carcinomas em geral, principalmente em pacientes portadores de CaP, estando associado a metástases ósseas e a pior sobrevida (HU et al., 2019; NI et al., 2012; XU; ZHAO; HOU, 2014).

7.3. PMS2

Identificamos mutações *missenses* e *frameshift deletion* localizadas no gene *PMS2*. Nossos achados reforçam a literatura disponível. A proteína codificada pelo gene *PMS2* une-se a proteína *MLH1*, formando um complexo proteico conhecido como *MutL α* , responsável pelo recrutamento das proteínas necessárias para o reparo do DNA. A ausência do heterodímero funcional *MLH1/PMS2* foi observada em 2,6% das amostras de tecido de pacientes com CaP localizado e em 6% de portadores de CPRC. Os autores concluíram que a ausência dessas proteínas é um achado frequente nos pacientes de CaP (NGHIEM et al., 2016).

7.4. MLH1

Nosso estudo apresentou 13 variantes *missenses* no *MLH1*. O reparo do material genético é iniciado com a ligação dos heterodímeros *MutS α* (*MSH2* e *MSH6*) ou *MutS β* (*MSH2* e *MSH3*) a uma incompatibilidade, posteriormente o complexo *MutL α* (*MLH1* e *PMS2*) é recrutado para formação de um heteroduplex. Mutações germinativas no gene *MLH1* já foram descritas em pacientes com CaP na literatura (PILIÉ et al., 2017). O polimorfismo Ile219Va foi encontrado em 11 pacientes do nosso estudo, essa variante já foi associada a neoplasia prostática e ao risco da doença mais agressiva em homens caucasianos portadores de CaP (BURMESTER et al., 2004; LANGEBERG et al., 2010). A mutação Lys618Ala também identificada por nós no gene *MLH1* foi classificada como provavelmente patogênica, apresentou 49.28 como pontuação *PHRED*, e é caracterizada por uma deleção dos nucleotídeos AA e inserção de GC. O probando V foi diagnosticado com CaP aos 57 anos, e apresentou essa mutação no gene *MLH1*, seu pai era portador câncer de pescoço e o tio materno manifestou a neoplasia prostática aos

72 anos de idade. A nossa hipótese é que essa mutação germinativa afetou o mecanismo de reparo do DNA desse paciente, bem como pode estar presente em outros indivíduos da família. Para a confirmação dessa hipótese iremos convidar os parentes deste indivíduo que foram acometidos por neoplasia para a análise de mutações germinativas em genes de reparo do DNA. Realizaremos também a análise da amostra tumoral para verificar se a mutação está presente no tecido.

7.5. BRCA2

Em nosso estudo, 9% das variantes estavam localizadas no gene *BRCA2*, em contrapartida, no trabalho de Pritchard e colaboradores em pacientes portadores de CaP metastático, 44% das alterações encontradas foram no gene *BRCA2* (PRITCHARD, 2016). A divergência em relação aos nossos achados pode estar associada a inúmeros fatores, como o baixo número amostral de pacientes, e estágio tumoral, já que nossa amostra foi composta por pacientes portadores de doença localizada.

No estudo de PRITCHARD e colaboradores também foi identificado a mutação *nonsense* Lys3326Ter, igualmente presente em nossos resultados. Inicialmente essa variante foi considerada como patogênica, pois é uma alteração de perda de aminoácidos, no entanto laboratórios e pesquisadores a classificaram como benigna (JOHNSON et al., 2007; MICHAILIDOU et al., 2013; PALMIROTTA et al., 2018; THOMPSON et al., 2015). Essa mutação rara apresentou uma pontuação *PHRED* de 36. Uma possível explicação para este achado é o fato que muitas vezes mutações isoladas podem não serem capazes de desencadear um processo tumorigênico isoladamente, no entanto aliado a outras alterações e fatores exógenos comportamentais podem contribuir para o processo de carcinogênese.

Duas variantes identificadas em nosso estudo, a mutação Ile2944Phe e a Ala2951Thr, ambas localizadas no gene *BRCA2*, também apresentaram pontuação *PHRED* de 24.2 e 26.2, respectivamente, considerado um alto grau de patogenicidade pelo CADD. As duas variantes também foram detectadas por outros

autores em pacientes com CaP, reforçando nossos achados (EDWARDS et al., 2003; KOTE-JARAI et al., 2011).

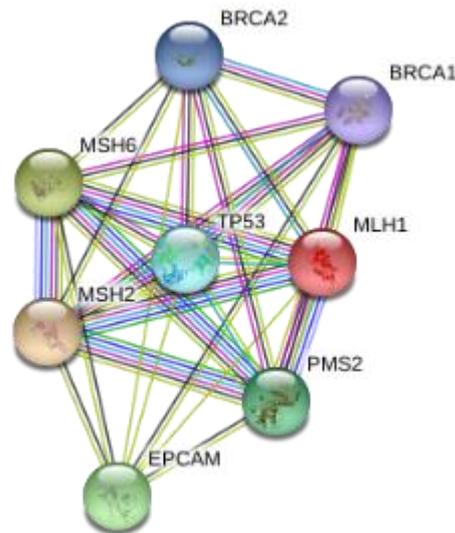
Nossa hipótese foi reforçada por um estudo recente que demonstrou a associação de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* com escores de Gleason mais elevados em pacientes portadores de CaP localizado (MARSHALL et al., 2019).

7.6. *MSH6*

No nosso estudo, variantes do gene *MSH6* foram detectadas em apenas 4% das alterações encontradas. A variante mais frequente no nosso estudo do gene *MSH6* foi a Glu220Asp, classificada como provavelmente benigna, e já descrita em estudos com pacientes portadores de câncer de colorretal, porém também presente no grupo controle, sugerindo um polimorfismo (KIM et al., 2004; OKKELS et al., 2012). Antonarakis e colaboradores avaliaram pacientes portadores de CAP metastático, os autores revelaram que 46% das alterações nos genes de reparo e incompatibilidade estavam presentes no gene *MSH6* (ANTONARAKIS et al., 2019). Uma possível explicação para nossos achados se baseia no fato da população estudada, nossa amostra foi constituída por pacientes portadores de CaP localizado ou localmente avançado, diferente do estudo de Antonarakis e colaboradores, não foram incluídos pacientes metastáticos, nos quais as mutações dos genes de reparo do DNA são mais frequentes.

Muitos estudos de sequenciamento mostram que pacientes com CaP apresentam variantes em inúmeros genes de reparo do DNA. Quando mais de um gene de reparo sofre alteração a capacidade de reparo do material genético é comprometida, conduzindo muitas vezes a um quadro de doença mais agressiva. Os oito genes de reparo que analisamos, interagem entre si (FIGURA 23), conforme observado pelo banco de dados STRING, sugerindo que para a realização dos processos de restauro de dano no DNA sua ligação é imprescindível. As interações destes genes reforçam a complexidade dos mecanismos de reparo essenciais para bom funcionamento ou apoptose celular.

Figura 23. *Protein Protein Interaction* dos genes de reparo do DNA selecionados para o estudo.



Fonte: Duarte, K. (2019).

7.7. Ausência de variantes no gene *TP53*

A importância do gene *TP53* para a manutenção da estabilidade genômica já foi amplamente descrita. Mutações nesse gene é frequentemente encontrada em tumores, quando essas ocorrem na linhagem germinativa são caracterizadas pela síndrome de li-fraumeni. Em nosso estudo após a aplicação dos filtros, o *TP53* não apresentou nenhuma mutação. Uma provável explicação para a ausência de alterações nesse gene, é devido alterações neste gene estarem mais relacionadas a variantes somáticas. Segundo a teoria dos “*two hits*”, baseada em um modelo de retinoblastoma, publicada em 1971 por Alfred Kundson, uma célula necessita perder ambas as cópias funcionais do gene para o desenvolvimento do câncer, desencadeada por mutações que inativam os alelos. Kundson (2001) observou que os “*two hits*” necessários para o desenvolvimento do retinoblastoma em indivíduos com a doença unilateral eram causados por variantes somáticas, e em pacientes com a doença bilateral que eram portadores de mutações germinativas no gene ***Rb***,

necessitavam de apenas mais “*one hit*” para a desfuncionalização do gene, provocada por variantes somáticas (ALFRED G.KNUDSON, 2001).

7.8. Variantes para validação

Quatro mutações encontradas em nosso estudo, não foram identificadas em nenhum banco de dados. Essas variantes serão validadas pelo método de sequenciamento de Sanger e, se confirmadas, anexadas nos bancos de dados públicos. Os genes que apresentaram variantes foram o *EPCAM*, *MSH6*, *MSH2* e *PMS2*. Um paciente foi portador de duas variantes não descritas, no gene *EPCAM* e *MLH1*, se a validação dessas variantes confirmar patogenicidade, sugere-se que o mecanismo de reparo pode estar profundamente danificado.

O probando IV foi portador de uma mutação não descrita no gene *EPCAM*, o pai desse indivíduo foi diagnosticado com CaP. Essa associação da mutação com o histórico familiar da neoplasia prostática sugere segregação. Caso confirmada sua patogenicidade, teremos uma nova variante relacionado ao CaP. Iremos convidar o pai deste indivíduo, para a realização do sequenciamento. Realizaremos também a análise da amostra tumoral para verificar se a mutação está presente no tecido.

O probando I, não apresentou mutações germinativas após as aplicações dos filtros nos genes analisados. Em contrapartida, seu pai com foi diagnosticado com CaP, seu irmão com câncer e a sua irmã com câncer de intestino. Provavelmente este paciente apresenta variantes germinativas em genes de reparo do DNA diferentes dos analisados em nosso estudo.

A alta prevalência de pacientes com histórico familiar de neoplasia em nosso estudo, corrobora a nossa hipótese de que esses oito genes de reparo do DNA estão envolvidos com o CaP hereditário.

8. CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Nosso estudo detectou a presença de variantes em 6 genes de reparo do DNA, dentre os oito estudados (*BRCA1*, *BRCA2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *TP53*), em uma amostra de 30 pacientes brasileiros com câncer de próstata localizado. O *BRCA1* foi o gene mais mutado, presente em 24 pacientes dos 29. Após a aplicação dos filtros pré-definidos não foram detectadas variantes nos genes *TP53* e *MSH2*.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das limitações do nosso estudo foi o pequeno número da amostra, portanto a realização de um trabalho com um maior número de pacientes, forneceria uma ampla visualização do perfil de mutações em pacientes com CaP localizado. Bem como, a idade dos pacientes, pacientes diagnosticados com CaP antes dos 50 anos, pois aumentaria a probabilidade de casos de câncer familiar.

Outro fator limitante foi o número de genes sequenciado no painel. A utilização de um painel com mais genes envolvido no reparo do DNA certamente poderia trazer mais informações.

O sequenciador que utilizamos (*Ion Torrent PGM*), adota fragmentos de 200 bp. Mutações nas regiões de ligação, podem não ser visualizadas.

10. PRÓXIMOS PASSOS

10. PRÓXIMOS PASSOS

Sequenciamento do tecido tumoral para a verificação da presença da mutação, sendo mais um dado para consolidar a relação da variante encontrada com a neoplasia na população brasileira;

As variantes não descritas e as não relacionadas ao CaP na literatura, serão validadas e anexadas aos bancos de dados públicos;

Realizaremos novo estudo com uma amostra maior de pacientes;

Realização de estudos funcionais das mutações encontradas;

Proposta de novo estudo com uma amostra maior de pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERO-GONZÁLEZ, R. et al. Immunohistochemical expression of mismatch repair proteins (MSH2, MSH6, MLH1, and PMS2) in prostate cancer: correlation with grade groups (WHO 2016) and ERG and PTEN status. **Virchows Archiv**, 2019.

ALFRED G.KNUDSON. Two Genetic Hits (More or less) to Cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. November, p. 637–641, 2001.

AME, J.; SPENLEHAUER, C.; MURCIA, G. DE. The PARP superfamily. **BioEssays**, v. 26, p. 882–893, 2004.

ANANTHA, R. W. et al. Functional and mutational landscapes of BRCA1 for homology-directed repair and therapy resistance. **elife research article**, p. 1–21, 2017.

ANDERSEN, S. D. et al. Functional characterization of MLH1 missense variants identified in lynch syndrome patients. **Human Mutation**, v. 33, n. 12, p. 1647–1655, 2012.

ANTONARAKIS, E. S. et al. Clinical Features and Therapeutic Outcomes in Men with Advanced Prostate Cancer and DNA Mismatch Repair Gene Mutations. **European Urology**, v. 75, n. 3, p. 378–382, 2019.

BACA, S. C. et al. Punctuated Evolution of Prostate Cancer Genomes. **Journal Cell**, v. 153, n. 3, p. 666–677, 2014.

BELTRAN, H. et al. DNA Mismatch Repair in Prostate Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 14, p. 1782–1784, 2015.

BENAFIF, S.; KOTE-JARAI, Z.; EELES, R. A. A review of prostate cancer Genome-Wide Association Studies (GWAS). **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 27, n. 8, p. 845–857, 2018.

BERGER, M. F. et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 214–220, 2011.

BERNSTEIN, C. et al. DNA repair / pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways : fail-safe protection against carcinogenesis. **Elsevier Science**, v. 511, p. 145–178, 2002.

BORG, Å. et al. Characterization of BRCA1 and BRCA2 Deleterious Mutations and Variants of Unknown Clinical Significance in Unilateral and Bilateral Breast Cancer: The WECARE Study. **Human Mutation**, v. 31, n. 3, p. 1–18, 2010.

BRAY, F. et al. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 394–424, 2018.

BURMESTER, J. K. et al. Analysis of candidate genes for prostate cancer. **Human Heredity**, v. 57, n. 4, p. 172–178, 2004.

CHEN, L. et al. Association of VDR gene TaqI polymorphism with the susceptibility to prostate cancer in Asian population evaluated by an updated systematic meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 11, p. 3267–3280, 2018.

- CHEN, Y. et al. Defects of DNA Mismatch Repair in Human Prostate Cancer. **Cancer research**, p. 4112–4121, 2001.
- CHUNG, J. H. et al. Prospective Comprehensive Genomic Profiling of Primary and Metastatic Prostate Tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 3, 2019.
- DAREMIPOURAN, M. R. et al. The Association of a Novel Identified VDR SNP With Prostate Cancer in African American Men. **Cancer genomics & proteomics**, v. 16, n. 4, p. 245–255, 2019.
- DOMINGUEZ-VALENTIN, M. et al. Frequent mismatch-repair defects link prostate cancer to Lynch syndrome. **BMC Urology**, p. 1–7, 2016.
- DOMINGUEZ-VALENTIN, M. et al. Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. **Genetics in Medicine**, v. 0, n. 0, 2019.
- DOUGLAS, J. A. et al. Common Variation in the BRCA1 Gene and Prostate Cancer Risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, v. 16, p. 1510–1516, 2007.
- EDWARDS, S. M. et al. Two Percent of Men with Early-Onset Prostate Cancer Harbor Germline Mutations in the BRCA2 Gene. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. Bclc 1999, p. 1–12, 2003.
- EDWARDS, S. M. et al. Prostate cancer in BRCA2 germline mutation carriers is associated with poorer prognosis. **British journal of cancer**, p. 918–924, 2010.
- EELES, R. A. et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. **Nature Genetics**, v. 40, n. 3, p. 316–321, 2008.
- EELES, R.; RAGHALLAIGH, H. N. Men with a susceptibility to prostate cancer and the role of genetic based screening. **Translational Andrology and Urology**, v. 7, n. 1, p. 61–69, 2018.
- EGEVAD, L. et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer – An ISUP consensus on contemporary grading. **Acta pathologica, microbiologia et immunologica scandinavica**, v. 124, p. 433–435, 2016.
- EPSTEIN, J. I.; CARMICHAEL, M.; PARTIN, A. W. OA-519 (fatty acid synthase) as an independent predictor of pathologic stage in adenocarcinoma of the prostate. **Adult Urology**, v. 45, n. 1, p. 81–86, 1995.
- FAY, A. P. et al. **CÂNCER DE PRÓSTATA**, [s.d.].
- FONG, P. C. et al. Poly (ADP) -Ribose Polymerase Inhibition: Frequent Durable Responses in BRCA Carrier Ovarian Cancer Correlating With Platinum-Free Interval. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 15, 2015.
- FRASER, M. et al. Genomic hallmarks of localized, non-indolent prostate cancer. **Nature Publishing Group**, v. 000, 2017.
- FREDRIKSSON, H. et al. Identification of germline MLH1 alterations in familial prostate cancer. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 2802 –2806, 2006.
- GANDHI, J. et al. The molecular biology of prostate cancer: Current understanding and clinical implications. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 21, n. 1, p. 22–36, 2018.

- GHAFOURI-FARD, S.; DIANATPOUR, A.; FARAMARZI, S. Meta-analysis of BRCA1 polymorphisms and breast cancer susceptibility. **Klinicka Onkologie**, v. 31, n. 5, p. 330–338, 2018.
- GIRI, V. N. et al. Role of genetic testing for inherited prostate cancer risk: Philadelphia prostate cancer consensus conference 2017. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 4, p. 414–424, 2018.
- GRINDEDAL, E. M. et al. Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 18, n. 9, p. 2460–2467, 2009.
- GUEDES, L. B. et al. MSH2 loss in primary prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 22, p. 6863–6874, 2017.
- HARALDSDOTTIR, S. et al. Original Research Article Prostate cancer incidence in males with Lynch syndrome. **Genetics in medicine**, v. 16, n. 7, p. 553–557, 2014.
- HELFAND, B. T. et al. Differences in inherited risk among relatives of hereditary prostate cancer patients using genetic risk score. **Wiley The prostate**, n. April, p. 1–6, 2018.
- HOWLADER, N. et al. **SEER Cancer Statistics Review**. Disponível em: <https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/>.
- HU, Y. et al. A meta-analysis and The Cancer Genome Atlas data of prostate cancer risk and prognosis using epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) expression. **BMC Urology**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2019.
- HUNTER, K. W. et al. Genetic insights into the morass of metastatic heterogeneity. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 4, p. 211–223, 2018.
- HUO, X. et al. Polymorphisms in BRCA1, BRCA1-interacting genes and susceptibility of breast cancer in Chinese women. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 135, n. 11, p. 1569–1575, 2009.
- HUYTON, T. et al. The BRCA1 C-terminal domain: Structure and function. **Mutation Research - DNA Repair**, v. 460, n. 3–4, p. 319–332, 2000.
- IKEDA, S. et al. Next-generation sequencing of prostate cancer : genomic and pathway alterations , potential actionability patterns , and relative rate of use of clinical-grade testing. **Cancer Biology & Therapy**, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2018.
- JARA, L. et al. Molecular analysis of the eighteen most frequent cancer families. v. 1, n. Omim 113705, p. 469–481, 2004.
- JENNINGS, L. J. et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 3, p. 341–365, 2017.
- JOHNSON, N. et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 9, p. 1051–1057, 2007.
- KANG, S. et al. Vitamin D receptor Taq I polymorphism and the risk of prostate cancer: A meta-analysis. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7136–7147, 2018.

- KAUFMAN, B. et al. Olaparib Monotherapy in Patients With Advanced Cancer and a Germline BRCA1/2 Mutation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 3, 2015.
- KIM, G. et al. FDA Approval Summary : Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA -Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, p. 4257–4262, 2015.
- KIM, J. C. et al. Genotyping possible polymorphic variants of human mismatch repair genes in healthy Korean individuals and sporadic colorectal cancer patients. **Kluwer Academic Publishers**, v. 3, p. 129–137, 2004.
- KIRCHHOFF, T. et al. BRCA Mutations and Risk of Prostate Cancer in Ashkenazi Jews. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 9, p. 2918–2921, 2004.
- KONECNY, M.; MILLY, M.; ZAVODNA, K. Comprehensive genetic characterization of hereditary breast / ovarian cancer families from Slovakia. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 126, p. 119–130, 2011.
- KONSTANTOPOULOU, I. et al. BRCA1 mutation analysis in breast/ovarian cancer families from Greece. **Human mutation**, v. 16, n. 3, p. 272–273, 2000.
- KOTE-JARAI, Z. et al. BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. **British journal of cancer**, v. 105, n. 8, p. 1230–4, 2011.
- KUERBITZ, S. J. et al. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7491–7495, 1992.
- LANE, D. P. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, 1992.
- LANGEBERG, W. J. et al. Population-based study of the association of variants in mismatch repair genes with prostate cancer risk and outcomes. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 19, n. 1, p. 258–264, 2010.
- LAPOINTE, J. et al. Genomic Profiling Reveals Alternative Genetic Pathways of Prostate Tumorigenesis. **Cancer research**, n. 18, p. 8504–8511, 2007.
- LEACH, F. S. et al. The mismatch repair gene hMSH2 is mutated in the prostate cancer cell line LNCaP. **the journal of urology**, v. 164, n. 5, p. 1830–1833, 2000.
- LECARPENTIER, J. et al. Prediction of Breast and Prostate Cancer Risks in Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers Using Polygenic Risk Scores. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 20, p. 2240–2250, 2017.
- LEONGAMORNLEERT, D. et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 10, p. 1697–1701, 2012.
- LI, S. et al. Pooling-analysis on hMLH1 polymorphisms and cancer risk : evidence based on 31 , 484 cancer cases and 45 , 494 cancer-free controls. **Oncotarget**, v. 8, n. 54, p. 93063–93078, 2017.
- LINNENBACH, A. J. et al. Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 3, p. 1507–1515, 1993.
- LIU, Y. Fatty acid oxidation is a dominant bioenergetic pathway in prostate cancer. **Prostate**

Cancer and Prostatic Diseases, v. 9, n. 3, p. 230–234, 2006.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. BRCAness revisited. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 2, p. 110–120, 2016.

LOTAN, T. L. et al. DNA damage repair alterations are frequent in prostatic adenocarcinomas with focal pleomorphic giant-cell features. **Histopathology**, v. 74, n. 6, p. 836–843, 2019.

LU, E. et al. DNA Repair Gene Alterations and PARP Inhibitor Response in Patients With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 16, n. 8, p. 933–937, 2018.

MALKIN, D. Germline p53 Mutations and Heritable Cancer. **Annual Review of Genetics**, v. 28, n. 1, p. 443–465, 1994.

MARSHALL, C. H. et al. Prevalence of DNA repair gene mutations in localized prostate cancer according to clinical and pathologic features: Association of Gleason score and tumor stage. **Prostate Cancer Prostatic**, v. 22, n. 1, p. 59–65, 2019.

MARTIN KIRCHER et al. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. **Nature Genetics**, v. 46, p. 310–315, 2014.

MATEO, J. et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. **The New England Journal of Medicine**, p. 1697–1708, 2015.

MATEO, J. et al. DNA Repair in Prostate Cancer: Biology and Clinical Implications. **European Urology**, v. 71, n. 3, p. 417–425, 2017.

MATHONNET, G. et al. Role of DNA mismatch repair genetic polymorphisms in the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **British journal of Haematology**, v. 123, p. 45–48, 2003.

MCHUGH, C.; BROWN, L.; THORNTON, T. A. Detecting heterogeneity in population structure across the genome in admixed populations. **Genetics**, v. 204, n. 1, p. 43–56, 2016.

METCALFE, K. et al. Family History of Cancer and Cancer Risks in Women with BRCA1 or BRCA2 Mutations. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 24, 2010.

MICHAILIDOU, K. et al. Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. **Nature genetics**, v. 45, n. 4, p. 353–361, 2013.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016**. [s.l.: s.n.].

MOHLER, J. L. et al. Prostate Cancer, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN**, v. 17, n. 5, p. 479–505, 2019.

MOMOZAWA, Y. et al. Germline pathogenic variants in 7,636 Japanese patients with prostate cancer and 12,366 controls. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 112, p. 1–8, 2019.

- MOREAU, K. et al. BRCA1 affects lipid synthesis through its interaction with acetyl-CoA carboxylase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3172–3181, 2006.
- MÜNZ, M. et al. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. **Oncogene**, v. 23, n. 34, p. 5748–5758, 2004.
- NETWORK, T. C. G. A. R. The molecular taxonomy of primary prostate cancer. **Journal Cell**, v. 163, n. 4, p. 1011–1025, 2016.
- NGHIEM, B. et al. Mismatch repair enzyme expression in primary and castrate resistant prostate cancer. **Asian Journal of Urology**, v. 3, n. 4, p. 223–228, 2016.
- NI, J. et al. Role of the EpCAM (CD326) in prostate cancer metastasis and progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 31, n. 3–4, p. 779–791, 2012.
- NICOLAIDES, N. C. et al. Genomic Organization of the Human PMS2 Gene Family. **Genomics**, v. 30, p. 195–206, 1995.
- NYBERG, T. et al. Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. **European Urology**, p. 2–13, 2019.
- OH, M. et al. The association of BRCA1 and BRCA2 mutations with prostate cancer risk, frequency, and mortality: A meta-analysis. **The Prostate**, 2019.
- OKEGAWA, T. et al. Epidermal Growth Factor Receptor Status in Circulating Tumor Cells as a Predictive Biomarker of Sensitivity in Castration-Resistant Prostate Cancer Patients Treated with Docetaxel Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, 2016.
- OKKELS, H. et al. MSH6 mutations are frequent in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families with normal pMSH6 expression as detected by immunohistochemistry. **Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology**, v. 20, n. 5, p. 470–477, 2012.
- PAL, T. et al. Frequency of mutations in mismatch repair genes in a population-based study of women with ovarian cancer. **British Journal of Cancer**, v. 107, n. 10, p. 1783–1790, 2012.
- PALMIROTTA, R. et al. Double heterozygosity for BRCA1 pathogenic variant and BRCA2 polymorphic stop codon K3326X: A case report in a southern Italian family. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2018.
- PETRIDIS, C. et al. Frequency of Pathogenic Germline Variants in Sporadic Lobular Breast Cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, v. 28, n. July, p. 1162–1169, 2019.
- PILIÉ, P. G. et al. Germline genetic variants in men with prostate cancer and one or more additional cancers. **Cancer**, v. 123, n. 20, p. 3925–3932, 2017.
- POVEDA, A. M. et al. Olaparib maintenance monotherapy in platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer without germline BRCA mutations: OPINION Phase IIIb study design. **Future Medicine**, v. 15, n. 32, 2019.
- POWELL, I. J. et al. Genes Associated with Prostate Cancer Are Differentially Expressed in African American and European American Men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, n. 9, p. 891–898, 2013.

PRITCHARD, C. C. et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 5, p. 443–453, 2016a.

PRITCHARD, C. C. et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 5, p. 443–453, 2016b.

PRITCHARD, C. C. **Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer**, 2016. (Nota técnica).

RENTZSCH, P. et al. CADD: Predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D886–D894, 2019.

RESEARCH, Z. **DNA Clean & Concentrator™-100 Catalog Nos. D4029 & D4030 Instruction Manual**, [s.d.]. Disponível em: <<http://minnesota.universitypressscholarship.com/view/10.5749/minnesota/9780816692019.001.0001/upso-9780816692019-chapter-1>>

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–424, 2015.

RICKS-SANTI, L. J. et al. Association of Rad51 polymorphism with DNA repair in BRCA1 mutation carriers and sporadic breast cancer risk. **BMC Cancer**, v. 11, n. 1, p. 278, 2011.

RICKS-SANTI, L. J. et al. BRCA1 polymorphisms and breast cancer epidemiology in the Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) study. **Genetic Epidemiology**, v. 37, n. 5, p. 504–511, 2013.

ROBINSON, D. et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Resource. **CellPres**, v. 161, p. 1215–1228, 2015.

ROMANOWICZ, H. et al. New single nucleotide polymorphisms (SNPs) in homologous recombination repair genes detected by microarray analysis in Polish breast cancer patients. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 17, n. 4, p. 541–546, 2016.

ROSTY, C. et al. High prevalence of mismatch repair deficiency in prostate cancers diagnosed in mismatch repair gene mutation carriers from the colon cancer family registry. **Familial Cancer**, v. 13, p. 573–582, 2014.

SAGNA, T. et al. Identification of brca1/2 p.ser1613gly, p.pro871leu, p.lys1183arg, p.glu1038gly, p.ser1140gly, p.ala2466val, p.his2440arg variants in women under 45 years old with breast nodules suspected of having breast cancer in burkina faso. **Biomolecular Concepts**, v. 10, n. 1, p. 120–127, 2019.

SANCHEZ, A. et al. Common variation in BRCA1 may have a role in progression to lethal prostate cancer after radiation treatment. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 19, n. 2, p. 197–201, 2016.

SAPKOTA, Y. et al. Assessing SNP-SNP Interactions among DNA Repair, Modification and Metabolism Related Pathway Genes in Breast Cancer Susceptibility. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 4–9, 2013.

SCHNELL, U.; CIRULLI, V.; GIEPMANS, B. N. G. EpCAM: Structure and function in health and disease. **BBA - Biomembranes**, n. Biochimica et Biophysica Acta, 2013.

SCHUMACHER, F. R. et al. Association analyses of more than 140,000 men identify 63 new prostate cancer susceptibility loci. **Nature Genetics**, v. 50, n. 7, p. 928–936, 2018.

SHI, M. et al. A functional BRCA1 coding sequence genetic variant contributes to prognosis of triple-negative breast cancer, especially after radiotherapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 166, n. 1, p. 109–116, 2017.

SIRISENA, N. D. et al. Genetic variants associated with clinicopathological profiles in sporadic breast cancer in Sri Lankan women. **Journal of Breast Cancer**, v. 21, n. 2, p. 165–172, 2018.

SMITH, Z. L.; EGGENER, S. E.; MURPHY, A. B. African-American Prostate Cancer Disparities. **Current Urology Reports**, v. 18, 2017.

SOKOLENKO, A. P. et al. Identification of novel hereditary cancer genes by whole exome sequencing. **Cancer Letters**, v. 369, n. 2, p. 274–288, 2015.

STRNAD, J. et al. Molecular Cloning and Characterization of a Human Adenocarcinoma / Epithelial Cell Surface Antigen Complementary DNA. **Cancer research**, v. 49, p. 314–317, 1989.

STROM, S. P. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. **Cancer Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 3–11, 2016.

SUN, J. et al. Identification of critical pathways and hub genes in TP53 mutation prostate cancer by bioinformatics analysis. **Biomarkers in Medicine**, v. 13, p. 831–840, 2019.

TAYLOR, B. S. et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. **Cancer cell**, v. 18, n. 1, p. 11–22, 2011.

THOMPSON, B. A. et al. A multifactorial likelihood model for MMR gene variant classification incorporating probabilities based on sequence bioinformatics and tumor characteristics: a report from the Colon Cancer Family Registry. **Human Mutation**, v. 34, n. 1, p. 200–209, 2013.

THOMPSON, E. R. et al. Reevaluation of the BRCA2 truncating allele c.9976A >t (p.Lys3326Ter) in a familial breast cancer context. **Scientific Reports**, v. 5, n. July, p. 5–10, 2015.

THORSTENSON, A. et al. Cancer-specific mortality in men diagnosed with prostate cancer before age 50 years, a nationwide population-based study. **the journal of urology**, v. 197, n. 1, p. 61–66, 2017.

TRYGGVADÓTTIR, L. et al. Prostate Cancer Progression and Survival in BRCA2 Mutation Carriers. **Oxford University Press**, p. 929–936, 2007.

TRZPIS, M. et al. Epithelial cell adhesion molecule: More than a carcinoma marker and adhesion molecule. **The American Journal of Pathology**, v. 171, n. 2, p. 386–395, 2007.

URBINA-JARA, L. K. et al. Landscape of germline mutations in dna repair genes for breast cancer in latin america: Opportunities for parp-like inhibitors and immunotherapy. **Genes**, v. 10, n. 10, p. 8–10, 2019.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer Suppression by the Chromosome Custodians, BRCA1 and BRCA2. **Science**, v. 343, n. March, p. 1470–1476, 2014.

WILCZAK, W. et al. Up-regulation of mismatch repair genes MSH6, PMS2 and MLH1 parallels development of genetic instability, and is linked to tumor aggressiveness and early PSA recurrence in prostate cancer. **Oxford University Press**, 2016.

WU, L. C. et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. **Nature Genetics**, v. 14, n. 4, p. 430–440, 1996.

WU, X. et al. Lipid metabolism in prostate cancer. **American journal of clinical and experimental urology**, v. 2, n. 2, p. 111–20, 2014.

XU, G. P. et al. The association between BRCA1 gene polymorphism and cancer risk: A meta-analysis. **Oncotarget**, v. 9, n. 9, p. 8681–8694, 2018.

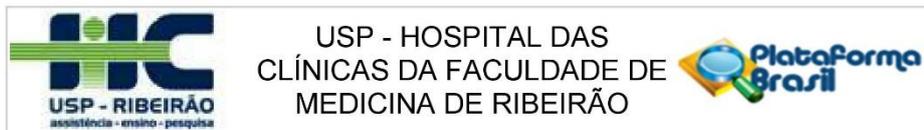
XU, Y.; ZHAO, H.; HOU, J. Correlation between overexpression of EpCAM in prostate tissues and genesis of androgen-dependent prostate cancer. **Tumor Biology**, v. 35, n. 7, p. 6695–6700, 2014.

ZHANG, P. et al. Single-Nucleotide Polymorphisms Sequencing Identifies Candidate Functional Variants at Prostate Cancer Risk Loci. **Genes**, v. 10, p. 1–14, 2019.

ZHENG, S. L. et al. Cumulative Association of Five Genetic Variants with Prostate Cancer. **The New England Journal of Medicine**, 2008.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO PELO CÔMITE DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de genes associados a uma predisposição hereditária no risco de desenvolvimento do câncer de próstata na população brasileira

Pesquisador: KELLY GOMES DUARTE

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 2

CAAE: 92224618.7.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.882.522

Apresentação do Projeto:

Análise de genes associados a uma predisposição hereditária no risco de desenvolvimento do câncer de próstata na população brasileira Projeto de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - SP

Objetivo da Pesquisa:

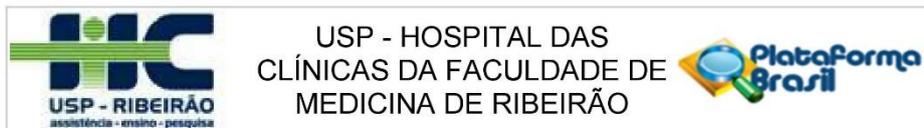
Verificar mutações de linhagens germinativas nos pacientes portadores câncer de próstata com menos de 60 anos de idade; Identificação de variantes patogênicas relacionadas ao câncer de próstata

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: As amostras de sangue venoso dos pacientes serão coletadas no ambulatório de Uro-Oncologia do Hospital das Clínicas na ocasião das consultas já agendadas, a coleta de sangue venoso será realizada na face anterior do braço do paciente por um profissional qualificado mediante assinatura do TCLE. O paciente será orientado aos cuidados após a coleta, para evitar hematomas posteriores. O aparecimento de hematomas pode ocorrer de forma esporádica, sendo o único fator de risco pontual do estudo.

Benefícios: Os resultados obtidos servirão para aumentar o conhecimento sobre as doenças tratadas no HCFMRP-USP, melhorando a qualidade da assistência prestada à população em geral.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.882.522

No estudo os benefícios aos participantes estão relacionados a um maior conhecimento genético a respeito da neoplasia da próstata, corroborando estudos genéticos para um maior entendimento clínico patológico da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de encaminhamento das respostas de pendências solicitadas no parecer anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados. A pesquisadora atendeu adequadamente as solicitações do parecer anterior.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 2.0 22-08-2018, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2.0 22-08-2018, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

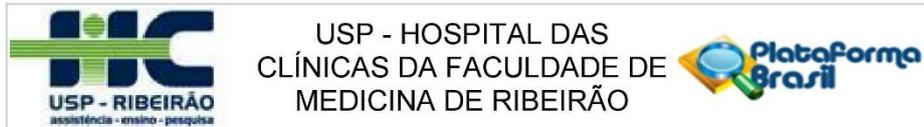
Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1070500.pdf	22/08/2018 13:27:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	22/08/2018 13:26:58	KELLY GOMES DUARTE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta.docx	22/08/2018 10:46:55	Cláudia Tarcila Gomes Sares	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	22/08/2018 10:46:44	Cláudia Tarcila Gomes Sares	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_.jpg	25/06/2018 10:59:34	KELLY GOMES DUARTE	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.882.522

Declaração de Pesquisadores	carta.jpg	25/06/2018 10:59:16	KELLY GOMES DUARTE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.pdf	02/04/2018 14:59:27	KELLY GOMES DUARTE	Aceito
Orçamento	UPC.pdf	30/03/2018 18:04:34	KELLY GOMES DUARTE	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	30/03/2018 17:58:43	KELLY GOMES DUARTE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 10 de Setembro de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado Senhor (a),

Estamos realizando o trabalho de pesquisa chamado **“Análise de genes associados a uma predisposição hereditária no risco de desenvolvimento do câncer de próstata na população brasileira”**.

Nesse trabalho, caso o senhor (a) ou seu familiar concorde em participar, estudaremos estruturas chamadas genes que formados por um conjunto de DNA, localizadas dentro das nossas células (as células são pequenas unidades responsáveis pelas estruturas e funções do nosso corpo), que serão analisadas a partir da coleta de sangue.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer de próstata, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores), desenvolve pesquisa clínica científica. Através desta pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos da doença com o objetivo de oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Este trabalho envolve a busca, em neoplasias da próstata, mutações genéticas em genes pré-selecionados possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias clínicas e terapêuticas.

Caso o senhor (a) ou seu familiar, concorde em participar do estudo é importante que saiba que:

Garantimos ao senhor (a) que sua participação não implicará em nenhum procedimento ou despesa adicional e que sua identidade será sempre mantida em sigilo. Tanto os materiais coletados como as informações registradas serão usadas, futuramente, apenas em pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMRP-USP, após seu consentimento para participação na pesquisa, bem como consentimento para guarda de seu material biológico no “Banco de amostras de tumores urogenitais”, vinculado ao Departamento de Cirurgia e Anatomia desta instituição.

Reafirmamos que sua participação é voluntária e que o senhor (a) pode recusar-se a ceder o material ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem penalidades, sem prejuízos e sem mudança no seu tratamento nesta instituição.

Estou ciente que minha participação é isenta de despesas ou ganhos financeiros e que isto não irá interferir no meu tratamento.

Se o (a) senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre este trabalho, entre em contato com os responsáveis por esta pesquisa: Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis (16) 36022506; Cláudia Tarcila Gomes Sares (Biomédica) (16) 36023298; Kelly Gomes Duarte

(Bióloga) (16) 992469376 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (16) 36022-2228.

Declaro estarem claros para mim quais são os objetivos desta atividade, como participarei, terei garantia de confidencialidade e a certeza de que obterei esclarecimentos a qualquer momento.

TERMO DE CONSENTIMENTO

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Eu, _____, aceito espontaneamente participar deste trabalho, podendo desistir a qualquer momento, se assim achar conveniente.

Pesquisadores responsáveis pelo desenvolvimento da pesquisa

Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis (16) 36022506

Kelly Gomes Duarte (Bióloga) (16) 992469376

ANEXO C – DOCUMENTO BIORREPOSITÓRIO



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

Ribeirão Preto, 29 de maio de 2018.

CARTA DE ENCAMINHAMENTO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Vem-se por meio desta solicitar a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP para a criação de um biorrepositório denominado: Biorrepositório de Materiais Biológicos de Sangue Venoso. Esse biorrepositório será de responsabilidade da bióloga Kelly Gomes Duarte, mestranda no programa de clínica cirúrgica, vinculado ao Departamento de Cirurgia e Anatomia, estando o orientador Prof. Dr. Rodolfo Borges Dos Reis ciente e de acordo com a criação.

O biorrepositório denominado material biológico de sangue venoso tem como objetivo o armazenamento de 10 ml de sangue venoso. Serão coletados dois tubos de 5ml de sangue venoso em tudo contendo EDTA, que será utilizado para fins de pesquisa e análise científica no desenvolvimento do projeto.

O câncer de próstata, geralmente cresce de forma lenta e assintomática em sua fase inicial, porém quando seus sintomas são apresentados consistem em dificuldades e dores ao urinar, coloração escura da urina, dor ao ejacular, sêmen escuro e sensação da bexiga cheia. Os métodos de diagnósticos da doença comumente utilizados são os exames de PSA (Prostate-Specific Antigens), toque retal, ultrassonografia, biópsia e exames de urina. Nosso projeto intitulado "Análise de genes associados a uma predisposição hereditária do câncer de próstata na população brasileira" está relacionado a estudos genéticos envolvendo a identificação de genes associados ao desenvolvimento de câncer de próstata, desta forma, este estudo irá proporcionar um possível método diagnóstico preventivo para identificação precoce de genes responsáveis pelo desencadeamento do câncer de próstata.

O armazenamento das amostras será realizado da seguinte forma: O sangue venoso será coletado de pacientes com câncer de próstata com menos de 60 anos de idade, atendidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. A coleta de sangue será realizada através de punção venosa com auxílio de seringa e agulha. Posteriormente as amostras de sangue serão armazenadas e processadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia para obtenção do DNA que será utilizado posteriormente no estudo. Após apresentarmos aos pacientes voluntários da pesquisa, o projeto e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e estes concordarem em participar livremente de nosso estudo, as amostras serão colhidas e armazenadas.

Fica sob a responsabilidade da bióloga Kelly Gomes Duarte juntamente com a equipe de coleta, o processamento e armazenagem das amostras. A mesma junto com a biomédica e colaboradora de pesquisa Cláudia Tarcila Gomes Sares ficarão responsáveis



FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

pelo armazenamento, catalogação, guarda e utilização do material estocado, comprometendo-se a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o sigilo e a confidencialidade dos doadores, identificando as amostras por meio de registros, números e códigos inerentes ao serviço.

Toda coleta e armazenamento de material será precedida de um "Termo de Consentimento de Guarda de Material" assinado pelo paciente responsável pelo material armazenado. Além disso, serão criados mecanismos que assegurem a possibilidade de contato com o paciente e os familiares dos doadores para fornecimento de informação do seu interesse como resultados de exames clínicos e genéticos. Os pacientes declaram que conhecem a se comprometem a seguir as resoluções do CNS vigentes no país referentes às normas éticas de pesquisa (Resolução 466/2012) e de criação e utilização de biobancos/biorrepositórios (Resolução nº 441/2011).

O responsável pelo biorrepositório declara que a pesquisa a ser feita com o material será submetida à aprovação do CEP desta instituição e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis
Orientador

Kelly Gomes Duarte (Bióloga)
Mestranda responsável pelo biorrepositório

Prof. Dr. José Sebastião dos Santos
Chefe do Departamento de Cirurgia e Anatomia

ANEXO D – APOIO FINANCEIRO

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