ÉRICO LUIS DANTAS DIÓGENES SALDANHA

**Influência do polimorfismo genético no
desenvolvimento do câncer de próstata
hereditário**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Miguel Srougi

**SÃO PAULO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Saldanha, Érico Luis Dantas Diógenes
Influência do polimorfismo genético no
desenvolvimento do câncer de próstata hereditário /
Érico Luis Dantas Diógenes Saldanha. -- São Paulo,
2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.
Orientador: Miguel Srougi.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata
2.Hereditariedade 3.Polimorfismo de nucleotídeo
único 4.Genoma humano 5.Diagnóstico 6.Prognóstico

USP/FM/DBD-363/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

*Se eu vi mais longe, foi por estar
sobre ombros de gigantes.*

Isaac Newton

*Aos meus pais Luis e Josene,
dedico com imenso carinho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, meu orientador, pelo enorme privilégio de ter sido seu aluno. Agradeço por sempre ter estimulado o meu crescimento profissional e ter disponibilizado sua atenção para o desenvolvimento desse trabalho. Meu sincero agradecimento por permitir caminhar do seu lado e pela grande oportunidade pois o tenho como grande referência na minha vida pessoal e profissional.

A Prof^a. Dr^a. Sabrina T. Reis, minha coorientadora, agradeço imensamente por ter me acolhido para realizar esse projeto. Serei eternamente grato todo o esforço que você desempenhou para que se tornasse realidade. Aproveito e parablenizo pelo exemplo de profissional, dedicada, humana, de coração enorme e tenho uma profunda admiração.

A Prof^a. Dr^a. Katia Ramos Moreira Leite, pelos ensinamentos, pelo acolhimento e por disponibilizar o LIM 55 para realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes, meu amigo, coordenador da pós-graduação, pela oportunidade de viabilizar o andamento desse projeto. Expresso minha sincera admiração pelo seu trabalho e pelo exemplo de pessoa, admirável e humana.

A equipe do consultório do Prof. Miguel Srougi, pela generosa ajuda e paciência na captação dos pacientes e na coleta do sangue, em especial, a enfermeira Mary Ellen que contribuiu muito para essa etapa.

Aos funcionários do LIM 55, pela disponibilidade e presteza do apoio no andamento de todo o projeto. Um agradecimento especial a Dra. Nayara Azevedo que se dedicou plenamente para realização do trabalho, serei eternamente grato a sua ajuda.

Aos funcionários da Urologia, pela prestativa ajuda nas várias etapas desse projeto, em especial a Elisa que foi fundamental em todo o andamento do trabalho, sempre atenciosa e estreitando a distância para viabilizar o andamento do processo.

Aos membros da Banca de Qualificação, Dra. Kátia Ramos, Dr. Marco Arap e Dr. Fábio Vicentini, pelas sugestões que agregaram e enriqueceram a tese.

Aos pacientes, pela imensa disponibilidade de terem participado e contribuído com o trabalho.

Aos meus amigos e professores que foram responsáveis pela minha formação como urologista, em especial Prof. Dr. Cláudio Almeida, Prof. Dr. Nelson Gattas, Prof. Dr. Fernando Almeida, Dr. Samuel Saiovici, Dr. Sandro Nassar, Dr. Fernando Dourado e Dr. Mauricio Almeida, a todos meu sincero agradecimento pela amizade e pela dedicação nesta importante etapa da minha vida.

Aos meus pais, Luis Diógenes e Maria Josene, médicos, minhas maiores referências, pelo imenso incentivo do crescimento e por sempre terem viabilizado a seguir o melhor caminho. Agradeço profundamente por todo carinho, amor e ensinamentos que me deram na vida. Eternamente grato por tudo.

A minhas irmãs Karine, Aline e Michelle Dantas, pelo apoio incondicional do meu crescimento profissional e por todo o amor que sempre recebo de vocês.

A minha esposa Juliane Diógenes, pela parceria, amor, compreensão e dedicação com a família durante todos esses anos.

Minhas filhas Isabelle, Giovana e Melissa Diógenes, por estarem sempre presentes e serem minhas maiores fontes de inspiração para seguir diariamente na trilha desse filme que é a vida.

Agradecimento Especial

À FAPESP - Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo,
pelo apoio financeiro na realização deste trabalho (Protocolo: 2012/19258-5).

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas
Lista de quadros
Lista de tabelas
Resumo
Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Próstata.....	2
1.2	Aspectos Genéticos do Câncer de Próstata.....	6
1.3	Polimorfismo Genético	10
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Primário	17
2.2	Objetivo Secundário	17
3	MÉTODOS.....	18
3.1	Pacientes.....	19
3.2	Extração de DNA.....	21
3.3	Análise de Expressão de Genes por PCR em Tempo Real Quantitativo	22
3.4	Análise Estatística	24
3.5	Ética	25
4	RESULTADOS.....	26
5	DISCUSSÃO	57
5.1	Perspectivas Para o Futuro	67
5.2	Limitações do Estudo	69
6	CONCLUSÕES	70
7	ANEXOS	72
8	REFERÊNCIAS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

χ^2	- Teste de qui-quadrado
AJCC	- <i>American Joint Committee on Cancer</i>
AUA	- <i>American Urological Association</i>
BRCA1	- <i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	- <i>Breast cancer 2</i>
CaP	- Câncer de próstata
CAPPesq	- Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CCD	- Dispositivo de carga acoplada (<i>Charge-coupled device</i>)
CHECK2	- <i>Checkpoint kinase 2</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELAC2	- <i>Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2</i>
ERSPC	- <i>European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer</i>
FAPESP	- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GWAS	- Estudo de associação Genômica
HC	- Hospital das Clínicas
HPC-1	- Câncer de próstata hereditário
IC95%	- Intervalo de confiança a 95%
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
LIM55	- Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia
MAF	- Alelo menor
MGB	- <i>Minor Groove Binder</i>
MYEOV	- <i>Myeloma overexpressed</i>
NBS	- <i>Nijmegen breakage syndrome</i>
OR	- <i>Odds ratio</i>

PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PLCO	- <i>Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial</i>
PRATICAL	- Grupo que estuda alterações genéticas relacionadas ao CaP
PSA	- Antígeno prostático específico
qRT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RNaseL	- Gene ribonuclease L
RR	- Risco relativo
SBU	- Sociedade Brasileira de Urologia
SNP	- Polimorfismo de nucleotídeo único
SNPns	- Polimorfismo de nucleotídeo único não sinônimos
SPSS	- <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TNM	- Tumor, Nódulo, Metástase
TR	- Toque retal
USPSTF	- <i>U.S. Preventive Services Task Force</i>
VGLL3	- <i>Vestigial like Family Member</i>

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação TNM/AJCC (2010)	5
Quadro 2 - Descrição dos polimorfismos relevantes relacionados a hereditariedade baseada na meta análise realizada por Liu <i>et al.</i>	15
Quadro 3 - Polimorfismos avaliados em pacientes diagnosticados com CaP com herança mendeliana comparados a indivíduos saudáveis.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos 185 pacientes com CaP e dos 70 indivíduos do grupo controle.....	27
Tabela 2 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos nos pacientes diagnosticados com CaP e nos indivíduos do grupo controle	28
Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos pacientes com CaP esporádico e familiar	30
Tabela 4 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos nos pacientes diagnosticados com CaP esporádico e hereditário	31
Tabela 5 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação ao nível de PSA.....	34
Tabela 6 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação ao escore de Gleason (6, 7-10).....	37
Tabela 7 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação ao escore de Gleason (6, 7, 8-10).....	40
Tabela 8 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação ao estadiamento patológico	43
Tabela 9 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação à recidiva bioquímica.....	46
Tabela 10 - Distribuição dos alelos dos genes dos 20 polimorfismos entre pacientes com CaP e grupo controle	49
Tabela 11 - Distribuição dos alelos dos genes dos 20 polimorfismos entre em relação à hereditariedade	51
Tabela 12 - Distribuição dos alelos dos genes dos 20 polimorfismos entre em relação à recidiva bioquímica	53

RESUMO

Saldanha ELDD. *Influência do polimorfismo genético no desenvolvimento do câncer de próstata hereditário* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia mais comum no homem depois do câncer de pele não-melanoma. É uma doença de comportamento heterogêneo e a hereditariedade é um dos principais fatores de risco. Recentes estudos do genoma humano revelaram numerosas regiões de susceptibilidade associada com a doença. Os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) são variantes de risco genéticos associados com uma série de doenças incluindo o câncer. Considerando que a história familiar constitui fator de risco para o desenvolvimento do CaP, acredita-se que a identificação de polimorfismos envolvidos nesse processo possa ter um papel relevante para auxiliar no desenvolvimento de ferramentas alternativas para a detecção precoce e para a definição do prognóstico desta neoplasia. **OBJETIVOS:** Análise dos polimorfismos genéticos relacionados ao desenvolvimento do câncer de próstata em indivíduos com história familiar para a doença. Além disso, correlacionar a frequência dos polimorfismos e os fatores prognósticos, tais como: nível do antígeno prostático específico (PSA), escore de Gleason, estadiamento patológico e recidiva bioquímica. **MÉTODOS:** Neste estudo foi analisado a frequência de 20 SNPs em 255 pacientes, sendo 185 pacientes portadores de câncer de próstata e 70 grupo controle. No grupo diagnosticado com CaP, tinham 97 casos esporádicos e 72 com histórico familiar (dois parentes de primeiro grau). O grupo controle foi composto por homens sem diagnóstico de CaP que estavam em prevenção com parâmetros como psa e toque retal normais. Todos foram submetidos a extração do DNA e o genótipo avaliado através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real. A análise estatística foi realizada comparando a genotipagem e a frequência alélica entre os grupos, utilizando o teste de qui-quadrado com valor de significância menor ou igual a 0,05. **RESULTADOS:** Dois dos 20 polimorfismos apresentaram associação significativa com o CaP hereditário, o SNP rs7931342 (11q13.2) onde o genótipo homozigoto foi cinco vezes mais frequente ($p=0,01$) e o rs10090154 (8q24) onde o alelo polimórfico aumenta duas vezes e meia a chance de CaP hereditário ($OR=2,67$;

$p=0,04$). O rs2660753 (3p12.1) mostrou relevância para o CaP esporádico onde a presença do alelo polimórfico tem um efeito protetor para o desenvolvimento da doença ($OR=0,50$; $p=0,01$). Com relação a associação dos fatores prognósticos, foram encontrados achados significativos para o SNP rs620861 (8q24) onde o genótipo homozigoto selvagem está associado com menor escore de Gleason ($p=0,04$). O polimorfismo rs1447295 (8q24) está relacionado a um melhor prognóstico, pois foi mais frequente nos pacientes com estadiamento localizado, sem recidiva bioquímica e com sobrevida livre de recidiva mais longa. **CONCLUSÃO:** Nosso estudo evidenciou dois SNP (rs7931342 e rs10090154) como fator de risco para o desenvolvimento de CaP hereditário. Com relação o CaP esporádico, a presença do alelo polimórfico do rs2660753 demonstra um efeito protetor. Por último, comparando os fatores prognósticos, tanto o genótipo homozigoto selvagem do rs620861 como o homozigoto polimórfico do rs1447295 conferem um bom prognóstico.

Descritores: neoplasias da próstata; hereditariedade; polimorfismo de nucleotídeo único; genoma humano; diagnóstico; prognóstico

ABSTRACT

Saldanha ELDD. *Role of genetic polymorphism on hereditary prostate cancer development* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: Prostate cancer (PCa) is the most common non-cutaneous malignancy among men. It is a heterogeneous disease and heredity is one of the strongest risk factors. Recent studies of the human genome revealed numerous susceptibility regions associated with the disease. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been implicated in the risk of developing the prostate cancer. Considering that the family history is a risk factor for PCa development, we believe that identification of polymorphisms involved in these processes may have an important role to help in the development of alternative tools for early detection and to define the prognosis of this neoplasm. **OBJECTIVES:** Analysis of genetic polymorphisms associated with the development of prostate cancer in patients with family history of prostate cancer. Moreover, correlate the frequency of polymorphisms and prognostic factors such as PSA level, Gleason score, pathological stage and biochemical recurrence. **METHODS:** In this study, the frequency of 20 genetic single nucleotide polymorphisms were analyzed in 255 patients, 185 patients with prostate cancer and 70 control. In the group diagnosed with PCa, they had 97 sporadic cases and 72 had a family history (two first-degree relatives). The control group consisted of men with no diagnosis of PCa who were on prevention with parameters such as normal psa and digital rectal exam. All were subjected to DNA extraction and genotype assessed by real-time polymerase chain reaction technique. Statistical analysis was performed by comparing the genotype and allele frequency between the groups using the chi-square test with significance or equal to 0.05. **RESULTS:** Two of the 20 polymorphisms were significantly associated with hereditary CaP, the rs7931342 (11q13.2) that the homozygote genotype was five times more common ($p=0.01$) and rs10090154 (8q24) that the polymorphic allele increase two times and a half the risk of hereditary PCa ($OR = 0.5$; $p = 0.04$). The rs2660753 (3p12.1) showed association with sporadic PCa where the presence of polymorphic allele has a protective effect on the PCa development ($OR = 2,67$, $p = 0.01$). Regarding the association of prognostic factors, we found significant findings

to the SNP rs620861 (8q24) that the wild homozygote genotype is associated with lower Gleason score ($p = 0.04$). The rs1447295 polymorphism (8q24) is related to a better prognosis because it was more frequent in patients with localized stage, without biochemical recurrence and longer recurrence-free survival. **CONCLUSIONS:** Our study showed two SNPs (rs7931342 and rs10090154) as a risk factor for hereditary PCa development. Regarding the sporadic PCa, the polymorphic allele presence of rs2660753 demonstrated a protective effect. Finally, comparing the prognostic factors, both wild homozygote genotype of rs620861 and polymorphic homozygote of rs1447295 offer a good prognosis.

Descriptors: prostatic neoplasms; heredity; polymorphism single nucleotide, genome human; diagnosis; prognosis

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Próstata

O Câncer de Próstata (CaP) é a neoplasia mais comum do sexo masculino depois do câncer de pele não melanoma e o segundo em causa de óbitos no Brasil^{1,2}. Atinge um em cada seis indivíduos, apresentando uma chance de desenvolver a neoplasia ao longo da vida em torno de 16% e o risco de óbito ao redor de 3,4%². De acordo com estimativa americana, 164.690 norte-americanos desenvolverão CaP em 2018, e aproximadamente 9% deles morrerão nos próximos cinco anos². No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 68.220 novos casos da doença em 2018 e 13.772 mortes em 2013¹.

Nas últimas duas décadas, a mortalidade por CaP reduziu em torno de 45%, provavelmente devido a detecção mais precoce da doença e/ou melhorias no tratamento³. Em parte, essa mudança do cenário está relacionada ao rastreamento do CaP, baseado na dosagem periódica do antígeno prostático específico (PSA), que elevou a taxa de detecção da doença numa fase mais inicial e com doença localizada. Com isso, possibilitou um tratamento numa situação mais favorável, otimizando o prognóstico e elevando as taxas de cura. No entanto, é imprescindível individualizar cada caso para evitar um tratamento desnecessário.

O rastreamento é um tema bastante debatido na literatura. Questiona-se o real custo-benefício, pois acarreta um “sobrediagnóstico” e “sobretreamento”, e o verdadeiro impacto na diminuição da mortalidade. Dois estudos randomizados que investigam o papel do rastreamento na redução mortalidade como o *Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial* (PLCO)⁴ e o *European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer* (ERSPC)⁵ evidenciaram resultados controversos. A *U.S. Preventive Services Task Force* (USPSTF) em 2015 recomendou a não realização do rastreamento de CaP na população geral, embora mais tarde, em 2017, mudou o grau de recomendação de D para C. A *American Urological Association* (AUA), a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU), entre outras questionaram a análise da força tarefa e recomendam que seja realizado o rastreamento com algumas particularidades^{6,7}.

O comportamento dessa patologia é clinicamente heterogêneo com história natural variável indo desde uma doença indolente até uma doença agressiva e fatal². O grande desafio é distinguir qual paciente cujo tumor tem um maior potencial de agressividade, permitindo que o tratamento seja oportuno e necessário, oferecendo baixa taxa de morbidade e melhoria na expectativa de vida^{8,9}. Até hoje, ainda não estão disponíveis testes que avaliem com confiabilidade o verdadeiro comportamento tumoral que seria de extrema importância na decisão terapêutica.

O diagnóstico de CaP é baseado no exame do PSA e toque retal (TR). Em caso de suspeita, seja pelo PSA ou TR alterado, o diagnóstico definitivo é estabelecido por meio da biópsia. Mais de 95% são

representados pelos adenocarcinomas e o restante compreende os tumores mesenquimais e uroteliais. O sistema de graduação histológica mais utilizado é proposto por Gleason, que valoriza principalmente o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático. Nesse sistema, os tumores são classificados em cinco graus, denominando-se grau 1 as lesões mais diferenciadas e grau 5 as mais indiferenciadas. O escore de Gleason é dado pela soma dos graus das duas áreas mais prevalentes. O escore 6 (3+3) é considerado baixo grau, o escore 7 (3+4 ou 4+3) grau intermediário e 8, 9 e 10 são considerados de alto grau¹⁰. Em 2015, a Sociedade Internacional de Patologia Urológica, atualizou o sistema de graduação de Gleason. O novo sistema proposto por Epstein¹¹, modificou o agrupamento prognóstico em 5 grupos (1 a 5) de acordo com a contagem final do escore de Gleason: ISUP 1 - Gleason 3+3, ISUP 2 - Gleason 3+4, ISUP 3 - Gleason 4+3, ISUP 4 - Gleason 8 e ISUP 5 - 9 e 10.

A evolução dos pacientes com CaP é diretamente relacionada com a extensão da doença, e, por isso, atualmente é utilizado o sistema de estadiamento Tumor, Linfonodo, Metástase (TNM) recomendada pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) - 2010, com o intuito de caracterizar e padronizar essa extensão (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação TNM/AJCC (2010)

Tumor primário (T)	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou não visível por meio de exame de imagem
T1a	Achado histológico incidental em 5% ou menos do tecido ressecado
T1b	Achado histológico incidental em mais de 5% do tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (por exemplo, devido a PSA elevado)
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor que envolve uma metade ou menos de um dos lobos
T2b	Tumor que envolve mais da metade de um dos lobos, mas não ambos os lobos
T2c	Tumor que envolve ambos os lobos
T3	Tumor com extensão extra prostática
T3a	Extensão extra prostática ou invasão microscópica do colo da bexiga
T3b	Invasão das vesículas seminais
T4	Tumor invade estruturas adjacentes que não as vesículas seminais: reto, músculos elevadores do ânus, parede pélvica
Linfonodos regionais (N)	
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em linfonodo regional
Metástase a distância (M)	
Mx	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase a distância
M1a	Linfonodo (s) não regional (ais)
M1b	Osso (s)
M1c	Outra (s) localização (ões)

Em 1998, D'amico *et al.*¹² propuseram uma estratificação de risco para o câncer de próstata com o intuito de avaliar a recidiva bioquímica após

o tratamento. A classificação é baseada no nível de PSA, escore de Gleason e estadiamento, e categorizada em risco baixo, intermediário e alto. O baixo risco é estabelecido por PSA ≤ 10 ng/mL, Gleason ≤ 6 e/ou estágio T1/T2a, o risco intermediário por PSA 10-20 ng/mL, Gleason 7 e/ou estágio T2b e o alto risco por PSA > 20 ng/mL, Gleason 8-10 e/ou estágio $\geq$ T2c.

O escore de Gleason, níveis séricos de PSA e estágio clínico auxiliam na tomada de decisões no tratamento do CaP, porém mesmo com o emprego dessas variáveis não é possível prever adequadamente o comportamento tumoral, pacientes que recebem o mesmo diagnóstico podem apresentar diferentes taxas de progressão e respostas diversas ao mesmo tratamento. Esse fato pode ser devido a diferentes condições ambientais e também genéticas que são distintas entre as populações. O melhor conhecimento da biologia tumoral desse tumor mudará o panorama do tratamento, uma vez que será possível individualizar o seu perfil de comportamento.

1.2 Aspectos Genéticos do Câncer de Próstata

As alterações genéticas provavelmente representam o mecanismo mais comum que leva ao desenvolvimento e progressão do câncer e grande esforço tem sido feito no sentido de identificar essas alterações e os genes envolvidos. Entretanto o CaP é uma neoplasia complexa e multifatorial e ao contrário de outros tumores como mama e cólon, onde genes importantes de susceptibilidade foram descobertos, no CaP nenhum dos genes de predisposição se confirma em estudos de diferentes populações¹³.

Esta neoplasia apresenta fatores de risco bem estabelecidos, como idade, raça negra e história familiar². A hereditariedade está dentre os principais fatores. O câncer de próstata pode ser classificado em 3 formas: a) esporádico, o mais comum e ocorre randomicamente na população; b) familiar, caracterizado por um agrupamento imprevisível de CaP em membros de uma família; e c) hereditário, caracterizado por herança mendeliana e início precoce da doença durante a vida¹⁴.

Tumores recebem a denominação de hereditários quando estão associados a mutações que geram genes de susceptibilidade de alta penetrância e são transmitidos aos descendentes, aumentando o risco de desenvolvimento da doença. Não há dúvida que fatores hereditários tenham o seu papel no CaP. Dados de 44788 gêmeos escandinavos mostraram associação significativa entre fatores hereditários e risco de CaP, com os fatores hereditários respondendo por 42% do risco¹⁵.

A forma familiar do CaP corresponde a aproximadamente 20% dos casos e é definida pelo acometimento de pelo menos dois parentes de primeiro grau. Transmissão hereditária compatível com herança mendeliana acontece em 5% dos casos de CaP, e o reconhecimento dessa hereditariedade necessita de critérios mais estritos, por exemplo, de três parentes de primeiro ou segundo grau acometidos ou dois parentes afetados antes dos 55 anos de idade. Exceto pelo diagnóstico em idade precoce, não existe nenhum parâmetro clínico, patológico ou de evolução claramente associado ao CaP hereditário quando comparado com o esporádico¹⁶.

Estudos casos controle foram realizados com o intuito de evidenciar o componente familiar no CaP. Estes estudos indicam que o risco relativo (RR)

em parentes de primeiro grau de pacientes com CaP varia entre 0,64 e 11 vezes^{17,18}, foi também demonstrado que o RR aumenta a medida que o número de membros familiares afetados aumenta, com RRs de 2,2, 4,9 e 10,9 para um, dois e três parentes adicionais afetados além do probando, respectivamente. Outra importante observação é que o RR dos membros familiares aumenta conforme a idade do probando diminui¹⁹.

Na realidade, a chance do aparecimento do CaP em homem com um parente de primeiro grau com esta neoplasia é de duas a três vezes maior quando comparado a homens sem história familiar²⁰. Estudos em gêmeos monozigóticos comparados com dizigóticos mostraram que o risco de CaP foi o dobro em monozigóticos, reforçando a existência do componente hereditário como risco para CaP²¹. Estima-se que apenas 9% de todos os tumores de próstata sejam hereditários, mas pode-se chegar até 43% quando considerados apenas pacientes com CP e idade inferior a 55 anos²².

Apesar do fato de estudos caso controle mostrarem a significância dos fatores genéticos no desenvolvimento do CaP, o modo genético de transmissão é ainda debatido. Análises de segregação estudam a estrutura de agrupamentos familiares e descrevem o modo de herança, penetrância e frequência alélica de predisposição genética a uma doença. Carter *et al.*²², usando estas análises, observou que o CaP diagnosticado antes dos 55 anos pode ser causado por um raro alelo altamente penetrante, autossômico dominante, que pode explicar mais de 43% da doença neste grupo etário e mais de 9% do CaP em homens com mais de 85 anos.

Evidências da agregação familiar do CaP surgiram desde 1956²³. Inicialmente foram identificados seis loci associados ao risco de CaP

hereditário através de estudos de linkage, mas a primeira publicação de um estudo significativo foi em 1996 feita por um grupo da Johns Hopkins, onde reportaram uma região de linkage no locus do cromossomo 1q24-25, o qual foi nomeado câncer de próstata hereditário 1 (HPC-1)²⁴. Um estudo inicial com 91 famílias mostrava que nos Estados Unidos 42% dos CaP hereditários estavam associados a alterações nesta região, porém análise posterior com 772 famílias encontrou proporção de apenas 6%²⁵. A baixa confirmação observada em estudos subsequentes pode ser explicada pela possível existência de múltiplos genes de susceptibilidade e também pelo fato de que talvez nenhum locus isoladamente responda por uma maior parte do CaP hereditário.

O gene ribonuclease L (RNaseL) é o gene localizado no locus HPC-1 e está envolvido na regulação da proliferação celular e apoptose induzida por interferon importante na degradação de células infectadas por vírus. Já foi demonstrado que mutações do RNaseL estavam associadas a maior risco de CaP e ao desenvolvimento da neoplasia em idade mais precoce e mutações de RNaseL não foram observadas em pacientes com CaP esporádico²⁶. Polimorfismos do gene RNaseL também se mostraram associados a maior risco de CaP em várias populações. A variante polimórfica do polimorfismo Arg462Gln do gene RNaseL, o qual tem três vezes menos atividade enzimática do que o tipo selvagem, mostrou-se associada significativamente com o risco de CaP²⁷. Por outro lado, mutações nesse gene foram encontradas em apenas 4% de CaP em estudo finlandês, sugerindo que talvez a participação deste gene no CaP hereditário seja pequena²⁸.

O *zinc phosphodiesterase ELAC protein 2* (ELAC2) foi o primeiro gene de susceptibilidade identificado e se localiza no locus HPC2, sendo que mutações e polimorfismos deste gene estão associados com o risco de CaP²⁹. Porém, assim como o observado no caso do RNaseL, os achados entre os diferentes estudos têm sido inconsistentes. Estima-se que alterações do gene ELAC2 estejam presentes em apenas 2% dos casos, tendo talvez papel limitado no CaP hereditário³⁰.

Outros genes de susceptibilidade descritos foram o *Breast cancer 1* (BRCA1) e *Breast cancer 2* (BRCA2). Sabe-se que o RR de CaP aumenta em homens que carregam a mutação nestes genes de predisposição ao câncer de mama³¹. Além disso, mutações em linhagens germinativas foram encontradas no gene *nijmegen breakage syndrome* (NBS)³² em uma frequência maior nos casos de CaP que nos controles e também no gene *Checkpoint kinase 2* (CHECK2)³³. Isto suporta a possibilidade que a predisposição ao CaP em uma proporção de casos pode ser causada por mutações nos genes envolvidos no reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA).

1.3 Polimorfismo Genético

Muito antes da conclusão do genoma humano, ficou claro que os locos de variação genética poderiam ser usados para identificar propriedades de segregação de doenças entre as famílias³⁴. Os marcadores que tem surgido para estudos de associação e linkage são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Embora existam múltiplas fontes de variação genética que ocorrem entre os indivíduos, SNP são os tipos mais comuns e

são poderosos marcadores, devido sua abundância e estabilidade³⁵. Até o momento estima-se que existam aproximadamente 10 milhões de SNP com uma frequência alélica de pelo menos 5%³⁶.

O SNP é definido por uma variação na sequência de DNA que ocorre quando um único nucleotídeo (A, T, C ou G) no genoma difere do nucleotídeo normalmente esperado. As alterações mais frequentes são as que envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, troca entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C) que são denominadas transições. As transversões são substituições de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa³⁷. Para que uma alteração de única base seja considerado um SNP, deve ocorrer em uma frequência mínima de 1% em uma dada população³⁸.

Os SNPs estão dispersos por todo o genoma humano podendo ocorrer tanto em regiões codificadoras como não codificadoras. SNPs que ocorrem em regiões codificadoras podem ser denominados sinônimos ou não sinônimos (SNPns), sendo que este último ocorre quando há substituição de um aminoácido na sequência proteica podendo haver modificações estruturais e funcionais na proteína e, portanto, tem um maior potencial de reflexo biológico. No entanto, a maioria dessas variantes de risco estão mapeadas em regiões não codificantes, não alterando a sequência das proteínas³⁹.

Outros tipos de polimorfismos também são de grande importância para a fisiologia da célula. Alguns exemplos são os SNPs localizados em regiões promotoras que podem alterar a expressão do gene, polimorfismos localizados em sítios de *splicing* que podem resultar na inserção, exclusão

ou modificação do tamanho dos éxons, podendo alterar a estabilidade do RNAm ou a própria proteína traduzida a partir desse RNAm, SNPs que causam geração ou supressão de códons de terminação de tradução gerando proteínas com diferentes tamanhos e finalmente, polimorfismos em regiões regulatórias existentes nas regiões 3'UTR ou SNPs que causam adenilação alternativa ou alteração na estrutura e estabilidade do RNA.

Utilizando os SNPs, estudos de associação do genoma (GWAS) identificaram mais de 4.800 variantes de risco genéticos associados com mais de 500 traços e características humanas e também com uma série de doenças⁴⁰. Os SNPs podem servir como marcadores genéticos para identificar estudos de ligação em famílias, desequilíbrio de ligação em populações isoladas, bem como em análise de associação de pacientes e controles. Para estudos de associação e *linkage* os SNP são comumente usados pois são fontes de variação genética comuns e apresentam herança estável ao longo das gerações. A maior parte dos SNPs estão localizados em regiões não codificantes, o que dificulta o entendimento de como essas variações podem contribuir para o desenvolvimento de doenças.

Estudos GWAS encontraram mais de 90 SNPs comuns (cujas frequências do alelo menor [MAF] foram de 5% ou mais) associados com alterações fracas ou moderadas ([*Oddis ratio* (OR)]: 1,1 -1,3) para o desenvolvimento do CaP⁴¹⁻⁴⁶. Em conjunto, estes SNPs podem ser responsáveis por cerca de um terço do risco global de CaP hereditário⁴³.

SNPs menos comuns (MAF 1% - 5%) e raros (MAF <1%) podem ser responsáveis por conferir maior risco da doença do que variantes genéticas

mais comuns. Para identificar essas variantes, são necessárias abordagens alternativas em estudos GWAS. Uma dessas abordagens tem como base indivíduos que possuem CaP familiar ou hereditário, onde o risco genético de herança associado com mutações menos frequentes está concentrado. As estimativas indicam que 5% a 10% de toda a incidência de CaP por herdabilidade é resultante dos alelos de predisposição raros²².

Existem alguns trabalhos na literatura que fazem uma associação entre polimorfismos e susceptibilidade ao CaP. Eeles *et al.*⁴⁷ identificaram sete novos loci de susceptibilidade do CaP hereditário nos cromossomos 2, 4, 8, 11 e 22. Neste estudo os pacientes foram selecionados a partir de várias casuísticas provenientes do Reino Unido e Austrália totalizando 3.650 casos de CaP hereditário e 3.940 controles, sendo analisados 43.671 SNP utilizando a plataforma *Illumina iSELECT array*.

Um outro estudo em 2009⁴⁸, selecionou 289 famílias caucasianas e 12 famílias afro-americanas que possuíam CaP hereditário. Os indivíduos portadores foram estratificados de acordo com a idade ao diagnóstico, agressividade e número de membros afetados e então foram analisados 5.867 SNP usando a plataforma *Illumina SNP linkage Panel IVb*. Sugestões de ligação foram encontradas em alguns loci, sendo que o 2q21 foi mais frequente em famílias com uma média de idade menor que 65 anos ao diagnóstico, e 3 loci foram identificados entre famílias caucasianas com CaP mais agressivo.

Mais recentemente, Liu *et al.*⁴⁹, em 2011, realizaram uma metanálise combinando dados de estudos de associação *genome-wide* e estudos caso-

controle que foram realizados na grande maioria na América do Norte e Europa, e encontraram 31 SNPs em 14 loci de risco independentes que foram classificados como sendo impactantes na susceptibilidade do CaP, e considerados relevantes para a saúde pública mundial (Quadro 2).

Sendo assim, foram selecionados 20 SNPs baseado nessa metanálise realizada por Liu *et al.*⁴⁹, encontrados como tendo relevância e que tem sido demonstrado como importantes para o desenvolvimento do CaP hereditário em algumas populações, mas nunca foram analisados em conjunto na população brasileira, considerada uma população altamente diversa do ponto de vista genético, e que apresenta alta incidência do CaP, incluindo sua forma hereditária.

Por isso, é de fundamental importância a análise desses polimorfismos em pacientes brasileiros com CaP hereditário, o que pode contribuir na identificação de alterações genéticas hereditárias comuns na nossa população, podendo ser útil na identificação de pacientes e famílias susceptíveis ao desenvolvimento da doença.

Quadro 2 - Descrição dos polimorfismos relevantes relacionados a hereditariedade baseada na meta análise realizada por Liu et al.⁴⁹

Alteração	Região	Alelo	Alteração	Região	Alelo
rs10090154	8q24	C/T	rs5945572	NUDT10/11	G/A
rs1016343	8q24	C/T	rs5945619	NUDT11	T/C
rs10486567	JAZF1	G/A	rs620861	-	C/T
rs10896469	11q13	G/A	rs6470494	8q24	C/T
rs10993994	MSMB	C/T	rs6501455	17q24.3	T/A
rs1447295	8q24	C/A	rs6983267	8q24	G/T
rs16901979	8q24	C/A	rs6983561	8q24	A/C
rs1859962	17q24.3	T/G	rs7000448	8q24	G/A
rs2660753	3P12.1	C/T	rs7214479	17q24.3	C/T
rs2710646	EHBP1	C/A	rs7501939	HNF1B	T/C
rs2735839	KLK2/3	C/A	rs7920517	MSMB	A/G
rs3760511	17q12	T/C	rs7931342	11q13.2	G/T
rs4242382	8q24	G/A	rs9364554	SLC22A3	C/T
rs4430796	HNF1B	A/G	rs9623117	22q13	T/C
rs445114	8q24	T/C	rs983085	17q24.3	A/C
Rs4962416	CTBP2	T/C			

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Análise dos polimorfismos genéticos relacionados ao desenvolvimento do câncer de próstata em indivíduos com história familiar da doença.

2.2 Objetivo Secundário

Correlacionar a frequência dos polimorfismos e os fatores prognósticos, tais como:

- a) Nível de PSA
- b) Escore de Gleason
- c) Estadiamento patológico
- d) Recidiva bioquímica

3 MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foram selecionados 185 pacientes diagnosticados com CaP que foram submetidos a prostatectomia radical de 1997 a 2011, com média de idade de 60,2 anos, que são acompanhados na clínica particular do Prof. Dr. Miguel Srougi. O seguimento foi realizado com PSA semestral nos primeiros 5 anos e, após esse período, anualmente. Esses pacientes foram subdivididos em dois grupos de acordo com o histórico familiar, onde foram classificados como: a) indivíduo com CaP com histórico familiar (n=72) e b) indivíduo com CaP esporádico (n=97). O critério de inclusão do primeiro grupo foi o paciente ter dois parentes de primeiro grau afetados.

O grupo controle foi composto por 70 pacientes que não possuíam CaP, com média de idade de 67,2 anos. Estes homens foram acompanhados no Ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pelo grupo da próstata, onde realizavam acompanhamento periódico com intuito preventivo. Os critérios de inclusão deste grupo foram: PSA abaixo de 2,5 ng/mL, exame digital da próstata normal e não possuir histórico familiar de CaP. A comparação entre os casos e controles estão melhores descritos em nossos resultados.

O escore de Gleason, o valor de PSA e o estadiamento patológico TNM 2010 foram utilizados como fatores prognósticos. Para análise do

estadiamento patológico foi considerado doença órgão confinado (pT2) ou não órgão confinado (pT3). No estudo, o escore de Gleason foi subdividido de duas formas: doença de baixo ou alto grau (escore de Gleason ≤ 6 e ≥ 7 , respectivamente) e baixo, intermediário e alto grau (escore de Gleason ≤ 6 , 7 e > 8 , respectivamente). O nível de PSA pré-operatório foi utilizado para identificar os pacientes com baixo (≤ 10 ng/mL) ou alto risco (≥ 10 ng/mL) de recorrência da doença. O tempo de seguimento médio foi de 60 meses, considerando recorrência bioquímica quando o nível de PSA $> 0,2$ ng/mL.

O sangue dos pacientes com CaP foi coletado por uma enfermeira na clínica particular e enviado para o Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia (LIM55) da FMUSP. O sangue do grupo controle foi coletado no Ambulatório de Urologia do HC-FMUSP e também encaminhado para o LIM55. Além do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A), os pacientes também preencheram um questionário (Anexo B) referente a histórico detalhado de câncer na família. As amostras de sangue, com volume aproximado de 2 mL, foram coletadas em um tubo a vácuo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e estocadas em freezer a -20°C até o processamento.

Foram selecionados 20 polimorfismos (Quadro 3), que foram avaliados através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR), e comparado a frequência dos genótipos para cada um dos polimorfismos entre os pacientes do grupo com CaP e o controle. A seleção dos SNPs relacionados a hereditariedade foi baseada na metanálise realizada por Liu *et al.*⁴⁹.

Quadro 3 - Polimorfismos avaliados em pacientes diagnosticados com CaP com herança mendeliana comparados a indivíduos saudáveis

Alteração	Região	Alelo	Alteração	Região	Alelo
rs10090154	8q24	C/T	rs5945619	NUDT11	T/C
rs1016343	8q24	C/T	rs620861	8q24	C/T
rs1859962	17q24.3	T/G	rs6501455	17q24.3	T/A
rs1447295	8q24	C/A	rs6983267	8q24	G/T
rs16901979	8q24	C/A	rs6983561	8q24	A/C
rs2660753	3P12.1	T/G	rs7000448	8q24	G/A
rs2710646	EHBP1	C/T	rs7214479	17q24.3	C/T
rs3760511	17q12	C/A	rs7920517	MSMB	A/G
rs4242382	8q24	T/C	rs7931342	11q13.2	G/T
rs4962416	CTBP2	A/G			
rs983085	17q24.3	A/C			

3.2 Extração de DNA

Para análise dos polimorfismos, primeiramente foi feita a extração de DNA das amostras enviadas, utilizando o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Para execução deste método, as amostras foram equilibradas a temperatura ambiente e a quantidade de 200 µL foi retirada de cada uma delas para extração. A esse volume foram adicionados 20 µL de protease, e posteriormente 200 µL de solução de lise (Buffer AL). As amostras foram então incubadas a 56°C por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados e foram adicionados 200 µL de etanol (96% - 100%) e as amostras foram agitadas e centrifugadas. A mistura desse passo foi então transferida para

um novo tubo contendo uma coluna fornecida pelo kit e as amostras foram centrifugadas para passagem da mistura pela coluna. O filtrado foi então descartado e foram realizadas etapas de lavagem da coluna com 500 µL das soluções Buffer AW1 e Buffer AW2, respectivamente. Após as lavagens, as colunas foram transferidas para um novo tubo, onde foram adicionados 200 µL da solução de eluição (Buffer AE), incubadas a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugadas. A pureza e concentração do DNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilmington, EUA) (260 nM/280 nM).

3.3 Análise de Expressão de Genes por PCR em Tempo Real Quantitativo

Foi realizada a análise da detecção dos polimorfismos por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) de 255 amostras (pacientes), sendo 185 diagnosticados com CaP e 70 controles. Utilizou-se a técnica de identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos (Taqman®) (Figura 1), amplificação pela PCR e análise em tempo real.

Nessa abordagem foram desenhados oligonucleotídeos flanqueando a região polimórfica para amplificação dos produtos por PCR, além de duas sondas que se anelam sobre uma pequena sequência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos. Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*.

Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye reporters* e os *quencher*s impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye reporter* e a emissão de fluorescência. Como apenas a sonda específica para um determinado alelo é capaz de se ligar a ele, apenas a fluorescência emitida por ela será detectada. Como cada sonda é marcada com uma fluorescência diferente, através da leitura da fluorescência emitida é possível determinar o genótipo da amostra. É importante citar que além do *dye reporter* e da molécula *quencher*, uma molécula denominada *Minor Groove Binder* (MGB) também está afixada à sonda, tendo a função de elevar a sua temperatura de anelamento, permitindo uma ligação mais específica, e evitando que ela se ligue inespecificamente à sequência correspondente ao outro alelo.

A detecção da fluorescência emitida na reação é feita por uma câmera CCD localizada no aparelho ABI7500 (Applied Biosystems), capaz de detectar diferentes comprimentos de onda e os genótipos são determinados de acordo com o perfil de emissão das fluorescências ao final da reação de PCR. Os oligos e sondas foram preparados pela empresa Applied Biosystems. Para amplificação dos fragmentos desejados foi utilizado as seguintes condições de reação: 5,0 μL do Master Mix TaqMan (contendo a sonda marcada), 0,25 μL de primer específico de cada polimorfismo, 2,75 μL de água destilada e 2,0 μL de DNA, somando um total de 10 μL para cada reação. Para amplificação as amostras foram submetidas a 40 ciclos de 95°C por 15" e 60°C por 1', precedidos por 2' a

50°C, e 10' a 95°C. O produto foi então analisado por PCR em tempo real, que faz a discriminação alélica através da emissão de luz em um comprimento de onda característico.

Figura 1 - Sistema Taqman®: identificação da base com uso de sondas marcadas com fluoróforos. Nesta abordagem além do primer são desenhadas um par de sondas que se anelam sobre uma pequena sequência de nucleotídeos que contém o polimorfismo, sendo cada uma específica para um dos alelos descritos (polimórfico e tipo selvagem). Em uma das extremidades de cada sonda está fixada uma molécula fluorescente (*dye reporter*), e na outra uma molécula não fluorescente, denominada *quencher*. Enquanto as sondas estão intactas, a interação entre os *dye reporters* e os *quenchers* impede que a fluorescência seja emitida. Durante a reação de PCR, a Taq DNA polimerase, por sua ação exonucleásica, quebra a sonda ligada ao fragmento, causando a liberação do *dye repórter* e a emissão de fluorescência

3.4 Análise Estatística

A verificação do grau de significância da comparação entre as frequências observada e esperada nos grupos controle e de pacientes com CaP foi feita pelo teste de qui-quadrado (χ^2).

Foram analisados 185 pacientes com CaP e 70 pacientes controle sem CaP. A frequência de 20 polimorfismos foi avaliada entre estes dois grupos, além disso, foram feitas análises dentro do grupo de pacientes com CaP, analisando a hereditariedade e também fatores prognósticos (PSA pré-operatório, estadiamento patológico, Gleason da peça cirúrgica). Realizou-se, ainda, uma análise dos polimorfismos com a recidiva bioquímica dos pacientes, considerando presente quando PSA pós tratamento foi maior que 0,2 ng/mL, e foram construídas curvas de sobrevida livre de recidiva (Kaplan-Meier). Por último, foi avaliada a força de associação entre cada um dos polimorfismos e o grupo através do cálculo de OR e seu respectivo intervalo de confiança a 95% (IC95%).

As análises estatísticas foram realizadas no *software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) 19.0 for Windows, e em toda a análise foi adotado um p significativo quando menor ou igual a 0,05.

3.5 Ética

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram identificadas e codificadas, garantindo sua confidencialidade. Este projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisas do HC-FMUSP, tendo sido aprovado na reunião de 05/02/2014 sob o protocolo nº 477/11 (Anexo C) e apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o protocolo 2012/19258-5.

4 RESULTADOS

Foi comparada a frequência dos genótipos para cada um dos 20 polimorfismos entre os 185 pacientes com câncer de próstata e os 70 pacientes do grupo controle, pela técnica de PCR. A Tabela 1 mostra as características clínicas dos pacientes analisados.

Tabela 1 - Características clínico-patológicas dos 185 pacientes com CaP e dos 70 indivíduos do grupo controle

	Casos CaP (n = 185) Média (Desvio-padrão)	Controles (n = 70) Média (Desvio- padrão)	p
Idade (anos)	60,23 (8,05)	67,24 (8,87)	0,00
PSA (ng/mL)	8,38 (11,20)	1,17 (0,82)	0,00
Volume da próstata (gramas)	40,92 (16,39)	34,62 (13,67)	0,00

CaP: Câncer de próstata; PSA: Antígeno prostático específico

Para melhor compreensão dos resultados os genótipos estão apresentados nas tabelas da seguinte forma: os primeiros resultados se referem ao genótipo homozigoto selvagem, o segundo ao genótipo homozigoto polimórfico e o terceiro ao genótipo heterozigoto.

A primeira análise compara todos os pacientes com CaP e o controle, sendo observado uma associação com relação ao polimorfismo rs2660753 e o CaP. A presença do genótipo homozigoto selvagem foi maior nos pacientes com CaP (62,3%) quando comparado com os pacientes sem o diagnóstico desta neoplasia (45,5%) ($p=0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos nos pacientes diagnosticados com CaP e nos indivíduos do grupo controle

Alteração (ensaio)	Genótipo	CaP (n=185)	Controle (n=70)	p
rs4242382	GG*	36,4%	43,9%	0,32
	AA	48,8%	37,9%	
	GA	14,8%	18,2%	
rs10090154	CC*	80,0%	79,1%	0,97
	TT	1,2%	1,5%	
	CT	18,8%	19,4%	
rs1016343	CC*	77,4%	84,1%	0,43
	TT	4,4%	1,6%	
	CT	18,2%	14,3%	
rs1447295	CC*	43,2%	40,9%	0,94
	AA	39,6%	40,9%	
	CA	17,2%	18,2%	
rs16901979	CC*	64,7%	58,8%	0,65
	AA	30,6%	32,4%	
	CA	4,7%	8,8%	
rs2660753	CC*	62,3%	45,5%	0,05
	TT	4,6%	4,5%	
	CT	33,1%	50,0%	
rs2710646	CC*	35,8%	41,2%	0,17
	AA	38,2%	44,1%	
	CA	26,0%	14,7%	
rs3760511	TT*	8,6%	6,0%	0,79
	GG	7,4%	7,5%	
	TG	84,0%	86,6%	
rs4962416	TT*	12,0%	13,4%	0,87
	CC	12,7%	10,4%	
	TC	75,3%	76,1%	
rs5945619	TT*	7,8%	6,7%	0,12
	CC	4,2%	11,7%	
	TC	88,0%	81,7%	

Continua

				Conclusão
Alteração (ensaio)	Genótipo	CaP (n=185)	Controle (n=70)	p
rs620861	CC*	27,4%	22,4%	0,69
	TT	32,6%	32,8%	
	CT	40,0%	44,8%	
rs6501455	GG*	30,9%	25,0%	0,25
	AA	16,8%	26,7%	
	GA	52,3%	48,3%	
rs6983267	GG*	6,8%	3,1%	0,44
	TT	0,6%	1,5%	
	GT	92,6%	95,4%	
rs6983561	AA*	81,0%	82,5%	0,93
	CC	1,3%	1,6%	
	AC	17,7%	15,9%	
rs7000448	GG*	29,8%	28,4%	0,06
	AA	14,6%	4,5%	
	GA	55,6%	67,2%	
rs7214479	CC*	1,1%	0	0,68
	TT	3,4%	3,1%	
	CT	95,5%	96,9%	
rs7920517	AA*	6,8%	2,9%	0,40
	GG	28,2%	25,0%	
	AG	65,0%	72,1%	
rs7931342	GG*	27,3%	29,4%	0,88
	TT	5,7%	4,4%	
	GT	67,0%	66,2%	
rs983085	AA*	36,0%	29,4%	0,19
	GG	17,7%	27,9%	
	AG	46,3%	42,6%	
rs1859962	TT*	18,8%	10,9%	0,25
	GG	11,9%	17,2%	
	TG	69,3%	71,9%	

CaP: Câncer de próstata

*Homozigoto selvagem

Foi avaliada também a frequência dos genótipos comparando os pacientes diagnosticados com CaP familiar (n= 72) com os indivíduos que possuem CaP esporádico (n= 97). Houveram 16 pacientes que não souberam responder esta questão e, portanto, foram excluídos desta análise. A Tabela 3 mostra a comparação das características clínico-patológicas entre os pacientes com CaP esporádico e familiar.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos pacientes com CaP esporádico e familiar

Características	CaP esporádico (n=97) Média (Desvio-padrão)	CaP familiar (n=72) Média (Desvio-padrão)	p
Idade de diagnóstico (anos)	59,90 (8,07)	60,35 (8,37)	0,73
PSA pré-operatório (ng/mL)	8,13 (8,59)	9,7 (17,33)	0,43
Escore de Gleason – n (%)			
≤ 6	22 (25,6%)	15 (26,3%)	0,63
7	29 (33,7%)	23 (40,4%)	
8-10	35 (40,7%)	19 (33,3%)	
Estadiamento patológico n (%)			
pT2	62 (78,5%)	48 (82,8%)	0,53
pT3	17 (21,5%)	10 (17,2%)	
Recidiva bioquímica n (%)			
Não	66 (75%)	46 (79,3%)	0,54
Sim	22 (25%)	12 (20,7%)	

CaP: Câncer de próstata; PSA: Antígeno prostático específico

Nesta comparação, foi encontrado uma associação significativa em relação ao SNP rs7931342 onde o genótipo homozigoto polimórfico foi cinco vezes mais presente nos pacientes que possuíam CaP hereditário quando comparado aos indivíduos com CaP esporádico (p=0,01). Outro SNP que mostrou relevância foi o rs10090154, onde foi evidenciado o genótipo

homozigoto polimórfico e heterozigoto foi mais frequente nesse grupo ($p=0,03$). Os demais polimorfismos não apresentaram significância estatística considerando a hereditariedade desta neoplasia (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos nos pacientes diagnosticados com CaP esporádico e hereditário

Alteração	Genótipo	Pacientes portadores de CaP esporádico (n=97)	Pacientes portadores de CaP hereditário (n=72)	p
rs4242382	GG*	42,9%	32,4%	0,29
	AA	45,2%	48,5%	
	GA	11,9%	19,1%	
rs10090154	CC*	86,0%	71,6%	0,03
	TT	0	3,0%	
	CT	14,0%	25,4%	
rs1016343	CC*	74,1%	81,3%	0,54
	TT	5,9%	3,1%	
	CT	20,0%	15,6%	
rs1447295	CC*	49,4%	40,0%	0,48
	AA	33,7%	41,4%	
	CA	16,9%	18,6%	
rs16901979	CC*	73,3%	57,9%	0,31
	AA	22,2%	36,8%	
	CA	4,4%	5,3%	
rs2660753	CC*	59,6%	64,8%	0,77
	TT	4,3%	4,2%	
	CT	36,2%	31,0%	
rs2710646	CC*	41,7%	30,9%	0,17
	AA	30,2%	44,1%	
	CA	28,1%	25,0%	
rs3760511	TT*	8,4%	8,6%	0,34
	GG	5,3%	11,4%	
	TG	86,3%	80,0%	
rs4962416	TT*	13,2%	12,3%	0,42
	CC	14,3%	7,7%	
	TC	72,5%	80,0%	

Continua

				Conclusão
Alteração	Genótipo	Pacientes portadores de CaP esporádico (n=97)	Pacientes portadores de CaP hereditário (n=72)	p
rs5945619	TT*	9,8%	4,4%	0,34
	CC	3,3%	5,9%	
	TC	87,0%	89,7%	
rs620861	CC*	27,1%	27,5%	0,51
	TT	35,4%	27,5%	
	CT	37,5%	44,9%	
rs6501455	GG*	33,3%	29,8%	0,45
	AA	13,1%	21,1%	
	GA	53,6%	49,1%	
rs6983267	GG*	8,1%	6,1%	0,59
	TT	1,2%	0	
	GT	90,7%	93,9%	
rs6983561	AA*	79,1%	83,1%	0,77
	CC	1,2%	1,5%	
	AC	19,8%	15,4%	
rs7000448	GG*	24,7%	39,4%	0,10
	AA	17,5%	11,3%	
	GA	57,7%	49,3%	
rs7214479	CC*	1,0%	1,4%	0,14
	TT	5,2%	0	
	CT	93,8%	98,6%	
rs7920517	AA*	7,3%	5,6%	0,77
	GG	30,2%	26,8%	
	AG	62,5%	67,6%	
rs7931342	GG*	24,2%	32,4%	0,01
	TT	2,1%	11,3%	
	GT	73,7%	56,3%	
rs983085	AA*	36,6%	36,1%	0,99
	GG	17,2%	18,1%	
	AG	46,2%	45,8%	
rs1859962	TT*	18,1%	20,8%	0,69
	GG	13,8%	9,7%	
	TG	68,1%	69,4%	

CaP: Câncer de próstata

*Homozigoto selvagem

Como dito anteriormente os pacientes foram subdivididos de acordo com os fatores prognósticos clássicos do CaP. Inicialmente subdividimos os pacientes de acordo com os níveis de PSA pré operatório em dois grupos que foram pacientes com PSA < 10 ng/mL e pacientes com PSA ≥ 10 ng/mL, Nesta comparação foi encontrado significância do ponto de vista estatístico apenas para o SNP rs6983267, curiosamente a grande maioria dos pacientes independentemente do nível de PSA apresentaram genótipo heterozigoto, entretanto 4,2% dos pacientes com nível de PSA pré operatório ≥ 10 ng/mL apresentaram genótipo homozigoto polimórfico e nenhum apresentou genótipo homozigoto selvagem, enquanto no grupo com PSA < 10 ng/mL, 8,1% dos pacientes apresentaram genótipo homozigoto selvagem e nenhum foi detectado com genótipo homozigoto polimórfico (p= 0,02) (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação ao nível de PSA

Alteração	Genótipo	PSA < 10 ng/mL (n=136)	PSA ≥ 10 ng/mL (n=26)	p
rs4242382	GG*	36,7%	41,7%	0,79
	AA	49,2%	41,7%	
	GA	14,1%	16,7%	
rs10090154	CC*	81,3%	81,5%	0,80
	TT	1,5%	0	
	CT	17,2%	18,5%	
rs1016343	CC*	80,2%	66,7%	0,10
	TT	3,2%	12,5%	
	CT	16,7%	20,8%	
rs1447295	CC*	45,2%	42,3%	0,84
	AA	40,0%	38,5%	
	CA	14,8%	19,2%	
rs16901979	CC*	66,2%	70,0%	0,64
	AA	29,6%	20,0%	
	CA	4,2%	10,0%	
rs2660753	CC*	64,3%	55,6%	0,62
	TT	4,3%	7,4%	
	CT	31,4%	37,0%	
rs2710646	CC*	37,0%	38,5%	0,86
	AA	39,9%	34,6%	
	CA	23,2%	26,9%	
rs3760511	TT*	8,6%	8,0%	0,78
	GG	7,9%	4,0%	
	TG	83,6%	88,0%	
rs4962416	TT*	12,2%	7,7%	0,77
	CC	13,0%	11,5%	
	TC	74,8%	80,8%	
rs5945619	TT*	9,1%	4,0%	0,47
	CC	3,8%	8,0%	
	TC	87,1%	88,0%	

Continua

Alteração	Genótipo	PSA < 10 ng/mL (n=136)	PSA ≥ 10 ng/mL (n=26)	Conclusão
				p
rs620861	CC*	25,7%	36,0%	0,18
	TT	30,7%	40,0%	
	CT	43,6%	24,9%	
rs6501455	GG*	31,6%	29,2%	0,96
	AA	15,4%	16,7%	
	GA	53,0%	54,2%	
rs6983267	GG*	8,1%	0	0,02
	TT	0	4,2%	
	GT	91,5%	95,8%	
rs6983561	AA*	81,6%	79,2%	0,74
	CC	1,6%	0	
	AC	16,8%	20,8%	
rs7000448	GG*	30,5%	29,6%	0,99
	AA	14,2%	14,8%	
	GA	55,3%	55,6%	
rs7214479	CC*	0,7%	0	0,90
	TT	3,5%	3,7%	
	CT	95,8%	96,3%	
rs7920517	AA*	6,3%	11,5%	0,51
	GG	26,1%	30,8%	
	AG	67,6%	57,7%	
rs7931342	GG*	25,2%	33,3%	0,62
	TT	6,5%	3,7%	
	GT	68,3%	63,0%	
rs983085	AA*	32,9%	38,5%	0,76
	GG	17,1%	19,2%	
	AG	50,0%	42,3%	
rs1859962	TT*	18,7%	14,8%	0,73
	GG	10,8%	7,4%	
	TG	70,5%	77,8%	

PSA: Antígeno prostático específico

*Homozigoto selvagem

Considerando o escore de Gleason subdividimos os pacientes de duas formas, primeiro em dois grupos sendo que o primeiro incluía pacientes com Gleason ≤ 6 e Gleason 7-10, e na subdivisão seguinte os pacientes foram divididos em três grupos que são: Gleason 5-6, *versus* Gleason 7 *versus* Gleason 8-10.

Com relação ao SNP rs620861, foi encontrada uma frequência de 20,9% do genótipo homozigoto polimórfico nos pacientes com alto escore de Gleason, enquanto que nos pacientes com baixo escore de Gleason esta frequência foi de 13,3% ($p= 0,03$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação ao escore de Gleason (6, 7-10)

Alteração	Genótipo	Gleason 6 (n=30)	Gleason 7-10 (n=120)	p
rs4242382	GG*	91,7%	70,0%	0,26
	AA	0	13,3%	
	GA	8,3%	16,7%	
rs10090154	CC*	80,0%	77,3%	0,81
	TT	0	0	
	CT	20%	22,7%	
rs1016343	CC*	76,9%	80,0%	0,58
	TT	0	5,0%	
	CT	23,1%	15,0%	
rs1447295	CC*	86,7%	85,9%	0,88
	AA	0	1,6%	
	CA	13,3%	12,5%	
rs16901979	CC*	100%	95,3%	0,46
	AA	0	0	
	CA	0	4,7%	
rs2660753	CC*	71,4%	61,2%	0,76
	TT	7,1%	9,0%	
	CT	21,4%	29,9%	
rs2710646	CC*	57,1%	69,7%	0,11
	AA	0	10,6%	
	CA	42,9%	19,7%	
rs3760511	TT*	0	7,4%	0,47
	GG	20,0%	13,2%	
	TG	80,0%	79,4%	
rs4962416	TT*	15,4%	10,8%	0,43
	CC	0	10,8%	
	TC	84,6%	78,5%	
rs5945619	TT*	6,7%	4,5%	0,67
	CC	0	4,5%	
	TC	93,3%	91,0%	

Continua

Alteração	Genótipo	Gleason 6 (n=30)	Gleason 7-10 (n=120)	Conclusão
				p
rs620861	CC*	66,7%	31,3%	0,03
	TT	13,3%	20,9%	
	CT	20,0%	47,8%	
rs6501455	GG*	7,7%	33,9%	0,16
	AA	23,1%	17,9%	
	GA	69,2%	48,2%	
rs6983267	GG*	16,7%	4,5%	0,26
	TT	0	1,5%	
	GT	83,3%	93,9%	
rs6983561	AA*	61,5%	77,3%	0,06
	CC	7,7%	0	
	AC	30,8%	22,7%	
rs7000448	GG*	20,0%	31,3%	0,53
	AA	26,7%	16,4%	
	GA	53,3%	52,2%	
rs7214479	CC*	6,7%	1,5%	0,23
	TT	0	0	
	CT	93,3%	98,5%	
rs7920517	AA*	6,7%	13,2%	0,74
	GG	20,0%	22,1%	
	AG	73,3%	64,7%	
rs7931342	GG*	35,7%	28,8%	0,42
	TT	0	10,6%	
	GT	64,3%	60,6%	
rs983085	AA*	20,0%	27,3%	0,07
	GG	6,7%	30,3%	
	AG	73,3%	42,4%	
rs1859962	TT*	0	7,4%	0,44
	GG	26,7%	17,6%	
	TG	73,3%	75,0%	

*Homozigoto Selvagem

Em uma segunda análise do escore de Gleason, foi considerado pacientes com grau 7 como um grupo a parte e então subdividimos os pacientes em três grupos.

Considerando o SNP rs620861, encontrou-se uma associação significativa do ponto de vista estatístico, onde o genótipo homozigoto selvagem foi mais frequente em pacientes com Gleason de baixo grau (5-6), enquanto o genótipo homozigoto polimórfico foi mais frequente nos pacientes com Gleason de alto grau (8-10) ($p= 0,04$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação ao escore de Gleason (6, 7, 8-10)

Alteração	Genótipo	Gleason 6 (n=30)	Gleason 7 (n=68)	Gleason 8-10 (n=52)	p
rs4242382	GG*	91,7%	70,4%	69,7%	0,55
	AA	0	11,1%	15,2%	
	GA	8,3%	18,5%	15,2%	
rs10090154	CC*	80,0%	65,5%	86,5%	0,12
	TT	0	0	0	
	CT	20,0%	34,5%	13,5%	
rs1016343	CC*	76,9%	76,9%	82,4%	0,77
	TT	0	3,8%	5,9%	
	CT	23,1%	19,2%	11,8%	
rs1447295	CC*	86,7%	79,3%	91,4%	0,56
	AA	0	3,4%	0	
	CA	13,3%	17,2%	8,6%	
rs16901979	CC*	100%	94,7%	95,8%	0,75
	AA	0	0	0	
	CA	0	5,3%	4,2%	
rs2660753	CC*	71,4%	65,5%	57,9%	0,90
	TT	7,1%	6,9%	10,5%	
	CT	21,4%	27,6%	31,6%	
rs2710646	CC*	57,1%	75,0%	65,8%	0,27
	AA	0	10,7%	10,5%	
	CA	42,9%	14,3%	23,7%	
rs3760511	TT*	0	3,3%	10,5%	0,49
	GG	20,0%	16,7%	10,5%	
	TG	80,0%	80,0%	78,9%	
rs4962416	TT*	15,4%	17,9%	5,4%	0,39
	CC	0	10,7%	10,8%	
	TC	84,6%	71,4%	83,8%	
rs5945619	TT*	6,7%	3,3%	5,4%	0,23
	CC	0	10,0%	0	
	TC	93,3%	86,7%	94,6%	

Continua

Alteração	Genótipo				Conclusão
		Gleason 6 (n=30)	Gleason 7 (n=68)	Gleason 8-10 (n=52)	p
rs620861	CC*	66,7%	23,3%	37,8%	0,04
	TT	13,3%	16,7%	24,3%	
	CT	20,0%	60,0%	37,8%	
rs6501455	GG*	7,7%	25,0%	40,6%	0,20
	AA	23,1%	25,0%	12,5%	
	GA	69,2%	50,0%	46,9%	
rs6983267	GG*	16,7%	6,7%	2,8%	0,40
	TT	0	0	2,8%	
	GT	83,3%	93,3%	94,4%	
rs6983561	AA*	61,5%	79,3%	75,7%	0,21
	CC	7,7%	0	0	
	AC	30,8%	20,7%	24,3%	
rs7000448	GG*	20,0%	44,8%	21,1%	0,20
	AA	26,7%	10,3%	21,1%	
	GA	53,3%	44,8%	57,9%	
rs7214479	CC*	0	0	0	0,38
	TT	6,7%	0	2,6%	
	CT	93,3%	100%	97,4%	
rs7920517	AA*	6,7%	16,7%	10,5%	0,75
	GG	20,0%	16,7%	26,3%	
	AG	73,3%	66,7%	63,2%	
rs7931342	GG*	35,7%	39,3%	211%	0,33
	TT	0	7,1%	13,2%	
	GT	64,3%	53,6%	65,8%	
rs983085	AA*	20,0%	35,7%	21,1%	0,12
	GG	6,7%	25,0%	34,2%	
	AG	73,3%	39,3%	44,7%	
rs1859962	TT*	0	6,7%	7,9%	0,78
	GG	26,7%	16,7%	18,4%	
	TG	73,3%	76,7%	73,7%	

*Homozigoto selvagem

Os pacientes foram subdivididos também de acordo com o estadiamento patológico, neste caso foram divididos em tumores pT2 (órgão confinado) e tumores pT3 (não órgão confinado). Nesta análise foi encontrada significância estatística apenas para o SNP rs1447295, embora o genótipo homozigoto selvagem tenha sido mais frequente tanto nos tumores localmente avançados como nos localizados, ele foi mais presente nos tumores pT3, enquanto o homozigoto polimórfico foi mais presente nos tumores pT2 ($p=0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação ao estadiamento patológico

Alteração	Genótipo	pT2 (n=119)	pT3 (n=27)	p
rs4242382	GG*	38,3%	45,8%	0,35
	AA	48,6%	33,3%	
	GA	13,1%	20,8%	
rs10090154	CC*	81,3%	76,9%	0,62
	TT	1,8%	0	
	CT	17,0%	23,1%	
rs1016343	CC*	75,7%	90,9%	0,26
	TT	3,7%	0	
	CT	20,6%	9,1%	
rs1447295	CC*	43,9%	64,0%	0,05
	AA	41,2%	16,0%	
	CA	14,9%	20,0%	
rs16901979	CC*	67,2%	68,8%	0,75
	AA	29,3%	31,3%	
	CA	3,4%	0	
rs2660753	CC*	60,7%	59,3%	0,92
	TT	5,1%	3,7%	
	CT	34,2%	37,0%	
rs2710646	CC*	38,5%	48,0%	0,53
	AA	35,9%	36,0%	
	CA	25,6%	16,0%	
rs3760511	TT*	7,7%	3,7%	0,75
	GG	7,7%	7,4%	
	TG	84,6%	88,9%	
rs4962416	TT*	12,6%	7,7%	0,56
	CC	12,6%	7,7%	
	TC	74,8%	84,6%	
rs5945619	TT*	9,2%	11,1%	0,95
	CC	3,7%	3,7%	
	TC	87,2%	85,2%	

Continua

Alteração	Genótipo	pT2 (n=119)	pT3 (n=27)	Conclusão p
rs620861	CC*	28,0%	25,9%	0,90
	TT	32,2%	29,6%	
	CT	39,8%	44,4%	
rs6501455	GG*	30,3%	26,1%	0,17
	AA	18,2%	4,3%	
	GA	51,5%	69,6%	
rs6983267	GG*	8,3%	4,0%	0,45
	TT	0	0	
	GT	91,5%	96,0%	
rs6983561	AA*	80,0%	91,7%	0,38
	CC	1,9%	0	
	AC	18,1%	8,3%	
rs7000448	GG*	32,2%	29,6%	0,42
	AA	16,1%	7,4%	
	GA	51,7%	63,0%	
rs7214479	CC*	0,8%	0	0,43
	TT	5,0%	0	
	CT	94,1%	100%	
rs7920517	AA*	9,2%	3,7%	0,58
	GG	24,4%	29,6%	
	AG	66,4%	66,7%	
rs7931342	GG*	28,4%	14,8%	0,21
	TT	7,8%	3,7%	
	GT	63,8%	81,5%	
rs983085	AA*	32,5%	29,6%	0,88
	GG	17,1%	14,8%	
	AG	50,4%	55,6%	
rs1859962	TT*	19,0%	11,1%	0,50
	GG	9,5%	14,8%	
	TG	71,6%	74,1%	

*Homozigoto selvagem

A presença ou ausência de recidiva bioquímica também foram avaliadas. Neste caso 34 pacientes apresentaram recidiva bioquímica e 121 pacientes não apresentaram. Nesta análise, o polimorfismo rs1447295 foi associado a pacientes que não apresentaram recidiva bioquímica, neste caso 71% dos pacientes com recidiva bioquímica apresentaram genótipo homozigoto selvagem enquanto 39,3% e 17,9% dos pacientes sem recidiva bioquímica eram homozigoto polimórfico ou heterozigoto ($p= 0,01$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição dos genótipos de 20 polimorfismos em relação à recidiva bioquímica

Alteração	Genótipo	Sem recidiva bioquímica (n=121)	Com recidiva bioquímica (n=34)	p
rs4242382	GG*	36,1%	54,8%	0,15
	AA	50,0%	32,3%	
	GA	13,9%	12,9%	
rs10090154	CC*	78,9%	90,9%	0,27
	TT	1,8%	0	
	CT	19,3%	9,1%	
rs1016343	CC*	79,1%	80,8%	0,52
	TT	4,5%	0	
	CT	16,4%	19,2%	
rs1447295	CC*	42,7%	71,0%	0,01
	AA	39,3%	22,6%	
	CA	17,9%	6,5%	
rs16901979	CC*	66,7%	77,8%	0,06
	AA	31,7%	11,1%	
	CA	1,7%	11,1%	
rs2660753	CC*	60,8%	66,7%	0,74
	TT	5,8%	3,0%	
	CT	33,3%	30,3%	
rs2710646	CC*	36,4%	48,5%	0,45
	AA	36,4%	30,3%	
	CA	27,1%	21,2%	
rs3760511	TT*	8,3%	3,1%	0,53
	GG	8,3%	6,3%	
	TG	83,3%	90,6%	
rs4962416	TT*	11,6%	15,2%	0,53
	CC	12,5%	6,1%	
	TC	75,9%	78,8%	
rs5945619	TT*	10,6%	3,0%	0,12
	CC	2,7%	9,1%	
	TC	86,7%	87,9%	

Continua

				Conclusão
Alteração	Genótipo	Sem recidiva bioquímica (n=121)	Com recidiva bioquímica (n=34)	p
rs620861	CC*	27,5%	30,3%	0,56
	TT	29,2%	36,4%	
	CT	43,3%	33,3%	
rs6501455	GG*	33,7%	25,8%	0,68
	AA	15,3%	19,4%	
	GA	51,0%	54,8%	
rs6983267	GG*	6,4%	12,1%	0,10
	TT	0	3,0%	
	GT	93,6%	84,8%	
rs6983561	AA*	83,0%	75,0%	0,47
	CC	0,9%	3,1%	
	AC	16,0%	221,9	
rs7000448	GG*	31,7%	26,5%	0,56
	AA	16,7%	11,8%	
	GA	51,7%	61,8%	
rs7214479	CC*	0	2,9%	0,16
	TT	4,1%	2,9%	
	CT	95,9%	94,1%	
rs7920517	AA*	7,4%	8,8%	0,93
	GG	28,9%	26,5%	
	AG	63,6%	64,7%	
rs7931342	GG*	28,0%	20,6%	0,42
	TT	6,8%	2,9%	
	GT	65,3%	76,5%	
rs983085	AA*	31,9%	33,3%	0,98
	GG	17,6%	18,2%	
	AG	50,4%	48,5%	
rs1859962	TT*	19,3%	11,8%	0,14
	GG	9,2%	20,6%	
	TG	71,4%	67,6%	

*Homozigoto selvagem

Uma análise secundária foi realizada, considerando apenas a presença ou ausência dos alelos polimórficos, aqui, agruparam-se os indivíduos com genótipo homozigoto polimórfico e heterozigoto em um só.

Na primeira análise foi avaliado se a presença ou ausência do alelo polimórfico aumenta a predisposição dos indivíduos ao desenvolvimento do CaP. Neste caso, foi encontrado que o polimorfismo rs2660753 aparece como tendo um efeito protetor ao desenvolvimento do CaP, pacientes sem CaP possuem o alelo polimórfico em 78,4% dos casos (OR=0,50) ($p=0,01$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição dos alelos dos genes dos 20 polimorfismos entre pacientes com CaP e grupo controle

Alteração	Alelo	Sem Câncer	Com Câncer	Odds Ratio (0/1)	p
rs4242382	G*	33,0%	26,4%	1,00	0,29
	A	67,0%	73,6%	1,36 [0,76 - 2,44]	
rs10090154	C*	27,9%	29,2%	1,00	0,86
	T	72,1%	70,8%	0,94 [0,46 - 1,88]	
rs1016343	C*	30,1%	21,7%	1,00	0,26
	T	69,9%	78,3%	1,55 [0,71 - 3,35]	
rs1447295	C*	27,0%	28,9%	1,00	0,75
	A	73,0%	71,1%	0,91 [0,51 - 1,62]	
rs16901979	C*	27,0%	31,1%	1,00	0,63
	A	73,0%	68,9%	0,82 [0,36 - 1,85]	
rs2660753	C*	21,6%	35,3%	1,00	0,01
	T	78,4%	64,7%	0,50 [0,28 - 0,89]	
rs2710646	C*	31,1%	26,5%	1,00	0,44
	A	68,9%	73,5%	1,25 [0,70 - 2,22]	
rs3760511	T*	21,1%	28,3%	1,00	0,50
	G	78,9%	71,7%	0,67 [0,21 - 2,11]	
rs4962416	T*	31,0%	28,4%	1,00	0,77
	C	69,0%	71,6%	1,13 [0,48 - 2,63]	
rs5945619	T*	23,5%	26,8%	1,00	0,76
	C	76,5%	73,2%	0,84 [0,26 - 2,68]	
rs620861	C*	23,8%	29,1%	1,00	0,42
	T	76,2%	70,9%	0,76 [0,39 - 1,48]	
rs6501455	G*	24,6%	30,4%	1,00	0,39
	A	75,4%	69,6%	0,74 [0,37 - 1,47]	
rs6983267	G*	15,4%	29,4%	1,00	0,27
	T	84,6%	70,6%	0,43 [0,09 - 2,02]	

Continua

					Conclusão
Alteração	Alelo	Sem Câncer	Com Câncer	Odds Ratio (0/1)	p
rs6983561					
	A*	28,9%	26,8%	1,00	0,79
	C	71,1%	73,2%	1,10 [0,51 - 2,37]	
rs7000448					
	G*	26,4%	27,7%	1,00	0,82
	A	73,6%	72,3%	0,93 [0,50 - 1,73]	
rs7214479					
	C*	0	26,9%	1,00	0,54
	T	100%	73,1%		
rs7920517					
	A*	14,3%	28,6%	1,00	0,24
	G	85,7%	71,4%	0,41 [0,09 - 1,91]	
rs7931342					
	G*	29,4%	27,3%	1,00	0,73
	T	70,6%	72,7%	1,11 [0,59 - 2,06]	
rs983085					
	A*	24,1%	30,0%	1,00	0,33
	G	75,9%	70,0%	0,74 [0,40 - 1,35]	
rs1859962					
	T*	17,1%	28,6%	1,00	0,12
	G	82,9%	71,4%	0,51 [0,21 - 1,22]	

*Alelo selvagem

Em uma segunda análise, avaliou-se também se a presença ou ausência do alelo polimórfico aumenta a chance dos indivíduos possuírem CaP hereditário. Considerando o SNP rs10090154, foi encontrado que os pacientes que possuem o alelo polimórfico em 61,3% dos casos possuem CaP hereditário, enquanto indivíduos que possuem o alelo selvagem em 62,8% dos casos possuem CaP esporádico, neste caso a presença do alelo polimórfico aumenta em duas vezes e meia a chance do indivíduo possuir CaP hereditário ($p=0,01$). Já para o polimorfismo rs7000448, foi encontrado que o alelo selvagem é mais frequente nos pacientes com CaP hereditário, enquanto o alelo polimórfico é mais frequente nos pacientes com CaP esporádico ($OR=0,5$) ($p=0,04$) (Tabela 11).

Tabela 11 - Distribuição dos alelos dos genes dos 20 polimorfismos entre em relação à hereditariedade

Alteração	Alelo	Esporádico	Hereditário	Odds Ratio (0/1)	p
rs4242382	G*	61,0%	51,6%	1	0,25
	A	39,0%	48,4%	1,46 [0,75 - 2,84]	
rs10090154	C*	62,8%	38,7%	1,00	0,01
	T	37,2%	61,3%	2,67 [1,19 - 5,98]	
rs1016343	C*	54,4%	65,7%	1,00	0,23
	T	45,6%	34,3%	0,62 [0,28 - 1,37]	
rs1447295	C*	61,1%	51,7%	1,00	0,23
	A	38,9%	48,3%	1,46 [0,77 - 2,76]	
rs16901979	C*	60,0%	42,9%	1,00	0,13
	A	40,0%	57,1%	2,00 [0,79 - 5,03]	
rs2660753	C*	54,9%	60,3%	1,00	0,49
	T	45,1%	39,7%	0,81 [0,42 - 1,51]	
rs2710646	C*	65,6%	54,4%	1,00	0,15
	A	34,4%	45,6%	1,59 [0,83 - 3,07]	
rs3760511	T*	53,8%	57,9%	1,00	0,77
	G	46,2%	42,1%	0,84 [0,27 - 2,64]	
rs4962416	T*	60,0%	58,1%	1,00	0,87
	C	40,0%	41,9%	1,08 [0,41 - 2,81]	
rs5945619	T*	75,0%	56,1%	1,00	0,20
	C	25,0%	43,9%	2,34 [0,61 - 9,03]	
rs620861	C*	57,8%	58,3%	1,00	0,94
	T	42,2%	41,7%	0,97 [0,48 - 1,95]	
rs6501455	G*	62,2%	58,3%	1,00	0,66
	A	37,8%	41,7%	1,17 [0,56 - 2,43]	
rs6983267	G*	83,3%	55,5%	1,00	0,17
	T	16,7%	44,5%	4,01 [0,45 - 35,20]	

Continua

					Conclusão
Alteração	Alelo	Esporádico	Hereditário	Odds Ratio (0/1)	p
rs6983561					
	A*	55,4%	63,3%	1,00	0,43
	C	44,6%	36,7%	0,71 [0,31 - 1,63]	
rs7000448					
	G*	46,2%	62,9%	1,00	0,04
	A	53,8%	37,1%	0,50 [0,26 - 0,98]	
rs7214479					
	C*	50,0%	57,2%	1,00	0,83
	T	50,0%	42,8%	0,74 [0,04 – 12,15]	
rs7920517					
	A*	63,6%	57,1%	1,00	0,66
	G	36,4%	42,9%	1,31 [0,37 - 4,68]	
rs7931342					
	G*	53,8%	57,9%	1,00	0,33
	T	46,2%	42,1%	0,84 [0,27 - 2,64]	
rs983085					
	A*	56,7%	56,2%	1,00	0,95
	G	43,3%	43,8%	1,02 [0,53 - 1,93]	
rs1859962					
	T*	53,1%	57,5%	1,00	0,65
	G	46,9%	42,5%	0,83 [0,38 - 1,82]	

*Alelo selvagem

Também foi analisada a presença ou ausência do alelo polimórfico com a recidiva bioquímica, considerando o polimorfismo rs 1447295, o alelo polimórfico foi mais frequente nos pacientes sem recidiva bioquímica, ou seja, a presença deste alelo oferece um efeito protetor a recidiva dos pacientes com CaP (OR=0,3) (p= 0,00). Para o SNP 7214479, 100% dos pacientes sem recidiva bioquímica possuem alelo polimórfico, enquanto 21,4% apenas dos pacientes com recidiva possuem o mesmo, entretanto neste caso não foi possível calcular o *odds ratios* (p=0,05) (Tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição dos alelos dos genes dos 20 polimorfismos entre em relação à recidiva bioquímica

Alteração	Alelo	Sem recidiva	Com recidiva	Odds Ratio for CPH2 (0/1)	p
rs4242382	G*	70,2%	82,9%	1,00	0,07
	A	29,8%	17,1%	0,48 [0,21 - 1,08]	
rs10090154	C*	75,2%	88,5%	1,00	0,14
	T	24,8%	11,5%	0,39 [0,11 - 1,41]	
rs1016343	C*	81,3%	79,3%	1,00	0,80
	T	18,7%	20,7%	1,13 [0,40 - 3,15]	
rs1447295	C*	69,4%	88,2%	1,00	0,00
	A	30,6%	11,8%	0,30 [0,12 - 0,72]	
rs16901979	C*	74,1%	83,3%	1,00	0,37
	A	25,9%	16,7%	0,57 [0,16 - 1,96]	
rs2660753	C*	76,8%	81,0%	1,00	0,54
	T	23,2%	19,0%	0,77 [0,34 - 1,74]	
rs2710646	C*	72,9%	81,5%	1,00	0,21
	A	27,1%	18,5%	0,60 [0,28 - 1,32]	
rs3760511	T*	90,0%	78,2%	1,00	0,37
	G	10,0%	21,8%	2,51 [0,30 - 20,60]	
rs4962416	T*	72,2%	78,0%	1,00	0,58
	C	27,8%	22,0%	0,73 [0,24 - 2,23]	
rs5945619	T*	92,3%	75,9%	1,00	0,17
	C	7,7%	24,1%	3,80 [0,47 - 30,38]	
rs620861	C*	76,7%	79,1%	1,00	0,75
	T	23,3%	20,9%	0,87 [0,37 - 2,02]	
rs6501455	G*	80,5%	73,9%	1,00	0,41
	A	19,5%	26,1%	1,46 [0,58 - 3,61]	
rs6983267	G*	50,0%	77,9%	1,00	0,11
	T	50,0%	22,1%	0,28 [0,05 - 1,47]	

Continua

					Conclusão
Alteração	Alelo	Sem recidiva	Com recidiva	Odds Ratio for CPH2 (0/1)	p
rs6983561	A*	79,3%	66,7%	1,00	0,16
	C	20,7%	33,3%	1,91 [0,76 - 4,81]	
rs7000448	G*	80,9%	76,6%	1,00	0,56
	A	19,1%	23,4%	1,28 [0,54 - 3,02]	
rs7214479	C*	0	78,6%	1,00	0,05
	T	100%	21,4%	*	
rs7920517	A*	75,0%	78,3%	1,00	0,78
	G	25,0%	21,7%	0,83 [0,21 - 3,25]	
rs7931342	G*	82,5%	75,9%	1,00	0,38
	T	17,5%	24,1%	1,49 [0,59 - 3,77]	
rs983085	A*	77,6%	78,6%	1,00	0,87
	G	22,4%	21,4%	0,93 [0,41 - 2,13]	
rs1859962	T*	85,2%	76,2%	1,00	0,30
	G	14,8%	23,8%	1,79 [0,57 - 5,60]	

* Alelo selvagem

Foram construídas curvas de sobrevida livre de recidiva para os polimorfismos que apresentaram um valor de p significativo na comparação com recidiva bioquímica menor que 0,1. Para o SNP rs 4242382, pacientes que não possuíam o alelo polimórfico tiveram um tempo médio de sobrevida livre de recidiva de 88,4 meses, enquanto pacientes com o alelo polimórfico tiveram um tempo médio de 114,5 meses, entretanto esta diferença não foi significativa do ponto de vista estatístico ($p=0,169$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Curva de sobrevida livre de recorrência bioquímica nos pacientes com CaP de acordo com a presença do SNP rs4242382

Finalmente, para o SNP rs1447295 foi encontrada diferença estatística significativa, onde pacientes sem o alelo polimórfico apresentaram recidiva bioquímica em um tempo médio de 85,6 meses, enquanto pacientes com o alelo polimórfico presente apresentaram um tempo médio de recidiva bioquímica de 124,2 meses ($p=0,007$) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Curva de sobrevida livre de recorrência bioquímica nos pacientes com CaP de acordo com a presença do SNP rs1447295

5 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença fundamentalmente genética e possui um grande potencial hereditário^{13,15}. É extremamente heterogênea com múltiplos loci contribuindo para sua susceptibilidade. Devido a isso, tem sido alvo de várias pesquisas, e estudos recentes do Genoma Humano revelaram numerosas variações genéticas relacionada a essa patologia⁵⁰⁻⁶¹. Muitos desses loci estão localizados em regiões intergênicas cuja suas funções permanecem ainda incertas⁶². Os SNPs vem sendo amplamente estudado e relacionado a predisposição da doença⁶³⁻⁶⁸.

Neste contexto, o presente estudo realiza uma análise para o conhecimento sobre o perfil da genotipagem de uma amostra da população brasileira no intuito de tecer algumas considerações sobre seu perfil molecular e de suscetibilidade. Neste trabalho, portanto, foi estudado a frequência de 20 polimorfismos presentes em genes que já foram associados ao desenvolvimento do CaP esporádico ou familiar. Comparou-se a frequência dos genótipos para cada um dos 20 polimorfismos entre os pacientes com CaP e o grupo controle, e foi realizado uma análise da associação com o CaP hereditário, correlação com o desenvolvimento do CaP esporádico e os fatores prognósticos. Nos resultados identificaram-se diferenças estatísticas relacionado a cinco polimorfismos.

O primeiro deles, o SNP rs2660753, está localizado no braço curto do cromossomo 3. Encontra-se numa região intergênica situada próximo a

genes que codificam proteínas com potencial carcinogênico⁶⁹. Um deles é o gene *Vestigial like Family Member* (VGLL3), distante 70 Kb, que é responsável pela codificação da proteína relacionada ao câncer de cólon. Outros genes próximos são o CHMP2B e o POU1F1 que distanciam 166 e 198 kb deste SNP, respectivamente. O gene POU1F1 é um fator de transcrição específico da pituitária responsável pelo desenvolvimento da glândula, regulação da síntese do hormônio do crescimento e proliferação celular^{70,71}. O outro, CHMP2B (gene da proteína 2B dos corpos multivesiculares), é responsável por codificar a proteína 2B modificadora da cromatina e sua mutação está relacionada ao desenvolvimento de demência frontotemporal familiar⁷². Na avaliação do SNP rs2667093 no presente estudo identificou-se que a presença do genótipo homozigoto selvagem foi maior no grupo com câncer de próstata (62,3%) quando comparada ao grupo controle (45,5%), enquanto que a presença do genótipo homozigoto polimórfico foi menor ocorrendo em 4,5% nos pacientes com CaP e 4,6% nos indivíduos do grupo controle. Na análise secundária, quando foi avaliado apenas a presença ou ausência do alelo polimórfico como fator de predisposição do CaP, encontrou-se no grupo sem câncer de próstata a presença do alelo polimórfico em 78,4% dos casos. Considerando, portanto, o desenvolvimento de CaP esporádico, identificou-se o genótipo e o alelo polimórfico mais prevalente no grupo controle, sugerindo um efeito protetor ao desenvolvimento desta doença em nossa população.

Na literatura, o SNP rs2660753 é um polimorfismo com papel de suscetibilidade no desenvolvimento de CaP, foi identificado em estudos do genoma humano em Europeus e validado em outras diferentes populações.

Um trabalho realizado por Kote-Jarai *et al.*⁷³ avaliou dados de um consórcio mundial de 13 grupos (Grupo que estuda alterações genéticas relacionadas ao CaP [PRATICAL]) e evidenciou que seis de sete SNPs analisados mostraram clara relação com o CaP, dentre eles o rs2660753. Neste estudo, o rs2660753 mostrou uma associação com CaP, embora mais fraca do que outro anteriormente realizado por Eeles *et al.*⁵⁰ [per-alelo OR, 1,08 (intervalo de confiança de 95%, 1,00-1,16; P = 0,06) *versus* 1,18 (95% de intervalo de confiança, 1,06-1,31), respectivamente]. Liu *et al.*⁴⁹, numa metanálise, demonstraram 31 SNPs com associação moderada com CaP destacando, também, o rs2660753 entre eles. Já outro estudo, realizado na população chinesa⁷⁴, diverge dos anteriores, pois os resultados dessa análise não demonstraram claramente correlação desse SNP com CaP nessa população.

Os estudos do genoma humano têm estabelecido uma ampla série de polimorfismos com susceptibilidade para o câncer de próstata, mas não está claro se esses SNPs também estão associados com a agressividade da doença. Uma análise com homens Afro-americanos e Europeus⁷⁵, evidenciou que o SNP rs2660753, além de exercer uma suscetibilidade para CaP, pode também desempenhar um papel na agressividade do tumor.

Quando foi avaliada a comparação dos genótipos entre os pacientes diagnosticados com CaP hereditário e esporádico, encontrou-se uma associação significativa com relação ao SNP rs7931342. O genótipo homozigoto polimórfico foi cinco vezes mais frequente no grupo dos indivíduos com CaP hereditário. Este SNP é uma variação G/T e está localizado no cromossomo 11q13 numa área intergênica onde frequentemente ocorrem

mutações relacionadas ao câncer. *Myeloma overexpressed* (MYEOV) é um gene que se localiza próximo deste SNP, distando 67 Kb, e é um suposto oncogene que está usualmente amplificado no câncer de mama e esôfago⁷⁶. O aumento da expressão MYEOV também está associado com a proliferação e invasão celular no câncer do cólon⁷⁷. Em concordância com nossos resultados, um estudo de Lange *et al.*⁷⁸ demonstrou que o SNP rs7931342 tem um potencial de associação com diagnóstico de câncer de próstata numa idade mais precoce, podendo corroborar como fator de risco para o caráter hereditário. Para esse mesmo SNP, identificou-se uma associação com o escore de Gleason, encontrando maior frequência do genótipo homozigoto polimórfico em paciente com escore ≥ 8 . Na literatura, esse SNP nunca havia sido associado ao escore de Gleason.

Eeles *et al.*⁵⁰ realizaram um estudo de associação genômica (GWAS), utilizando amostras de DNA de 1.854 indivíduos diagnosticados com câncer de próstata antes de 60 anos ou com história familiar de doença e 1.894 controles com níveis baixos de PSA (inferior a 0,5 ng/mL). Os autores analisaram estas amostras para 541.129 SNPs e identificaram no cromossomo 11, o rs7931342, que foi significativamente associada com o risco de câncer de próstata. A associação deste SNP e o CaP foi também confirmada, mais tarde, no estudo populacional do consórcio mundial PRATICAL (7.320 casos de CaP e 5.742 controle)⁷³.

Ainda comparando os genótipos do CaP esporádico e hereditário, o SNP rs10090154 demonstrou também relevância na associação com CaP hereditário. Nesta avaliação, foram encontrados tanto o genótipo homozigoto

polimórfico como, na análise secundária, a presença do alelo polimórfico mais frequente nos indivíduos portadores de CaP hereditário. A presença do alelo polimórfico, portanto, apresentou um aumento em torno de duas vezes e meia do indivíduo possuir CaP hereditário ($p = 0,01$). Esse SNP é localizado na locus 1 do cromossomo 8q24 e está associado com aumento do risco de câncer de próstata. Cheng *et al.*⁷⁹ identificaram que o *odds ratio* para o alelo de risco (T) foi de 1,42 (CI: 1,07-1,87, $p = 0,014$) e não foi significativamente diferente entre brancos e afro-americanos neste estudo de aproximadamente 500 pacientes. Zheng *et al.*⁸⁰ avaliaram 17 locis de suscetibilidade para CaP baseado em estudo caso-controle, incluindo 288 casos de CaP e 155 controle, e evidenciaram forte associação com o rs10090154 (OR: 2,07, 95% CI= 1,31-3,28). Outro estudo⁸¹, avaliou a associação de CaP e 23 SNPs na região 8q24, em caucasianos e afro-americanos, e demonstraram associação com CaP em 19 SNPs, dentre eles, o rs10090154 que foi fator de risco independente.

A relação deste SNP com o CaP é bem clara na literatura, no entanto, apenas dois estudos avaliaram sua relação com CaP associado a história familiar e características clínico-patológicas como idade, nível de PSA e estadiamento. Um deles, realizado por Beebe-Dimmer *et al.*⁸², avaliou a associação de 7 SNPs, já previamente identificado por Haiman *et al.*⁸³ como predisponentes para CaP no cromossomo 8q24, numa amostra de 1.015 homens com a doença e controle, oriundo de 403 famílias com CaP familiar ou diagnóstico de CaP em idade mais precoce. Divergente dos resultados do nosso trabalho, o rs10090154 não mostrou associação com o CaP com caráter

hereditário nesse estudo. Dois SNPs, rs6983561 e rs6983267, mostraram forte associação com a CaP diagnosticado em idade precoce e doença agressiva, respectivamente. Outro estudo, realizado por Liu *et al.*⁸⁴, mostrou associação do rs10090154 com CaP e, quando avaliou o momento do diagnóstico, foi associado com a idade de 65 a 74 anos (OR: 1.61), além de um PSA menor que 10 ng/mL (OR: 1.60) e estágio da doença inferior a III (OR: 1.75).

O cromossomo 8q24 tem um papel importante relacionado ao CaP. Estudos do genoma humano identificaram um grande número de SNPs em um segmento do cromossomo 8q24 que estão ligados a suscetibilidade para diferentes doenças, incluindo câncer da próstata, mama, esôfago, cabeça e pescoço, ovário, cólon e pâncreas⁸⁵. Três loci no gene 8q24 são fatores de risco genéticos independentes para câncer de próstata. Eles foram nomeados em locus 1, que compreende 5 SNPs intimamente ligados (rs1447295, rs4242382, rs7017300, rs7837688 e rs10090154), locus 2 (rs6983267), um SNP também ligado ao câncer colorretal, e o locus 3 (rs10086908)⁸⁶. Um gene encontrado nesta região, chamado MYC, destaca-se como o candidato mais provável associado ao risco de CaP, pois o seu papel é bem definido como um fator de transcrição oncogênico⁸⁷. O MYC é reconhecido como sendo o gene que codifica a proteína mais frequentemente amplificada em todos os tipos de câncer^{88,89}.

Com relação a associação com os fatores prognósticos clássicos do CaP, como dito anteriormente, foi utilizado o nível de PSA, escore de Gleason, estadiamento e recidiva bioquímica. Inicialmente, de acordo com os níveis de PSA, encontrou-se significância do ponto de vista estatístico

apenas para o SNP rs6983267, curiosamente a maioria dos pacientes independentemente do nível de PSA apresentaram genótipo heterozigoto, entretanto 4,2% dos pacientes com nível de PSA pré operatório ≥ 10 ng/mL apresentaram genótipo homozigoto polimórfico e nenhum apresentou genótipo homozigoto selvagem, enquanto no grupo com PSA < 10 ng/mL, 8,1% dos pacientes apresentaram genótipo homozigoto selvagem e nenhum genótipo homozigoto polimórfico. Baseado nesta análise, destacou-se que a presença do genótipo homozigoto selvagem pode estar relacionada com um melhor prognóstico e o homozigoto polimórfico com pior prognóstico. O rs6983267 é um SNP que se encontra localizado na região 3 do cromossomo 8q24 e está associado com o aumento de diversos tipos de tumores, particularmente com o CaP⁹⁰.

Um estudo realizado por Zheng *et al.*⁹¹, mostrou que o rs6983267 é um dos cinco SNPs utilizados para prever risco global cumulativo para CaP. Foram avaliados mais de 3.600 homens caucasianos portadores de CaP e demonstrou um risco de desenvolver a doença de 1.37 (CI: 1,18 - 1,59), além de ser responsável por 22,2% para o risco atribuível a população. Em outro estudo de 1.563 pacientes de descendência europeia, este SNP foi designado como representante de uma região de risco de câncer de próstata denominado "lócus 2", com *odds ratio* de 1,70 (CI: 1,39-2,07) para portadores de um genótipo de risco⁸⁶. Com relação a gravidade da doença, este SNP foi também relacionado ao risco de câncer de próstata avançado⁸⁶. Uma metanálise com mais de 10 estudos, que compreendem mais de 15.000 pacientes com câncer de próstata, mostrou associação com

CaP e concluiu que o *odds ratio* para rs6983267 (G) portadores do alelo é de 1,25 (CI: 1,24-1,26)⁷⁹. Divergente dos nossos resultados, com relação ao nível de PSA, um estudo evidenciou que os pacientes portadores de genótipo homozigoto selvagem (G/G) apresentam um nível maior de PSA, podendo estar relacionado a um fator de agressividade⁹².

Na comparação, ainda, dos fatores prognósticos, quando foi avaliado o SNP rs620861 com o escore de Gleason em dois grupos (Gleason < 7 e Gleason 7-10), encontrou-se uma frequência de 20,9% para o genótipo homozigoto polimórfico nos pacientes de escore intermediário e alto, e 66,7% para o genótipo homozigoto selvagem no escore baixo. Na análise subsequente, quando subdividimos os grupos em Gleason 6, Gleason 7 e Gleason 8-10, o perfil de genotipagem mantém o mesmo padrão, o genótipo homozigoto polimórfico permaneceu mais frequente nos pacientes com escore de Gleason de alto grau e o genótipo homozigoto selvagem com escore de baixo grau. A presença do genótipo homozigoto selvagem, portanto, pode estar relacionado a um fator de melhor prognóstico e o homozigoto polimórfico com pior prognóstico.

O SNP rs620861 está localizado no cromossomo 8q24 e tem associação com o risco de desenvolver CaP. Al Olama *et al.*⁹³, identificaram 8 SNPs no cromossomo 8q24 em uma população caucasiana. Cada SNP foi associado independentemente com CaP, inclusive o rs620861, entretanto esses SNPs não foram relacionados a agressividade do tumor. Yeager *et al.*⁹⁴ mostraram, também, que o rs620861 tem uma forte associação com o CaP. Não foram identificados estudos relacionados com a agressividade do CaP e esse SNP na literatura.

Na avaliação do estadiamento patológico e o perfil da genotipagem, foi encontrada significância estatística apenas para o SNP rs1447295. Nesta análise, o genótipo homozigoto polimórfico foi mais frequente nos tumores localizados. Com relação a recidiva bioquímica, o mesmo SNP rs1447295 também apresentou relevância, demonstrando o genótipo homozigoto selvagem mais presente nos casos de recidiva bioquímica ao contrário do homozigoto polimórfico e heterozigoto que foram mais presentes nos pacientes sem recidiva. Neste cenário, pode-se relacionar o SNP rs1447295 com características de melhor prognóstico, pois foi mais prevalente nos tumores localizados e sem recidiva bioquímica. Baseado nos achados de recidiva, foram construídas curvas de sobrevida livre de recidiva, sendo encontrado diferença estatística significativa para o SNP rs1447295. Os pacientes com o alelo polimórfico presente apresentaram um tempo médio de recidiva bioquímica maior comparado àqueles sem o alelo, corroborando, dessa forma, o perfil de melhor prognóstico.

O SNP rs1447295 fica localizado na região 1 do cromossomo 8q24 e vários trabalhos mostram associação com o CaP. No estudo de Zheng *et al.*⁹¹, previamente citado, evidenciou que o rs1447295 tem um risco de desenvolver o CaP de 1,22 (CI: 1,06-1,40) e risco atribuível a população de 5,4%. O rs1447295 quando está associado com rs6983267, estas duas alterações genéticas podem ser responsáveis por até um quarto dos casos de CaP em homens brancos⁵⁶. Outro estudo, realizado em 1.563 pacientes de descendência europeia, evidenciou quatro SNPs (incluindo rs1447295) na região do cromossomo 8q24 (denominado "lócus 1") fortemente

associada com câncer de próstata⁸⁶. Tereda *et al.*⁹⁵, evidenciaram que o rs1447295 alelo A foi associado com a susceptibilidade à CaP e foi significativamente associada com a doença mais agressiva.

De um modo geral, alguns SNP parecem ter um papel importante no desenvolvimento do CaP, na transmissão familiar e com alguns fatores prognósticos. Estes polimorfismos, ainda não haviam sido estudados na população brasileira e, em alguns aspectos, nosso estudo mostrou correlações previamente não demonstradas na literatura. A análise desses achados em outra população é fundamental para validar a relevância da suscetibilidade do CaP. A associação do polimorfismo e o desenvolvimento do câncer de próstata poderá contribuir para o desenvolvimento de ferramentas que permitam detectar precocemente e caracterizar o prognóstico da doença.

5.1 Perspectivas Para o Futuro

Nos últimos anos, vários estudos associados ao genoma têm sido bem-sucedidos na identificação de alelos de susceptibilidade de baixa penetrância para CaP, e prevê-se que mais variantes sejam detectadas através da análise combinada entre os estudos existentes, novas gerações de estudos maiores e aumento dos estudos de replicação. Individualmente, cada variante de risco tem um efeito modesto sobre o risco da doença e, claramente, não vai ser útil para predizer o risco. No entanto, o perfil de risco com base em uma combinação de variantes pode levar a um aumento considerável no risco de desenvolver a doença⁹¹ e aumentar o potencial do

poder preditivo à medida que mais variantes são detectadas⁹⁶. Com base neste conhecimento, pode-se ter implicações importantes para os programas de prevenção e rastreamento para CaP, permitindo identificar os grupos de maior risco e personalizar a abordagem.

Uma vez que existe um risco de morbidade considerável associado com o tratamento curativo do CaP (cirurgia ou radioterapia), é evidente a importância na prática clínica do uso de marcadores genéticos que possam melhorar a seleção dos pacientes que apresentarão um bom ou mau prognóstico. No entanto, as variantes de risco de CaP, até então identificadas, oferecem pouca ou nenhuma capacidade para discernir entre formas indolentes e agressivas da doença. Mais estudos do genoma entre homens afetados pela doença com diferente perfil de agressividade, e a associação da progressão da doença e mortalidade, são claramente necessários para identificar novas variantes genéticas hereditárias. Existem alguns estudos que mostram variantes genéticas predisponentes para doença mais agressiva⁹⁷ e estudos epidemiológicos propondo componentes genético no prognóstico do câncer^{98,99}.

A detecção, portanto, de marcadores genéticos capazes de discriminar entre formas indolentes e fatais do câncer de próstata é uma promessa para melhorar a detecção e manejo clínico da doença¹⁰⁰. A estratégia de rastreamento com o PSA associado ao perfil genético pode reduzir o sobrediagnóstico e o sobretratamento, permitindo caracterizar melhor a doença e estabelecer o planejamento terapêutico individualizado¹⁰¹.

5.2 Limitações do Estudo

O principal fator limitante do estudo foi o número de pacientes relativamente pequeno para realização do trabalho, pois sabe-se que para estudos de polimorfismo genético é ideal que a amostra seja maior, incluído até grandes centros. Além disso, a heterogeneidade da população brasileira que limita generalizar os achados para outros grupos étnicos.

6 CONCLUSÕES

Baseado no estudo realizado pode-se concluir que dois SNP (rs7931342 e 10090154) são fatores de risco para o desenvolvimento de CaP hereditário. O SNP rs7931342 (11q13.2) demonstrou associação ao câncer de próstata hereditário, o genótipo homozigoto polimórfico foi cinco vezes mais presente nesse grupo quando comparado aos indivíduos com CaP esporádico. O alelo polimórfico do SNP rs10090154 (8q24) aumenta em duas vezes e meia a predisposição para CaP hereditário. Considerando o CaP esporádico, a presença do genótipo e alelo polimórfico no SNP rs2660753 (3p12.1) foi maior no grupo controle comparado ao CaP esporádico, que sugere exercer um efeito protetor para a predisposição desta neoplasia.

Com relação a associação dos fatores prognósticos do CaP pode-se concluir que o genótipo homozigoto selvagem do SNP rs620861 (8q24) está associado com menor escore de Gleason. O genótipo homozigoto polimórfico do SNP rs1447295 (8q24) está relacionado a um melhor prognóstico, pois foi mais frequente nos pacientes com estadiamento órgão confinado, sem recidiva bioquímica e com sobrevida livre de recidiva mais longa.

7 ANEXOS

Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: **SEXO:** M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: **Nº:** **APTO:**

ENDEREÇO: **CIDADE:**

BAIRRO: **CEP:** **TELEFONE:** DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: **SEXO:** M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: **Nº:** **APTO:**

ENDEREÇO: **CIDADE:**

BAIRRO: **CEP:** **TELEFONE:** DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Influência dos polimorfismos genéticos na hiperplasia prostática benigna.

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes

CARGO/FUNÇÃO: Médico, Pesquisador do Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia – LIM/55

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL Nº: 113877

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de investigação médica – 55 (Urologia); Departamento de cirurgia, disciplina de urologia.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

Rubrica do sujeito da pesquisa ou responsável: _____

Rubrica do pesquisador: _____

Existem outros tipos de tumores na família?

Anexo C - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa **CIÊNCIA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05 de Fevereiro de 2014, **TOMOU CIÊNCIA do(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº 477/11, intitulado: "INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA HEREDITÁRIO" apresentado pelo Departamento de Cirurgia.

•Inclusão do aluno Érico Luís Dantas Diógenes Saldanha, tendo como orientador Prof. Dr. Miguel Srougi

Pesquisador (a) Responsável: **Sabrina Thalita dos Reis**

CEP-FMUSP, 05 de Fevereiro de 2014.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

8 REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer [internet]. 2018 [acesso 20 ago 2018]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30.
3. Seer Cancer. Surveillance, epidemiology, and end results program [internet]. 2015 [acesso 20 ago 2018]. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>.
4. Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, Buys SS, Chia D, Church TR, et al. Prostate cancer screening in the randomized Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial: mortality results after 13 years of follow-up. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(2):125-32.
5. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Zappa M, Nelen V, et al. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet*. 2014;384(9959):2027-35.
6. Moyer VA. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2012;157(2):120-34.

7. Carter HB, Albertsen PC, Barry MJ, Etzioni R, Freedland SJ, Greene KL, et al. Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. *J Urol*. 2013;190(2):419-26.
8. Ankerst DP, Till C, Boeck A, Goodman P, Tangen CM, Feng Z, et al. The impact of prostate volume, number of biopsy cores and American Urological Association symptom score on the sensitivity of cancer detection using the Prostate Cancer Prevention Trial risk calculator. *J Urol*. 2013;190(1):70-6.
9. Scardino PT, Weaver R, Hudson MA. Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol*. 1992;23(3):211-22.
10. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*. 1992;23(3):273-9.
11. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40(2):244-52.
12. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 1998;280(11):969-74.
13. Elo JP, Visakorpi T. Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med*. 2001; 33:110-41.

14. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol*. 1993;150(3):797-802.
15. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer: analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000; 343(2):78-85.
16. Cancel-Tassin G, Cussenot O. Genetic susceptibility to prostate cancer. *BJU International*. 2005; 96:1380-5.
17. Eeles RA, Dearnaley DP, Arden-Jones A, Shearer RJ, Easton DF, Ford D, et al. Familial prostate cancer: the evidence and the Cancer Research Campaign/British Prostate Group (CRC/BPG) UK Familial Prostate Cancer Study. *Br J Urol*. 1997;79(suppl 1):8-14.
18. Singh R, Eeles RA, Durocher F, Simard J, Edwards S, Badzioch M, et al. High risk genes predisposing to prostate cancer development-do they exist? *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2000;3(4):241-7.
19. Cussenot O, Valeri A, Meria P, Berthon P, Fournier G, Teillac P, et al. Genetic aspects in cancers of the prostate. *Pathol Biol (Paris)*. 1996;44(8):737-43.
20. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int*. 2003; 91:789-94.

21. Verkasalo PK, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E. Genetic predisposition, environment and cancer incidence: a nationwide twin study in Finland, 1976-1995. *Int J Cancer*. 1999;83:743-9.
22. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(8):3367-71.
23. Morganti G, Gianferrari L, Cresseria A, Arrigoni G, Lovati G. Recherches clinico-statistiques et génétiques sur les néoplasies de la prostate. *Acta Genet Stat Med*. 1956-1957;6(2):304-5.
24. Smith JR, Freije D, Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Isaacs SD, et al. Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science*. 1996;274(5291):1371-4.
25. Simard J, Dumont M, Soucy P, Labrie F. Perspective: prostate cancer susceptibility genes. *Endocrinology*. 2002;143(6):2029-40.
26. Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochemistry*. 2006; 97:433-47.
27. Shand RL, Gelmann EP. Molecular biology of prostate cancer pathogenesis. *Curr Opin Urol*. 2006;16:123-31.
28. Rökman A, Ikonen T, Seppälä EH, Nupponen N, Autio V, Mononen N, et al. Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. *Am J Hum Genet*. 2002; 70:1299-304.

29. Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, Slager SL, Christensen E, Marks AF, et al. Role of HPC2/ ELAC2 in hereditary prostate cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(17):6494-5.
30. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980; 32:314-31.
31. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1–mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet.* 1994;343(8899):692-5.
32. Cybulski C, Gorski B, Debniak T, Gliniewicz B, Mierzejewski M, Masojć B, et al. NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res.* 2004;64(4):1215-9.
33. Dong X, Wang L, Taniguchi K, Wang X, Cunningham JM, McDonnell SK, et al. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet.* 2003;72(2):270-80.
34. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998;280(5366):1077-82.
35. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003;426(6968):789-96.

36. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409(6822):928-33.
37. Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Mol Med Today*. 1999;5(12):538-43.
38. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177-86.
39. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*. 2009;10(4):241-51.
40. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS et al. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9362-7.
41. Varghese JS, Easton DF. Genome-wide association studies in common cancers--what have we learnt? *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(3):201-9.
42. Goh CL, Schumacher FR, Easton D, Muir K, Henderson B, Kote-Jarai Z, et al. Genetic variants associated with predisposition to prostate cancer and potential clinical implications. *J Intern Med*. 2012;271(4):353-65.

43. Eeles RA, Olama AA, Benlloch S, Saunders EJ, Leongamornlert DA, Tymrakiewicz M, et al. Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array. *Nat Genet.* 2013;45(4):385-91, 391e1-2.
44. Haiman CA, Chen GK, Blot WJ, Strom SS, Berndt SI, Kittles RA, et al. Genome-wide association study of prostate cancer in men of African ancestry identifies a susceptibility locus at 17q21. *Nat Genet.* 2011;43(6):570-3.
45. Takata R, Akamatsu S, Kubo M, Takahashi A, Hosono N, Kawaguchi T, et al. Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. *Nat Genet.* 2010;42(9):751-4.
46. Xu J, Mo Z, Ye D, Wang M, Liu F, Jin G, et al. Genome-wide association study in Chinese men identifies two new prostate cancer risk loci at 9q31.2 and 19q13.4. *Nat Genet.* 2012;44(11):1231-5.
47. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Al Olama AA, Giles GG, Guy M, Severi G, et al. Identification of seven new prostate cancer susceptibility loci through a genome-wide association study. *Nat Genet.* 2009;41(10):1116-21.
48. Stanford JL, FitzGerald LM, McDonnell SK, Carlson EE, McIntosh LM, Deutsch K, et al. Dense genome-wide SNP linkage scan in 301 hereditary prostate cancer families identifies multiple regions with suggestive evidence for linkage. *Hum Mol Genet.* 2009;18(10):1839-48.

49. Liu H, Wang B, Han C. Meta-analysis of genome-wide and replication association studies on prostate cancer. *Prostate*. 2011;71(2):209-24.
50. Eeles RA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Olama AA, Guy M, Jugurnauth SK, et al. Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet*. 2008;40(3):316-21.
51. Waters KM, Le Marchand L, Kolonel LN, Ostrander EA, Schleutker J, Ingles SA, et al. Generalizability of associations from prostate cancer genome-wide association studies in multiple populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1285-9.
52. Teerlink CC, Thibodeau SN, McDonnell SK, Schaid DJ, Rinckleb A, Maier C, et al. Association analysis of 9,560 prostate cancer cases from the International Consortium of Prostate Cancer Genetics confirms the role of reported prostate cancer associated SNPs for familial disease. *Hum Genet*. 2014;133(3):347-56
53. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Blondal T, Gylfason A, Agnarsson BA, et al. Genome- wide association and replication studies identify four variants associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet*. 2009; 41(10):1122-6.
54. Gudmundsson J, Sulem P, Manolescu A, Amundadottir LT, Gudbjartsson D, Helgason A, et al. Genome-wide association study identifies a second prostate cancer susceptibility variant at 8q24. *Nat Genet*. 2007;39(5):631-7.

55. Gudmundsson J, Sulem P, Rafnar T, Bergthorsson JT, Manolescu A, Gudbjartsson D, et al. Common sequence variants on 2p15 and Xp11.22 confer susceptibility to prostate cancer. *Nat Genet.* 2008;40(3):281-3.
56. Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2007;39(8):977-83.
57. Yeager M, Orr N, Hayes RB, Jacobs KB, Kraft P, Wacholder S, et al. Genome-wide association study of prostate cancer identifies a second risk locus at 8q24. *Nat Genet.* 2007;39(5):645-9.
58. Duggan D, Zheng SL, Knowlton M, Benitez D, Dimitrov L, Wiklund F, et al. Two genome-wide association studies of aggressive prostate cancer implicate putative prostate tumor suppressor gene DAB2IP. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(24):1836-44.
59. Murabito JM, Rosenberg CL, Finger D, Kreger BE, Levy D, Splansky GL, et al. A genome-wide association study of breast and prostate cancer in the NHLBI's Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.* 2007;8(Suppl 1): S6.
60. Nam RK, Zhang WW, Loblaw DA, Klotz LH, Trachtenberg J, Jewett MA, et al. A genome-wide association screen identifies regions on chromosomes 1q25 and 7p21 as risk loci for sporadic prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2008;11(3):241-6.

61. Amundadottir LT, Sulem P, Gudmundsson J, Helgason A, Baker A, Agnarsson BA, et al. A common variant associated with prostate cancer in European and African populations. *Nat Genet.* 2006;38(6):652-8.
62. Tsilidis KK, Travis RC, Appleby PN, Allen NE, Lindstrom S, Schumacher FR, et al. Interactions Between Genome-wide Significant Genetic Variants and Circulating Concentrations of Insulin-like Growth Factor 1, Sex Hormones, and Binding Proteins in Relation to Prostate Cancer Risk in the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort Consortium. *Am J Epidemiol.* 2012;175(9):926-35.
63. Choudhury AD, Eeles R, Freedland SJ, Isaacs WB, Pomerantz MM, Schalken JA, et al. The role of genetic markers in the management of prostate cancer. *Eur Urol.* 2012;62(4):577-87.
64. Alvarez-Cubero MJ, Saiz M, Martinez-Gonzalez LJ, Lorente JA, Cozar JM. Genetic analysis of the principal genes related to prostate cancer: a review. *Urol Oncol.* 2013;31(8):1419-29.
65. Van den Broeck T, Joniau S, Clinckemalie L, Helsen C, Prekovic S, Spans L, et al. The role of single nucleotide polymorphisms in predicting prostate cancer risk and therapeutic decision making. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:627510.
66. Dianat SS, Margreiter M, Eckersberger E, Finkelstein J, Kuehas F, Herwig R, et al. Gene polymorphisms and prostate cancer: the evidence. *BJU Int.* 2009;104(11):1560-72.

-
67. Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Vatto JW, Culing Z, Grönberg H, et al. The Mutational Landscape of prostate. *Eur Urol.* 2013;64(4):567-76.
 68. Thomas G, Jacobs KB, Yeager M, Kraft P, Wacholder S, Orr N, et al. Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer. *Nat Genet.* 2008;40(3):310-5.
 69. Amankwah EK, Kelemen LE, Wang Q, Song H, Chenevix-Trench G, et al. Prostate cancer susceptibility polymorphism rs2660753 is not associated with invasive ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(5):1028-31.
 70. Ohta K, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Ohta T, Tohma T, Jinno Y, et al. Characterization of the gene encoding human pituitary-specific transcription factor, Pit-1. *Gene.* 1992;122(2):387-8.
 71. Gil-Puig C, Seoane S, Blanco M, Macia M, Garcia-Caballero T, Segura C, et al. Pit-1 is expressed in normal and tumorous human breast and regulates GH secretion and cell proliferation. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153:335-44.
 72. Skibinski G, Parkinson NJ, Brown JM, Chakrabarti L, Lloyd SL, Hummerich H, et al. Mutations in the endosomal ESCRTIII-complex subunit CHMP2B in frontotemporal dementia. *Nat Genet.* 2005;37(8):806-8.

73. Kote-Jarai Z, Easton DF, Stanford JL, Ostrander EA, Schleutker J, Ingles SA, et al. Multiple novel prostate cancer predisposition loci confirmed by an international study: the PRACTICAL consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17:2052-61.
74. Zhou L, Liu M, Huang J, Yang YG, Wei D, Shi XH, et al. Two single nucleotide polymorphisms on chromosome 3 and the risk of prostate cancer in Chinese men. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2011;17(8):682-7.
75. Bensen, Jeannette T, Xu, Zongli, Mohler JL, Fontham ET, Taylor JA. Genetic polymorphism and prostate cancer aggressiveness: a case-only study of 1,536 GWAS and candidate SNPs in African-Americans and European-Americans. *Prostate.* 2013;73(1):11-22.
76. Brecht M, Steenvoorden AC, Luf S, Bartram CR, Janssen JW. Rearrangement and expression of myeov and hst in NIH/3T3 transfectants: a caveat for the interpretation of DNA transfection analyses. *Oncol Rep.* 2007; 17:1127-31.
77. Moss AC, Lawlor G, Murray D, Madden SF, Mulligan AM, Keane CO, et al. ETV4 and Myeov knockdown impairs colon cancer cell line proliferation and invasion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 345:216-21.
78. Lange EM, Salinas CA, Zuhlke KA, Ray AM, Wang Y, Lu Y, et al. Early onset prostate cancer has a significant genetic component. *Prostate.* 2012;72(2):147-56.

-
79. Cheng I, Plummer SJ, Jorgenson E et al. 8q24 and prostate cancer: association with advanced disease and meta-analysis. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(4):496-505.
 80. Zheng SL, Hsing AW, Sun J, Liu X, Rybicki BA, Casey G, et al. Association of 17 prostate cancer susceptibility loci with prostate cancer risk in Chinese men. *Prostate.* 2010;70(4):425-32.
 81. Salinas CA, Kwon E, Carlson CS, Koopmeiners JS, Feng Z, Karyadi DM, et al. Multiple independent genetic variants in the 8q24 region are associated with prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(5):1203-13.
 82. Beebe-Dimmer JL, Levin AM, Ray AM, Machiela MJ, Halstead-Nussloch BA, Johnson GR, et al. Chromosome 8q24 markers: risk of early-onset and familial prostate cancer. *Int J Cancer.* 2008;122(12):2876-9.
 83. Haiman CA, Patterson N, Freedman ML, Myers SR, Pike MC, Waliszewska A, et al. Multiple regions within 8q24 independently affect risk for prostate cancer. *Nat Genet.* 2007;39:638-44.
 84. Liu M, Wang J, Xu Y, Wei D, Shi X, Yang Z. Risk loci on chromosome 8q24 are associated with prostate cancer in northern Chinese men. *J Urol.* 2012;187(1):315-21.
 85. Grisanzio C, Freedman ML. Chromosome 8q24-Associated Cancers and MYC. *Genes Cancer.* 2010;1(6):555-9.

86. Zheng SL, Sun J, Cheng Y, Li G, Hsu FC, Zhu Y, et al. Association between two unlinked loci at 8q24 and prostate cancer risk among European Americans. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(20):1525-33.
87. Meyer N, Kim SS, Penn LZ. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 2006;16(4):275-87.
88. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature.* 2010;463(7283):899-905.
89. Wasserman NF, Aneas I, Nobrega MA. An 8q24 gene desert variant associated with prostate cancer risk confers differential in vivo activity to a MYC enhancer. *Genome Res.* 2010;20(9):1191-7.
90. Wokolorczyk D, Gliniewicz B, Sikorski A, Zlowocka E, Masojc B, Debniak T, et al. A range of cancers is associated with the rs6983267 marker on chromosome 8. *Cancer Res.* 2008 ;68(23):9982-6.
91. Zheng SL, Sun J, Wiklund F, Smith S, Stattin P, Li G, et al. Cumulative association of five genetic variants with prostate cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358:910-9.
92. San Francisco IF, Rojas PA, Torres-Estay V, Smalley S, Cerda-Infante J, Montecinos VP, et al. Association of RNASEL and 8q24 variants with the presence and aggressiveness of hereditary and sporadic prostate cancer in a Hispanic population. *J Cell Mol Med.* 2014;18(1):125-33.

-
93. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Giles GG, Guy M, Morrison J, Severi G, et al. Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility. *Nat Genet.* 2009; 41:1058-60.
 94. Yeager M, Chatterjee N, Ciampa J, Jacobs KB, Gonzalez-Bosquet J, Hayes RB, et al. Identification of a new prostate cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet.* 2009; 41:1055-7.
 95. Terada N, Tsuchiya N, Ma Z, Shimizu Y, Kobayashi T, Nakamura E, et al. Association of genetic polymorphisms at 8q24 with the risk of prostate cancer in a Japanese population. *Prostate.* 2008;68(15):1689-95.
 96. Wiklund FE, Adami HO, Zheng SL, Stattin P, Isaacs WB, Grönberg H, et al. Established prostate cancer susceptibility variants are not associated with disease outcome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18:1659-62.
 97. Xu J, Zheng SL, Isaacs SD, Wiley KE, Wiklund F, Sun J, et al. Inherited genetic variant predisposes to aggressive but not indolent prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107:2136-40.
 98. Pharoah PD, Antoniou AC, Easton DF, Ponder BA. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer. *N Engl J Med.* 2008;358: 2796-803.
 99. Hartman M, Lindström L, Dickman PW, Adami HO, Hall P, Czene K. Is breast cancer prognosis inherited? *Breast Cancer Res.* 2007;9(3):R39.

100. Gudmundsson J, Besenbacher S, Sulem P, Gudbjartsson DF, Olafsson I, Arinbjarnarson S, et al. Genetic correction of PSA values using sequence variants associated with PSA levels." *Sci Transl Med*. 2010 2(62): 62ra92.
101. Helfand BT, Loeb S, Hu Q, Cooper PR, Roehl KA, McGuire BB, et al. Personalized prostate specific antigen testing using genetic variants may reduce unnecessary prostate biopsies. *J Urol*. 2013; 189(5): 1697-701.