

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

KAROLINE BRITO CAETANO ANDRADE COELHO

**Investigação de biomarcadores genéticos diferenciais do câncer de
próstata de início precoce e tardio**

Ribeirão Preto - SP

2023

KAROLINE BRITO CAETANO ANDRADE COELHO

**Investigação de biomarcadores genéticos diferenciais do câncer de
próstata de início precoce e tardio**

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

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica - Opção:
Morfologia e Medicina Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Dalila Luciola Zanette

Ribeirão Preto - SP

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Coelho, Karoline

Investigação de biomarcadores genéticos diferenciais do câncer de próstata de início precoce e tardio. Ribeirão Preto, São Paulo, 2023.

120p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Área de concentração: Clínica Cirúrgica - Opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Orientador: Dra. Zanette, Dalila L.

1. Câncer de próstata; 2. Biomarcadores genéticos; 3. Sangue periférico; 4. Estratificação de risco; 5. Jovens; 6. Idosos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karoline Brito Caetano Andrade Coelho

Investigação de biomarcadores genéticos diferenciais do câncer de próstata de início precoce e tardio.

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

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Para Marleine Caetano e João Caetano.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, **Dr. Dalila Zanette**, obrigada pela troca, cuidado, atenção e amizade. Dr. Dalila me orienta desde a iniciação científica e me ensinou muito sobre a pesquisa científica e, para além disso, sobre a vida. Sobretudo a ser humana. Sou imensamente grata por confiar no meu trabalho e ter me dado oportunidades ao longo desses anos.

Ao **Dr. Rodolfo Borges**, obrigada por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pelo imenso aprendizado nas reuniões semanais, nas discussões dos meus resultados e por ter sido peça fundamental na obtenção dos pacientes.

A mi supervisor de intercambio del Centro de Investigación del Cáncer (España), **Dr. Javier De Las Rivas**, le agradezco toda la acogida, atención y colaboración en mi TFM. El Dr. Javier me dio la oportunidad de aprender nuevos análisis en Bioinformática y siempre se mostró extremadamente interesado en contribuir a mi trabajo. Además, me enseñó mucho sobre su cultura, idioma y experiencias de vida. Su simplicidad y pasión por la investigación científica son inspiradoras. Muchísimas gracias por todo.

Ao bioinformata **Alexandre Defelicibus**, obrigada pelas análises dos meus dados de sequenciamento e todas as discussões sobre os meus resultados. Desenvolvi muitas habilidades no R com a ajuda do Alexandre.

Às amigas que a pós graduação me deu, **Kelly Duarte** e **Dr. Cláudia Tarsila**, por me ajudarem na coleta de sangue e de dados dos pacientes do Hospital das Clínicas durante a pandemia. Sem vocês não seria possível. Agradeço também pelo ombro amigo e trocas diárias.

También quiero agradecer a mis compañeros del Centro de Investigación del Cancer por su cariño, amabilidad y clases diarias de español. **Natalia Alonso**, por haberme enseñado también mucho sobre R y especialmente sobre el análisis de supervivencia. **Alberto González**, por estar siempre dispuesto a ayudarme con mis errores en R y por enseñarme el increíble español de Andalucía.

Ao **Dr. Jeremy Squire**, obrigada pelo acolhimento no grupo e todas as discussões e contribuições sobre o tema do meu projeto.

À secretária, **Juliana Pischiotin**, por todo suporte e atenção na secretaria do programa.

Agradeço também aos os colaboradores do Hospital Erasto Gaertner: **Murilo de Almeida Luz**, **Jeanine Marie Nardin**, **Maria Eduarda Alencar Migliorini**, **Nathan Harmuch Kohl**, **Sergio O. Aoshii**, **Carina Stadiniski Gonçalves Pereira**, **Tayza Katelline Danilau Ostroski**, **Milena Massumi Kozonoe**.

À agência de fomento **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES). O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Código do financiamento 001.

Aos **pacientes** do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e do Hospital Erasto Gartner, que, voluntariamente, aceitaram fazer parte da pesquisa.

Aos queridos amigos que Ribeirão Preto me deu, **Daiane Mendes, Anderson Mendes e Marcos Vinícius**, obrigada por fazerem eu me sentir em casa. Agradeço imensamente pela amizade, torcida e boas conversas.

Aos amigos que conheci durante o intercâmbio, **Matheus Antunes, Walleska Torsian, Juliana Reali e Aldo Andrade**: obrigada pela companhia, troca, apoio e dias incríveis durante os meses na Espanha.

Às minhas amigas da vida toda, **Mirian Tainar, Aline Cardoso e Letícia Graça**, que, mesmo de longe, vibram com as minhas conquistas e se fazem presente.

Ao meu namorado, **Jorge Woolcott**, por ser minha calma e companhia nos dias difíceis. Obrigada por ter me dado forças para o intercâmbio, por me ouvir, aconselhar e ser meu melhor amigo.

Ao meu irmão, **Santiago Andrade**, pois sem seu apoio e incentivo eu não teria chegado até aqui. Obrigada por acreditar nas minhas decisões. Agradeço também à minha irmã, **Thayane Caetano** por torcer pela minha felicidade e acreditar em mim.

À minha mãe, **Roseane Caetano**, responsável pela pessoa que me tornei: determinada e forte. Obrigada por me ensinar sobre a vida, por toda educação e formação.

Aos meus avós, **Marleine Caetano e João Caetano**, alicerces da minha vida. Serei eternamente grata por tudo.

RESUMO

COELHO, K. B. C. A. **Investigação de biomarcadores genéticos diferenciais do câncer de próstata de início precoce e tardio.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

No Brasil o câncer de próstata (PCa) é o segundo mais frequente em homens. A incidência do PCa aumenta continuamente com a idade, embora os casos venham aumentando em homens jovens. Estudos sugerem que há diferenças entre os tumores de jovens e de idosos, mas há poucos relatos incluindo pacientes com menos de 55 anos de idade. **Objetivo:** Sequenciar o exoma de um painel de genes em DNA de sangue periférico de pacientes com PCa diagnosticados com idade até 55 anos e após os 60 anos, em busca de biomarcadores capazes de melhorar a estratificação de risco nestes diferentes grupos etários. **Pacientes e métodos:** foram incluídas amostras de sangue total de 18 pacientes com idade até 55 anos (grupo jovem) e 53 pacientes com idade superior a 60 anos (grupo idoso) com PCa primário e livres de tratamento, atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP) e no Hospital Erasto Gaertner (HEG). Foi realizado o sequenciamento do tipo *Next Generation* (NGS) para obter as sequências codificadoras completas dos genes *BRCA1/2*, *MLH1*, *MSH6*, *CDK12*, *PALB2*, *CHEK2*, *TP53*, *PTEN*, *HOXB13*, *KLK3*, *APC*, *KMT2C/D*, *FOXA1*, *SPOP*, *AR*, *ATR*, *GFI1B*, *NBN* e *PARP1*, comumente associados ao PCa. **Resultados:** Os genes *KMT2C* e *AR* tiveram o maior número de variantes não sinônimas nos dois grupos etários. Foram identificadas 132 variantes ($DP \geq 50$), em 17 genes, de 70 amostras. No grupo jovem os genes *KMT2D* e *ATR* foram os mais alterados, enquanto no grupo idoso, foram *BRCA2* e *KMT2C*. Foram detectadas 58 variantes exclusivas do grupo jovem, 64 do grupo idoso e 10 em comum. No grupo jovem, destaca-se a variante patogênica rs398122612 (*BRCA2*). O *KMT2C* foi o gene com maior número de variantes comuns aos dois grupos, destacando-se a rs150073007 classificada como *Likely Pathogenic* e presente em 68 dos 70 pacientes. **Conclusão:** O estudo identificou 43 novas variantes exclusivas do grupo jovem e 7 novas variantes exclusivas do grupo idoso, que serão posteriormente validadas em coortes maiores. O achado mais surpreendente foi a presença da variante rs150073007, localizada no gene *KMT2C* em 68 dos 70 pacientes. Em nossa busca na literatura não encontramos relatos dessa variante nunca foi encontrada em células de sangue periférico de pacientes com PCa, indicando seu potencial como um biomarcador minimamente invasivo para o diagnóstico de PCa.

Palavras-chave: Câncer de próstata. Biomarcadores genéticos. Sangue periférico. Estratificação de risco. Jovens. Idosos.

ABSTRACT

COELHO, K. B. C. A. **Investigation of differential genetic biomarkers of early and late onset prostate cancer.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

In Brazil, prostate cancer (PCa) is the second most common type of cancer in men. The incidence of PCa increases continuously with age, being more common in elderly individuals. However, the number of cases is increasing in young men. Studies suggest that there are differences in PCa between young and old men, but few studies were performed in patients under 55 years of age. **Objective:** Obtain targeted exome sequencing data of a panel of genes in DNA from peripheral blood cells of PCa patients with an early diagnosis (until 55 years) and a late diagnosis (after 60 years), aiming to find biomarkers that could potentially improve risk stratification in these age groups of patients with PCa. **Patients and methods:** blood samples from 18 PCa patients under 55 and 53 patients over 60 years old with primary PC and treatment free were collected in the Hospital das Clínicas (HCRP) and Hospital Erasto Gaertner (HEG). It was realized the Next Generation Sequencing (NGS) to obtain codifying full sequencing of *BRCA1/2*, *MLH1*, *MSH6*, *CDK12*, *PALB2*, *CHEK2*, *TP53*, *PTEN*, *HOXB13*, *KLK3*, *APC*, *KMT2C/D*, *FOXA1*, *SPOP*, *AR*, *ATR*, *GFI1B*, *NBN*, and *PARP1* genes, associated with PCa (Daicel Arbor Biosciences). **Results:** The *KMT2C* and *AR* genes had the highest number of non-synonymous variants in both age groups. A total of 132 variants ($SD \geq 50$) were identified in 17 genes from 70 samples. In the young group, the *KMT2D* and *ATR* genes were the most altered, while in the elderly group, they were *BRCA2* and *KMT2C*. Fifty-eight variants were exclusively detected in the young group, 64 variants were found exclusively in the elderly group and 10 variants were common to both groups. In the young group, the pathogenic variant rs398122612 (*BRCA2*) stands out. *KMT2C* was the gene with the highest number of variants common to both groups, with emphasis on rs150073007 classified as Likely Pathogenic and present in 68 of the 70 patients. **Conclusion:** The study identified 43 new variants exclusive to the young group and 7 new variants exclusive to the elderly group, which will be further validated in larger cohorts. The most surprising finding was the presence of the rs150073007 variant, located in the *KMT2C* gene, in 68 of the 70 patients. To our knowledge, this variant has never been reported in peripheral blood cells from patients with PCa, indicating its potential as a minimally-invasive biomarker for the diagnosis of PCa.

Keywords: Prostate cancer. Genetic biomarkers. Peripheral blood. Risk stratification. Early onset. Late-onset.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia e histologia da próstata. Figura adaptada de Rebello et al., 2021.	17
Figura 2. Número estimado de novos em casos de câncer em 2020, em homens de todas as idades no mundo inteiro. O câncer de próstata (PCa) está representado em verde. Fonte: GLOBOCAN, 2020.	18
Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020, por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2020.	18
Figura 4. Número estimado de mortes em 2020, no Brasil, em homens de todas as idades. O câncer de próstata (PCa) está representado em verde. Fonte: GLOBOCAN, 2020.	19
Figura 5. Transformação maligna da próstata. Fonte: criada no Biorender.	19
Figura 6. Classificação do tecido tumoral através do score de Gleason e/ou grau ISUP. Figura adaptada de EPSTEIN et al., 2016.	31
Figura 7. Classificação de risco (baixo, intermediário ou alto) baseado nos parâmetros citados anteriormente.	31
Figura 8. Mecanismos do câncer de próstata resistente à castração (mCRPC). Fonte: TAN et al., 2015.	33
Figura 9. Workflow do sequenciamento NGS (Plataforma Illumina).	45
Figura 10. Diferença de idade média entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).	49
Figura 11. Distribuição do Índice de massa corpórea (IMC) entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).	50
Figura 12. Distribuição do nível de PSA total entre os grupos jovem (younger) e idoso (older), no momento do diagnóstico.	50
Figura 13. Grupo de graduação ISUP entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).	51
Figura 14. Distribuição do estadiamento clínico entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).	52
Figura 15. Distribuição de História familiar positiva entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).	53
Figura 16. Oncoplot mostrando a distribuição de variantes em amostras de sangue de 70 pacientes. O oncoplot forneceu uma visão global das taxas e tipos de mutação, carga mutacional (TMB) e características clinicopatológicas para cada paciente (jovem=younger, blue; idoso=older, red). O lado direito do oncoplot mostra a taxa de cada gene mutado e a parte inferior os respectivos Ids das amostras, com suas respectivas características clinicopatológicas. As variantes anotadas como multi_hit referem-se aos genes que apresentaram mais de uma mutação na mesma amostra. ISUP, graduação ISUP; PreopPSA, nível de PSA total pré-	

operatório; Stage, Estágio tumoral; HF, história familiar de câncer; TMB, Tumor mutation burden.	58
Figura 17. Resumo geral do sequenciamento. Os gráficos mostram as classificações e os tipos das variantes encontradas, as trocas de base, a mediana de variantes por amostra e os 10 genes com maior número de variantes.....	59
Figura 18. Fluxo de trabalho das análises de variantes.	60
Figura 19. Oncoplot das variantes exclusivas do grupo jovem (58 variantes) e resumo dos achados do sequenciamento para tais variantes.....	62
Figura 20. Oncoplot das variantes exclusivas do grupo idoso (64 variantes) e resumo dos achados do sequenciamento para tais variantes.....	65
Figura 21. Localização das variantes ao longo da proteína KMT2C.	71
Figura 22. Localização das novas variantes e os respectivos domínios das proteínas. As variantes encontradas na nossa coorte são mostradas por um lollipopplot, com o tipo de variante e domínio indicados por cores. Acima: novas variantes exclusivas do grupo jovem; abaixo: novas variantes exclusivas do grupo idoso.....	74
Figura 23. Oncoplot com as variantes nos genes de reparo.....	77
Figura 24. Análise de evento exclusivo/ co-ocorrendo nos 10 genes com maior número de variantes.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes associados ao PCa, locus e suas funções biológicas.....	28
Tabela 2. Continuação da Tabela 1.....	29
Tabela 3. Características clinicopatológicas, comorbidades e hábito de vida em 71 pacientes com PCa.....	55
Tabela 4. Pacientes submetidos à Prostatectomia Radical.	56
Tabela 6. Cinquenta e oito variantes exclusivas do grupo jovem (n=17).....	63
Tabela 7. Sessenta e quatro variantes exclusivas do grupo idoso (n=53).....	66
Tabela 8. Sete variantes já descritas (dbSNP) exclusivas do grupo jovem, após aplicação dos filtros (Figura 2).	70
Tabela 9. Dez variantes já descritas (dbSNP) exclusivas do grupo idoso, após aplicação dos filtros (Figura 2).	70
Tabela 10. Cinco variantes em comum entre os grupos, após aplicação dos filtros (Figura 2).....	71
Tabela 11. Identificação de novas variantes exclusivas em cada grupo (jovem=younger, idoso=older).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ADT	Terapia de privação de andrógeno
APC	<i>Adenomatous polypsis coli</i>
AR	Receptor de andrógeno
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)</i>
BCR	Recorrência bioquímica
BRCA1/2	<i>Breast cancer susceptibility gene 1 e 2</i>
CAF	Fibroblastos associados ao câncer
CDK12	<i>Cyclin dependent kinase 12</i>
CHEK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CPH	Célula progenitora hematopoética
DC	Célula dendrítica
DGR	Gene de reparo de DNA
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FOX1	Forkhead Box A1
GFI1B	<i>Growth factor independent 1B transcriptional repressor</i>
GRS	Escore de risco genético
GWAS	Estudos de associação de genoma
HC	Hematopese clonal
HF	História familiar
IMC	Índice de massa corpórea
KLK3	<i>Kallikrein related peptidase 3</i>
KMT2	<i>Histone-lysine N-methyltransferase 2</i>
HOXB13	<i>Homeobox B13</i>
HRR	Reparo de recombinação homóloga
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISUP	<i>International Society of Urological</i>
MEC	Matriz extracelular
MCRPC	Metastático resistente à castração

MDSCs	Células mieloides supresoras
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MSH6	<i>MutS homolog 6</i>
NBN	<i>Nibrin</i>
NHEJ	União de extremidade não homóloga
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
PARP-1	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase-1</i>
PCA	Câncer de próstata
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homologue</i>
PIN	Neoplasia intraepitelial
PR	Prostatectomia radical
PSA	Antígeno prostático específico
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
RT	Radioterapia
SPOP	<i>Speckle-type POZ protein</i>
TAM	Macrófagos associados ao tumor
TMB	<i>Tumor mutation burden</i>
TME	Microambiente tumoral
TNM	Tumor, linfonodo e metástase
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease serine 2</i>
VA	Vigilância ativa
WW	<i>Watchful waiting</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
PRÓSTATA	17
2.1.1 Anatomia e histologia da próstata	17
2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA (PCa).....	18
2.2.1 Epidemiologia do PCa	18
2.2.2 Neoplasia da próstata.....	19
2.3 Fatores de risco do PCa	20
2.2.4 Suscetibilidade genética do PCa.....	20
2.2.5 Outros genes envolvidos no PCa	23
2.2.6 Diagnóstico e prognóstico do PCa.....	30
2.2.7 Tratamento do PCa	31
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	36
4.1 Justificativa.....	37
4.2 Hipótese.....	37
5. DESENHO DO ESTUDO	38
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
6.1 Pacientes e aspectos éticos	41
6.2 Critérios de inclusão:.....	41
6.3 Coleta das amostras	42
6.4 Sequenciamento.....	42
6.4.1 Extração do DNA (método <i>Salting out</i>)	42
6.4.2 Purificação do DNA genômico.....	42
6.4.3 Seleção dos pacientes	43
6.4.4 Sequenciamento de nova geração (NGS)	43
6.4.5 Etapas do sequenciamento NGS.....	43
6.5. Análise dos dados – bioinformática.....	46
6.6 Avaliação de dados clinicopatológicos.....	46

6.7. Análises de sobrevivência e sobrevida livre de doença em coortes de PCa.....	47
6.8 Análise Estatística	47
7. RESULTADOS	48
7.1 Caracterização dos pacientes	49
7.1.1 Idade	49
7.1.2 Índice de Massa Corpórea (IMC)	49
7.1.3 Nível de PSA total	50
7.1.4 Grupo de graduação <i>ISUP</i>	51
7.1.5 Sistema de estadiamento TNM.....	51
7.1.6 História familiar (HF) de câncer.....	52
7.1.7 Tratamento.....	53
7.1.8 Comorbidades e hábitos de vida.....	54
7.1.9 Avaliação de recorrência bioquímica (BCR).....	56
7.2 Sequenciamento (Targeted Next Generation Sequencing).....	57
7.2.1 Variantes exclusivas de cada grupo.....	60
7.2.2 Variantes descritas (dbSNP).....	68
7.2.3 Variantes novas exclusivas de cada grupo.....	72
7.2.4 Genes de reparo de DNA (DRGs)	76
7.2.5 Análise de evento exclusivo/ co-ocorrendo nos 10 genes com maior número de variantes encontradas (top10).....	78
7.3 Análise de sobrevivência em coortes de PCa	79
8. DISCUSSÃO.....	81
9. CONCLUSÕES.....	91
10. REFERÊNCIAS	93
11. ANEXOS	110
ANEXO A - Classificação TNM para avaliação da extensão anatômica do tumor. T:extensão do tumor primário, N: presença e/ou ausência e a extensão de metástase em linfonodos regionais e M: presença e/ou ausência de metástase à distância.	111
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e esclarecido do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.....	112
ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Hospital Erasto Gartner, Curitiba, Paraná.....	114

1. INTRODUÇÃO

1 No Brasil o câncer de próstata (PCa) é o segundo mais frequente em homens, com
2 estimativa de 65.840 novos casos em 2020 (Instituto Nacional de câncer, INCA). Nos Estados
3 Unidos, nas estatísticas considerando homens e mulheres, o PCa representa 10,6% de todos os
4 novos casos de câncer, e está no terceiro lugar geral em incidência (Cancer Stat Facts). No
5 mundo, o PCa é o segundo câncer mais frequente em homens (INCA).

6 Os fatores de risco mais bem estabelecidos para o PCa são a idade avançada,
7 ascendência africana e história familiar positiva. A incidência do PCa aumenta continuamente
8 com a idade, sendo 66 a mediana da idade ao diagnóstico. Vários estudos já apontaram que
9 mutações germinativas em genes supressores tumorais ocorrem em homens diagnosticados com
10 PCa em uma idade mais precoce. No entanto, uma pequena fração desses homens apresenta
11 histórico familiar de mutações herdadas ou apresenta essas mutações quando são feitas as
12 análises genéticas (RUSSO e BALK, 2018). A incidência do PCa vem aumentando em homens
13 jovens, nos quais parece haver uma tendência a tumores mais agressivos. Esses achados
14 sugerem que há diferenças entre os tumores de jovens e de idosos, mas poucos estudos foram
15 feitos em pacientes com menos de 50 anos de idade (DING *et al.*, 2016). Cerca de 10% dos
16 homens com PCa nos Estados Unidos são diagnosticados antes dos 56 anos e, nestes indivíduos
17 o próprio câncer é mais frequente como causa do óbito, em comparação aos pacientes mais
18 idosos, que tendem a morrer de outras comorbidades (LANGE *et al.*, 2016). Apesar dessas
19 evidências de maior agressividade, também há estudos que indicam que a apresentação clínica
20 e o prognóstico dos pacientes jovens na era antígeno prostático específico (PSA), mudou muito
21 em relação aos anos anteriores, sendo que atualmente estes pacientes apresentam doença menos
22 agressiva (GIELCHINSKY *et al.*, 2016). Porém, esses dados ainda são controversos pois
23 utilizaram coortes bastante diferentes e precisam de mais dados para sua comprovação.

24 De fato, o rastreamento, diagnóstico e tratamento do PCa mudou muito nos últimos anos
25 e, em alguns casos de tumores de baixo risco há relatos de que o tratamento possa ter sido
26 estabelecido desnecessariamente, uma vez que o tumor pode ser de baixo grau. O principal
27 tratamento do PCa localizado é a prostatectomia radical (PR), que comumente apresenta
28 complicações como disfunção erétil e incontinência urinária, associados à menor qualidade de
29 vida. Assim, em pacientes de baixo a vigilância ativa (VA) pode ser indicada. Nos Estados
30 Unidos 40% dos pacientes com PCa de baixo risco são acompanhados por VA, na qual a PR
31 ou radioterapia (RT) não são instituídos de imediato e o paciente é acompanhado atentamente,
32 com uma série de testes de PSA e biópsias, com objetivo de monitorar e assim detectar as mais
33 precoceamente quaisquer indicações de uma conversão do tumor para um grau mais avançado,
34 quando então é indicado o tratamento.

35 Apesar de vários estudos terem indicado a eficiência da VA, a seleção correta dos
36 pacientes ainda é problemática, sendo que 20-50% dos casos inicialmente identificados como
37 sendo de baixo risco são diagnosticados com maior gravidade na segunda ou terceira biópsia
38 (CHOYKE e LOEB, 2017). O dilema maior nesses casos é a heterogeneidade própria do PCa
39 que se origina de um epitélio prostático geneticamente alterado e pode evoluir lentamente ao
40 longo de vários anos, com múltiplos focos e heterogeneidade tumoral, que tornam difícil prever
41 o curso da doença (RITTMASER, 2008). Além disso, os pacientes podem acabar optando
42 pela interrupção da VA e instituição do tratamento, devido à necessidade de grande número de
43 repetidas biópsias. No entanto, a VA deve ser considerada uma opção viável, especialmente
44 para pacientes jovens que poderiam evitar a prostatectomia e assim ter maior qualidade de vida
45 por mais tempo. Para aumentar as chances de sucesso da VA, é necessário melhorar os critérios
46 de estratificação de risco, com seleção mais eficaz dos pacientes aptos, resultando em maior
47 eficácia da VA, com médicos e pacientes mais confiantes para a tomada dessa importante
48 decisão (CHOYKE e LOEB, 2017). Além dos efeitos benéficos aos pacientes, a melhoria dos
49 critérios de estratificação de risco e da VA resultaria em diminuição de custos, já que cirurgias
50 desnecessárias seriam evitadas ou adiadas, com consequente redução de despesas relacionadas
51 à internação e cuidados pós-operatórios.

52 Neste presente estudo, mutações germinativas comumente associadas ao PCa foram
53 analisadas no DNA (Ácido desoxirribonucleico) de sangue periférico dos pacientes, incluindo
54 os genes *BRCA1/2*, *MLH1*, *MSH6*, *CDK12*, *PALB2*, *CHEK2*, *TP53*, *PTEN*, *HOXB13*, *KLK3*,
55 *APC*, *KMT2C/D*, *FOXA1*, *SPOP*, *AR*, *ATR*, *GFIIB*, *NBN* e *PARP1*.

56 Para a melhoria da estratificação de risco é importante identificar o padrão de expressão
57 de alterações genéticas mais precoces nos pacientes jovens (≤ 55 anos) e diferenciá-las das que
58 ocorrem nos pacientes idosos (≥ 60 anos) uma vez que o PCa tem diferenças importantes quando
59 se considera a faixa etária em que ocorre. Neste projeto, pacientes com PCa de início precoce
60 (≤ 55 anos) e tardio (≥ 60 anos) foram comparados quanto à presença de variantes em sangue
61 periférico com intuito melhorar a estratificação de risco nestes diferentes grupos etários. Os
62 biomarcadores diferenciais teriam potencial de diferenciar melhor o PCa que ocorre em
63 pacientes idosos e jovens. A melhoria da estratificação de risco tem impacto direto na melhoria
64 da qualidade de vida destes pacientes e pode ter grande impacto financeiro, pois a adequação
65 do tratamento pode reduzir não só o custo da terapia, como também custos com internação e
66 cirurgias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

1 PRÓSTATA

3 2.1.1 Anatomia e histologia da próstata

5 A próstata é uma glândula masculina, localizada abaixo da bexiga, ao redor da uretra e
 6 à frente do reto. Ela pode ser dividida anatomicamente em 5 regiões: zona central, zona de
 7 transição, zona periférica, região fibromuscular e região periuretral. Sua função é produzir e
 8 secretar parte do sêmen e manter a viabilidade dos espermatozoides (REBELLO *et al.*, 2021).
 9 O epitélio da próstata é composto por diferentes tipos celulares, dentre eles as células luminais
 10 que são responsáveis por expressar o antígeno prostático específico (PSA), as células basais,
 11 intermediárias e raras células neuroendócrinas. O estroma é formado por fibroblastos maduros,
 12 células musculares, componentes vasculares e neurais (TOIVANEN e SHEN, 2017) (**Figura**
 13 **1**).

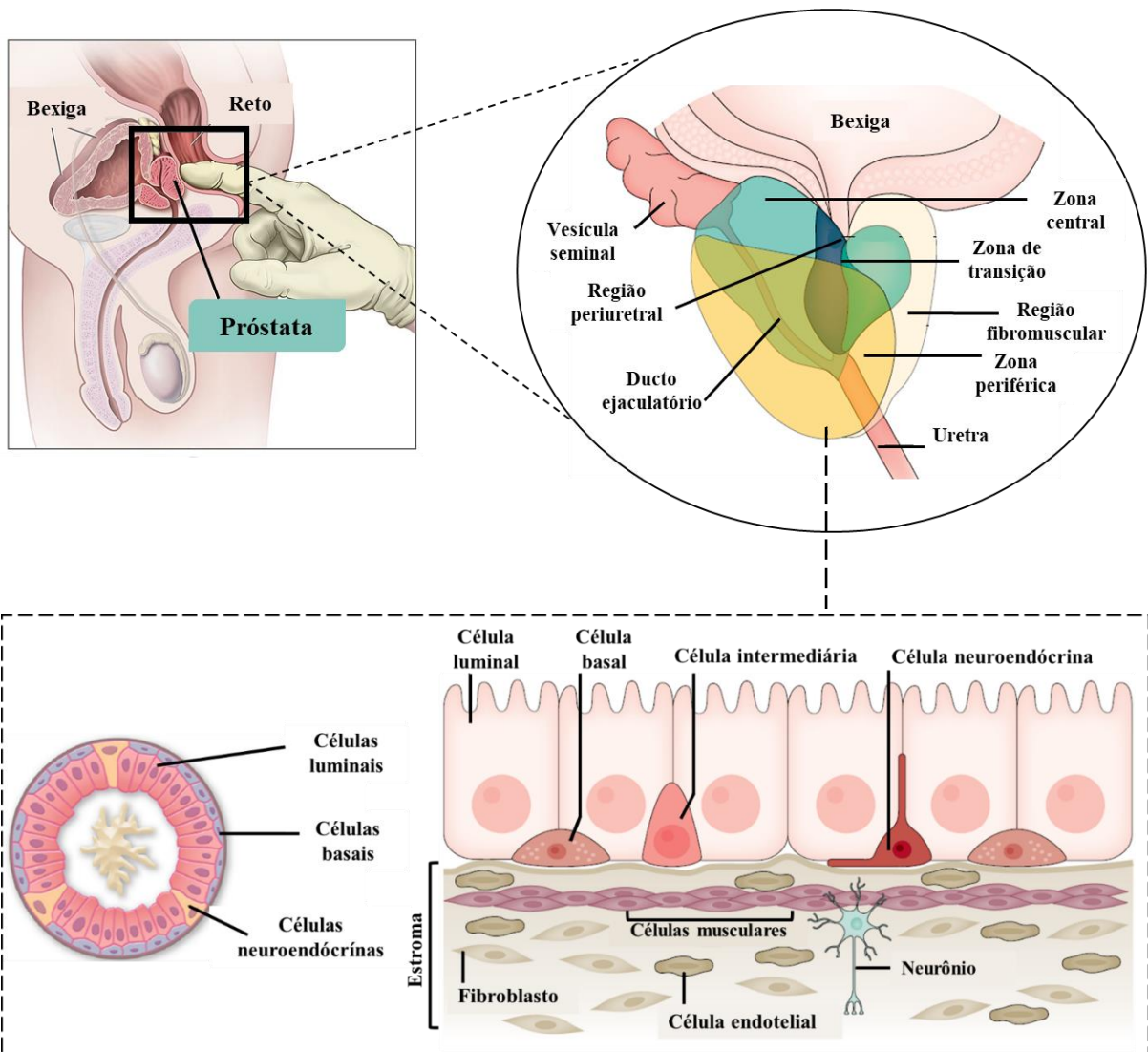


Figura 1. Anatomia e histologia da próstata. Figura adaptada de Rebello *et al.*, 2021.

2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA (PCa)

2.2.1 Epidemiologia do PCa

O PCa afeta milhões de homens no mundo todo. Em 2020 ele foi o câncer com maior número de novos casos estimados em homens de todas as idades, sendo representado em 112 países (**Figura 2**) (GLOBOCAN, 2020). No Brasil, sem considerar o câncer de pele não melanoma, o PCa assume o câncer mais frequente em homens, com estimativa de 65.840 novos casos para cada ano do triênio 2020-2022 (Instituto Nacional de câncer, INCA). Somado a isto, é a segunda causa de morte por câncer, ficando atrás apenas do câncer de pulmão (**Figura 3 e 4**).

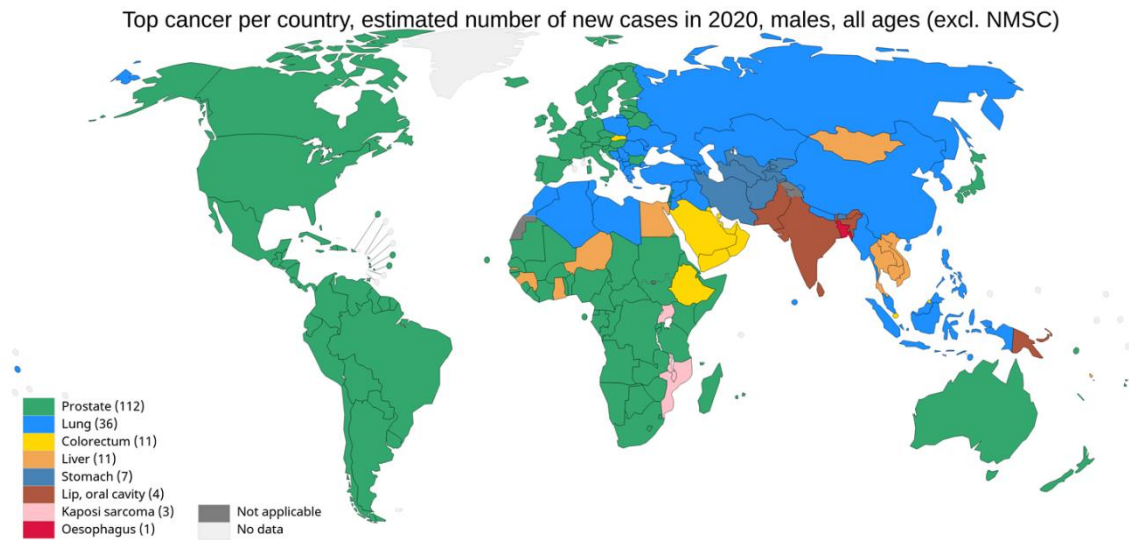




Figura 2. Número estimado de novos em casos de câncer em 2020, em homens de todas as idades no mundo inteiro. O câncer de próstata (PCa) está representado em verde. Fonte: GLOBOCAN, 2020.

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens  Mulheres 	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020, por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2020.

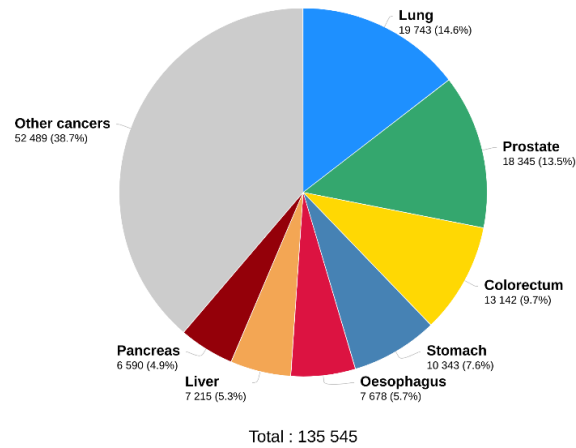


Figura 4. Número estimado de mortes em 2020, no Brasil, em homens de todas as idades. O câncer de próstata (PCa) está representado em verde. Fonte: GLOBOCAN, 2020.

1 2.2.2 Neoplasia da próstata

2

3

4

5

6

7

8

9

10

A transformação maligna da próstata origina com uma lesão pré-maligna, conhecida como neoplasia intraepitelial (PIN), seguida para o câncer de próstata localizado, podendo culminar em metástase (WANG *et al.*, 2018). A metástase ocorre quando as células cancerígenas atingem outros órgãos. Linfonodos pélvicos (99%) e ossos (84%) são os sítios mais comuns, seguidos de fígado (10%), pulmão (9%) e cérebro e dura (<2%) (REBELLO *et al.*, 2021) (**Figura 5**). A probabilidade de desenvolver câncer invasivo aumenta com o avançar da idade, passando de 1.8 (1 a cada 5) em homens com idade entre 50-59 anos para 8.7 (1 a cada 12) em homens com idade acima de 70 anos (SIEGEL *et al.*, 2021).

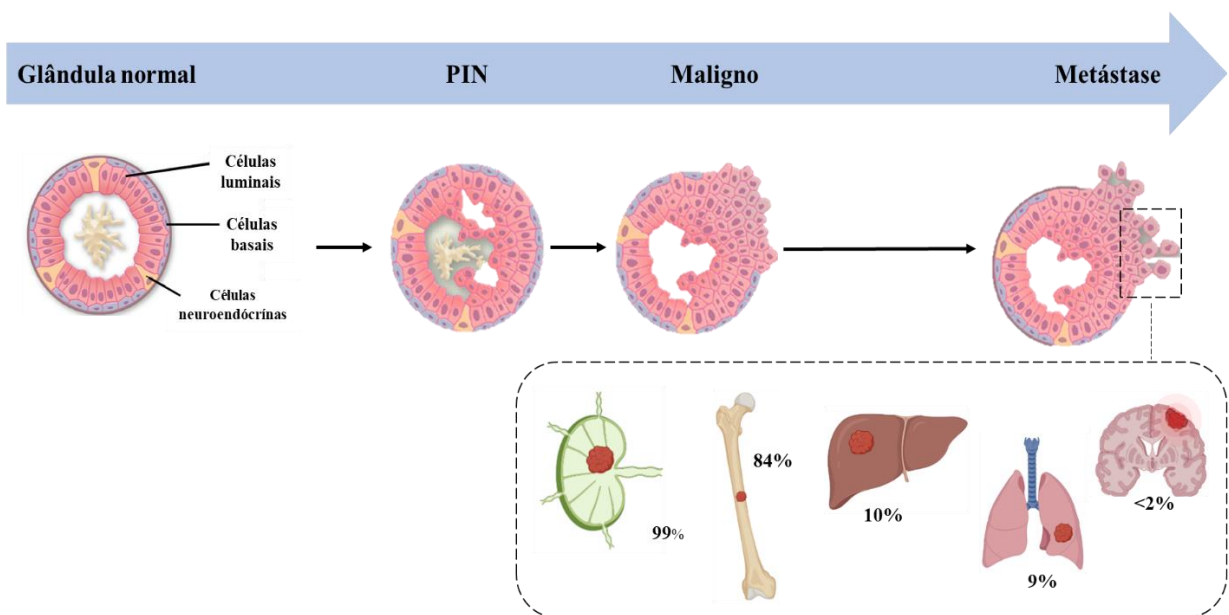


Figura 5. Transformação maligna da próstata. Fonte: criada no Biorender.

2.3 Fatores de risco do PCa

Idade avançada, histórico familiar, ascendência africana e susceptibilidade genética são os fatores de risco mais bem esclarecidos do PCa (AL OLAMA *et al.*, 2014). Somado a isto, existem outros fatores com efeitos menos elucidados, como obesidade, tabagismo, alcoolismo, inflamação da próstata e infecção pelo vírus do Papiloma humano (INCA, 2020).

O PCa é primariamente uma doença de homens mais velhos. O risco aumenta fortemente com a idade e mais de 85% dos homens são diagnosticados após os 60 anos (REBELLO *et al.*, 2021).

História familiar de qualquer tipo de câncer está associado ao aumento do risco do PCa. Para determinar esse risco familiar é fundamental ter conhecimento do grau de parentesco (primeiro, segundo ou terceiro grau), número de indivíduos afetados e a idade ao diagnóstico. É definido PCa familiar quando o paciente tem três ou mais familiares com PCa, com pelo menos dois deles com idade até 55 anos no momento do diagnóstico (MOTTET *et al.*, 2017). Homens que têm parente de primeiro grau com a doença apresentam duas vezes mais risco de desenvolver PCa (JOHNS e HOULSTON, 2003).

Homens com ancestralidade Africana apresentam um escore de risco genético (GRS) médio duas vezes mais alto que homens de ancestralidade europeia (CONTI *et al.*, 2021) e maior risco de ser diagnosticado com a doença no estágio avançado quando jovens. Uma das hipóteses sugeridas é que a agressividade pode ser devida à expressão aumentada de genes associados com PCa letal e fatores solúveis inflamatórios (POWELL *et al.*, 2014).

2.2.4 Suscetibilidade genética do PCa

O desenvolvimento do PCa é induzido por múltiplas alterações genômicas em genes que regulam principalmente resposta ao dano ao DNA, crescimento, proliferação e morte celular (REBELLO *et al.*, 2021). Apesar do PCa hereditário acometer 5-10% dos casos de PCa (DAS *et al.*, 2019), estudos de associação de genoma (GWAS) têm identificado 170 loci de susceptibilidade (VIETRI *et al.*, 2021). Mutações em genes de reparo de DNA aumentam a susceptibilidade aumentada ao PCa precoce (<60 anos) (REBELLO *et al.*, 2021). Isso inclui *BRCA1/2*, *ATR*, *NBN*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *CHEK2* e *PALB2* (DAS *et al.*, 2019) (EWING *et al.*, 2012) (WOKOŁORCZYK *et al.*, 2020). Mutações nos genes *BRCA2* e *HOXB13* conferem o maior risco relativo de predisposição genética (7-8 vezes e 3-5 vezes, respectivamente) ao PCa (PRITCHARD *et al.*, 2016) (KOTE-JARAI *et al.*, 2015)

2.2.4.1 Genes envolvidos na susceptibilidade genética ao PCa

Breast cancer susceptibility gene 1 e 2 (BRCA 1 e 2)

Os genes *BRCA 1* e *2*, localizados nos cromossomos 17 e 13, respectivamente, são supressores tumorais envolvidos na integridade genômica, com papel fundamental no reparo da quebra da dupla fita de DNA, por meio da recombinação homóloga (ROY, CHUUN e POWELL, 2012). Mutações nesses genes têm sido associadas ao risco aumentado de câncer de mama, ovário e próstata (NYBERG *et al.*, 2020). No entanto, no PCa esse risco relativo varia de acordo com a localização e tipo da mutação (NYBERG *et al.*, 2020).

Homeobox B13 (HOXB13)

O gene *HOXB13*, localizado no cromossomo 17, codifica um membro da família de proteínas *homeobox*, essencial para função secretória e diferenciação do epitélio normal da próstata, bem como para regulação da transcrição dos genes alvos do receptor de andrógeno (AR) (OUHTIT *et al.*, 2016). Ele é capaz de reprimir o crescimento celular da próstata através da inibição do AR. A super expressão do *HOXB13* contribui para a carcinogênese da próstata e, portanto, ele é considerado um gene de susceptibilidade (WEI *et al.*, 2020). Os mecanismos ainda não estão completamente elucidados, mas, variantes germinativas no *locus* HOXB alteram o risco do PCa (TIMOFTE *et al.*, 2021). A mutação germinativa G845 é a mais bem descrita, apresentando risco 3-5 vezes aumentado para o desenvolvimento de PCa, mesmo em homens mais jovens, comparados àqueles que não possuem a mutação (TIMOFTE *et al.*, 2021). Atualmente essa mutação é utilizada no rastreamento do câncer familiar (DUPONT *et al.*, 2021).

Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR)

O gene *ATR* está localizado no cromossomo 3 e, a proteína por ele codificada funciona como uma quinase ativada em caso de danos ao DNA e estresse na replicação do DNA, através de pontos de checagem do ciclo celular e vias de reparo (BRUNO *et al.*, 2006). Desempenha papel fundamental na estabilidade genômica (RAFIEI *et al.*, 2020).

MutL homolog 1 (MLH1)

O gene *MLH1*, localizado no cromossomo 3p, codifica um dos membros do complexo de reparo de DNA *mismatch* por meio do reconhecimento de nucleotídeos mal pareados,

1 inserções e deleções errôneas durante a replicação do DNA (LIPKIN *et al.*, 2000). Mutações
2 germinativas em genes do sistema de reparo *mismatch*, incluindo *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*
3 são bem descritas na síndrome de Lynch. Indivíduos que apresentam essa síndrome têm risco
4 aumentado de desenvolver câncer devido à maior instabilidade de microssatélites (MSI)
5 (SHARMA, YANG e MIYAMOTO, 2020). Os microssatélites, também conhecidos como
6 *Short Tandem Repeats*, são sequências repetidas de 1 a 6 nucleotídeos, que podem ser
7 detectadas no câncer endometrial, colorretal e próstata (LI *et al.*, 2020).

9 ***MutS homolog 6 (MSH6)***

10
11 O gene *MSH6*, localizado no cromossomo 2p é, é um supressor tumoral membro do
12 complexo *mismatch*. Portanto, a perda de função está associada a instabilidade de
13 microssatélites e carcinogênese (SHARMA, YANG e MIYAMOTO, 2020). No PCa, a super
14 expressão desses genes está relacionada com pior prognóstico e instabilidade genética
15 (WILCZAK *et al.*, 2017).

16 17 ***Checkpoint kinase 2 (CHEK2)***

18
19 O gene *CHEK2*, localizado no cromossomo 22q, é um supressor tumoral que codifica
20 uma proteína quinase envolvida na via de ponto de checagem do dano ao DNA (BRANDÃO
21 *et al.*, 2020), e, portanto, participa de muitos processos envolvendo a estabilidade da estrutura
22 do DNA e a progressão do ciclo celular (ZANNINI, DELIA e BUSCEMI, 2014). Em condições
23 de crescimento celular normal, *CHEK2* está no núcleo na sua forma inativa. Mas, quando há
24 quebra da dupla fita de DNA, a quinase *ATM* é ativada e fosforila *CHEK2*, gerando
25 modificações para sua completa ativação (BARTEK e LUKAS, 2003). Muitas mutações
26 germinativas no *CHEK2* têm sido associadas ao risco aumentado de câncer, incluindo mama,
27 próstata e cólon. No entanto, o completo entendimento do risco associado a variantes
28 específicas no PCa ainda é limitado (WANG, DAI e YE, 2015).

29 30 ***Nibirin (NBN)***

31 Localizado no cromossomo 8q, o gene *NBN* faz parte do complexo Mre11-Rad50-Nbs
32 (MRN) envolvido no reparo da quebra da fita dupla de DNA, através de mecanismos de
33 recombinação homóloga (HRR) e união de extremidade não homóloga (NHEJ) (CARNEY *et*
34 *al.*, 1998). Além disso, quando ativado, o complexo faz pontos de checagem no ciclo celular
35 G2/M (CARSON *et al.*, 2003). Mutações germinativas nesse gene estão associadas com a
36 síndrome *Nijmegen breakage (NBS)* e predisposição aumentada ao câncer (VARON *et al.*,

1 1998). O *NBN* é um gene que quando mutado confere susceptibilidade aumentada ao PCa e
2 doença agressiva (WOKOŁORCZYK *et al.*, 2020).

3 4 ***Partner and localizer of BRCA2 (PALB2)***

5
6 Localizado no cromossomo 16p, o gene *PALB2* faz parte do complexo associado ao
7 *BRCA1/2*, que é essencial para o reparo da quebra da dupla fita de DNA, através da
8 recombinação homóloga (HR) (ZHANG *et al.*, 2009). A inativação do *PALB2* é a causa
9 genética mais comum de assinatura de recombinação homóloga, sugerindo o seu papel na
10 manutenção da integridade do genoma (NGUYEN *et al.*, 2020). Homens que possuem
11 variantes em *PALB2* têm um risco de 2-3% maior de desenvolver PCa (LI *et al.*, 2016), com
12 predisposição para uma doença mais agressiva (WOKOŁORCZYK *et al.*, 2021).

13 14 **2.2.5 Outros genes envolvidos no PCa**

15 16 ***Phosphatase and tensin homologue (PTEN)***

17
18 O gene *PTEN*, localizado no cromossomo 10, codifica uma proteína que atua como
19 antagonista da via de sinalização *Phosphoinositide 3-kinase–RAC-alpha serine/threonine-*
20 *protein kinase* (PI3K-AKT), na qual é responsável pelo controle do metabolismo, crescimento
21 e proliferação celular. Desta maneira, o *PTEN* é considerado um supressor tumoral (LEE,
22 CHEN e PANDOLFI, 2018), sendo um dos supressores tumorais mais frequentemente mutados
23 no câncer primário (BARBIERI *et al.*, 2012). No PCa pode ocorrer deleção monoalélica ou
24 completa de *PTEN* (SALMENA, CARRACEDO e PANDOLFI, 2018).

25 26 ***Tumor protein p53 (TP53)***

27
28 O gene *TP53* codifica a proteína p53, conhecida como “guardião do genoma humano”,
29 e está localizado no cromossomo 17. P53 desempenha papel supressor tumoral por atuar como
30 fator de transcrição em resposta ao estresse celular., regulando positivamente alguns de seus
31 genes-alvo, que por sua vez, codificam proteínas de reparo de DNA, desempenham papel no
32 metabolismo, indução de apoptose e inibição do ciclo celular (KASTENHUBER e LOWE,
33 2017). Porém, p53 também pode regular negativamente a expressão de genes associados com
34 a progressão do ciclo celular (ENGELAND, 2018). O gene *TP53*, é o gene mais frequentemente
35 mutado em câncer humano (KASTENHUBER e LOWE, 2017). O gene *TP53* está inativado
36 em aproximadamente 50% dos cânceres e a taxa de mutações varia de acordo com o tipo de

1 tumor (DONEHOWER *et al.*, 2019). Mais de 90% dos cânceres com mutação em *TP53*
2 apresentam inativação em ambos os alelos. Apesar de ser frequente no PCa localizado, a taxa
3 de mutação no *TP53* é maior na doença metastática (28.1% vs. 39%, Prostate Cancer (MSKCC,
4 JCO Precis Oncol 2017).

5

6 ***Cyclin dependent kinase 12 (CDK12)***

7

8 O gene que codifica a quinase *CDK12* está localizado no cromossomo 17, braço q e
9 forma um complexo com a Ciclina K (CycK), que regula o ciclo celular e a transcrição de genes
10 envolvidos na resposta ao dano do DNA, como *BRCA1* e *ATR* (BLAZEK *et al.*, 2011). Através
11 dessa regulação, *CDK12* protege as células da instabilidade genômica (JUAN *et al.*, 2016). O
12 PCa é o câncer com maior frequência de mutações em *CDK12* (MSK-IMPACT Clinical
13 Sequencing Cohort (Zehir *et al.*, Nat Med 2017), podendo ocorrer alterações como deleções e
14 perda de função por mutações truncadas e *missense*. Tais alterações estão presentes no PCa
15 primário, mas são enriquecidas no PCa metastático resistente à castração (mCRPC) (ABIDA *et*
16 *al.*, 2017). A perda bialélica do *CKD12* é recorrente no mCRPC e esse grupo de pacientes é
17 distinto fenotipicamente e geneticamente (WU *et al.*, 2018)

18

19 ***Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1)***

20 O gene *PARP1*, localizado no cromossomo 1q, codifica uma proteína da família de 17
21 proteínas conhecida como PARP (OTTO *et al.*, 2005). Quando ocorre quebra da fita simples
22 de DNA, vários mecanismos de reparo são ativados por fatores incluindo a *PARP1*. Ela
23 contribui para o recrutamento de proteínas de reparo por excisão de nucleotídeos ou de bases
24 (TEYSSONNEAU *et al.*, 2021). A atividade de *PARP1* encontra-se desregulada em vários
25 tipos de câncer e as mutações truncadas são as mais comuns (MSK-IMPACT Clinical
26 Sequencing Cohort (MSKCC, Nat Med 2017)). Quando a função da *PARP1* é deficiente,
27 durante a replicação, a quebra da fita simples de DNA é convertida em quebra da fita dupla.
28 Dessa maneira, é induzido o reparo por recombinação homóloga (HRR), envolvendo outros
29 genes como *BRCA1/2* (SONNENBLICK *et al.*, 2015). Os inibidores de *PARP1* são
30 antagonistas e, portanto, aumentam o número de quebra da fita simples de DNA que são
31 convertidas em quebra da dupla fita. Em células deficientes do HRR, esses inibidores induzem
32 morte celular. Esse fenômeno é conhecido como letalidade sintética, sendo específico para
33 células tumorais com deficiência no HRR (TEYSSONNEAU *et al.*, 2021). Genes como
34 *BRCA2/1*, *ATM*, *CHEK2*, são os mais comumente alterados do HRR, seja por mutações
35 somática e/ou germinativa (ABIDA *et al.*, 2017).

1 **Forkhead Box A1 (*FOXAI*)**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

FOXAI é um fator de transcrição, cujo gene está localizado no braço longo do cromossomo 14, (SAFRAN *et al.*, 2021) e está expresso em diferentes tecidos incluindo fígado, pulmão, bexiga, pâncreas, mama e próstata (BERNARDO e KERI, 2012). Na próstata, ele exerce papel essencial no desenvolvimento e maturação, além de atuar como remodelador de cromatina. Isto é, ele é capaz de se ligar ao DNA e abrir regiões de cromatina condensada, permitindo maior acesso dessas regiões para outros fatores de transcrição se ligarem, incluindo o receptor de andrógeno (*AR*) (AUGELLO; HICKEY; KNUDSEN, 2011). Dessa forma, *FOXAI* contribui para a regulação e sinalização de genes regulados pelo *AR* (GAO *et al.*, 2003). O PCa é o câncer com maior frequência de mutações em *FOXAI* (MSK-IMPACT Clinical Sequencing Cohort (Zehir *et al.*, Nat Med 2017). São encontradas mutações em 12% dos casos de Adenocarcinoma de Próstata primário. As mutações mais frequentes são as *missenses*, mas também são encontradas *inframe* e truncadas (Prostate Cancer (MSKCC, JCO Precis Oncol 2017). Essas mutações tornam o fator de transcrição *FOXAI* um oncogene no PCa, devido ao ganho de função relacionado ao câncer (SHAH e BROWN, 2019).

18 ***Histone-lysine N-methyltransferase 2 (KMT2)***

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

KMT2C e *KMT2D*, também conhecidas como *MLL3* e *MLL2*, são moduladores epigenéticos que fazem parte da família de proteínas *Histone-lysine N-methyltransferase 2* (*KMT2*). O gene *KMT2C* está localizado no cromossomo 7, enquanto *KMT2D* está no cromossomo 12 (SAFRAN *et al.*, 2021). Ambas as proteínas metilam o resíduo de lisina 4 na cauda da histona H3 (H3K4) promovendo acessibilidade genômica aumentada e recrutamento de ativadores transcricionais (RAO e DOU, 2015). Mutações nos genes da família *KMT2* estão associados ao câncer (FORD e DINGWALL, 2015).

28 ***Speckle-type POZ protein (SPOP)***

29

30

31

32

33

34

35

36

O gene *SPOP*, localizado no cromossomo 17, age como supressor tumoral participando da ubiquitinação e subsequente degradação de muitas proteínas através dos seus domínios N-terminal, *Meprin and Traf Homology* (*MATH*) e C-terminal *Bric-a-brac-Tramtrack-Broad complex* (*BTB*) (GENG *et al.*, 2013). O PCa é o câncer com maior frequência de mutações em *SPOP*, seguido pelo câncer endometrial (MSK-IMPACT Clinical Sequencing Cohort (Zehir *et al.*, Nat Med 2017). Tais mutações estão associadas com PCa localizado e metastático. As mutações estão enriquecidas no evento clonal precoce do PCa, sendo mais frequentes no

1 domínio MATH. As mutações em *SPOP* reduzem a afinidade da proteína *SPOP* por seus
2 substratos, aumentando o nível de expressão dos mesmos, (BARBIERI *et al.*, 2012), entre eles
3 o receptor de andrógeno (*AR*), cujo o nível de expressão aumenta nestas condições (GENG *et*
4 *al.*, 2013).

5 6 ***Adenomatous polypsis coli (APC)***

7
8 O gene *APC*, localizado no cromossomo 5q, codifica uma proteína reguladora chave
9 dos níveis de β -catenina, uma proteína oncogênica da via de sinalização Wnt e, portanto, está
10 envolvido na migração e adesão celular, ativação da transcrição e apoptose (WANG *et al.*,
11 2018). Quando a função de *APC* é perdida, há um aumento dos níveis citosólicos de β -catenina,
12 que, se liga a fatores de transcrição e aumenta a ativação da via Wnt, podendo levar à
13 tumorigênese (PEIFER, 1993) (WACHSMANNOVA *et al.*, 2017). Mais de 90% dos pacientes
14 com câncer de colón apresentam mutação no *APC*, mas, a perda de função de *APC* através de
15 mutações ou de hipermetilação pode ocorrer em diferentes tipos de câncer, incluindo PCa
16 (STEFANSKI e PROSPERI, 2020). No PCa ocorrem principalmente deleções e mutações
17 truncadas, especialmente em tumores metastáticos (ABIDA *et al.*, 2017).

18 ***Androgen receptor (AR)***

19 O gene *AR*, localizado no cromossomo Xq, codifica o receptor nuclear que se comporta
20 como fator de transcrição dependente do ligante e controla a expressão de genes específicos,
21 como PSA e *Transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)* (TAN *et al.*, 2015). A sinalização
22 do *AR* permanece ativa e é fundamental para o crescimento e sobrevivência celular no PCa
23 (SHEN *et al.*, 2021), que é o câncer com maior frequência de mutações no *AR* (MSK-IMPACT
24 Clinical Sequencing Cohort (Zehir *et al.*, Nat Med 2017), com frequência de alterações
25 aumentada no mCRPC comparada à doença localizada. Mutações *missenses* são as alterações
26 mais comuns na doença localizada enquanto no mCRPC são amplificações (ABIDA *et al.*,
27 2017).

28 29 ***Kallikrein related peptidase 3 (KLK3)***

30
31 Localizado no cromossomo 19q, o gene *KLK3*, é membro da superfamília *Kallikrein*,
32 responsável por codificar a proteína PSA (LAI *et al.*, 2007). A expressão das proteínas
33 *Kallikrein* é regulada por hormônios esteroides, incluindo estrógenos e andrógenos
34 (LAWRENCE, LAI e CLEMENTS, 2010). Dentre as proteínas da família, a *KLK3* é a mais
35 estudada na progressão tumoral. Ela está amplamente expressa na próstata (SHAW e

1 DIAMANDIS, 2007). *KLK3* pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio em
2 células do PCa (SUN, DONALD e PHANG, 2001), modular resposta imune (KODAK *et al.*,
3 2006), aumentar a migração das células da próstata quando super expressa (VEVERIS-LOWE
4 *et al.*, 2005), e a expressão de genes regulados por andrógeno, no câncer de próstata resistente
5 a castração, por se ligar ao cofator do AR, o ARA70 (NIU *et al.*, 2008). Vários *Single nucleotide*
6 *polymorphisms* (SNPs) na região promotora do *KLK3* têm sido associados com níveis mais
7 altos de PSA e, portanto, risco de PCa (EELES *et al.*, 2008) (Li *et al.*, 2020).

8 ***Growth factor independent 1B transcriptional repressor (GFI1B)***

9

10 Localizado no cromossomo 9q, o gene *GFI1b* é um repressor transcricional expresso
11 em células tronco hematopoéticas. Ele é essencial para hematopoese e sobrevivência celular de
12 órgãos sólidos por ser antagonista da via de sinalização Notch. Mutações nesse gene estão
13 principalmente relacionadas com neutropenia severa (ANGUITA *et al.*, 2017), mas também,
14 no desenvolvimento de câncer. No carcinoma de pulmão de células não pequenas e colorretal
15 há perda do *GFI1b*, mas pouco se sabe sobre a sua função no PCa. Parece haver silenciamento
16 epigenético (hipermetilação) no *GFI1B* e redução da proliferação celular no PCa (ASHOUR *et*
17 *al.*, 2020).

Tabela 1. Genes associados ao PCa, locus e suas funções biológicas.

Gene	Locus	Função biológica	Referências
<i>BRCA1</i>	17q21.31	Supressor tumoral, reparo de DNA (Quebra de dupla fita), estabilidade genômica	Mateo <i>et al.</i> 2015 Robinson <i>et al.</i> 2015 ROY, CHUN e POWELL, 2012
<i>BRCA2</i>	13q13.1	Supressor tumoral, reparo de DNA (Quebra de dupla fita), estabilidade genômica	Mateo <i>et al.</i> 2015 Robinson <i>et al.</i> 2015 ROY, CHUN e POWELL, 2012
<i>NBN</i>	8q21.3	Resposta ao dano DNA (reparo da quebra da dupla fita), ciclo celular.	CARNEY <i>et al.</i> , 1998 CARSON <i>et al.</i> , 2003
<i>HOXB13</i>	17q21.32	Regulação da atividade do AR.	OUHTIT <i>et al.</i> , 2016
<i>ATR</i>	3q23	Ciclo celular, inibição da replicação, reparo DNA, apoptose.	BRUNO <i>et al.</i> , 2006 RAFIEI <i>et al.</i> , 2020
<i>MLH1</i>	3p22.2	Supressor tumoral, reparo mismatch, estabilidade genômica.	LIPKIN <i>et al.</i> , 2000
<i>MSH6</i>	2p16.3	Supressor tumoral, reparo mismatch, estabilidade genômica.	SHARMA, YANG e MIYAMOTO, 2020
<i>PALB2</i>	16p12.2	Resposta ao dano DNA (reparo da quebra da dupla fita)	ZHANG <i>et al.</i> , 2009
<i>CHEK2</i>	22q12.1	Regulador do ciclo celular (<i>checkpoint</i>)	ZANNINI, DELIA e BUSCEMI, 2014
<i>FOXA1</i>	14q21.1	Desenvolvimento embrionário, genes regulados pelo AR	AUGELLO, HICKEY e KNUDSEN, 2011
<i>KMT2C</i>	7q36.1	Metiltransferase, organização da cromatina.	RAO e DOU, 2015
<i>KMT2D</i>	12q13.12	Metiltransferase, organização da cromatina.	RAO e DOU, 2015

Tabela 2. Continuação da Tabela 1.

<i>SPOP</i>	17q21.33	Componente do complexo de ubiquitinação.	RAO e DOU, 2015
<i>PTEN</i>	10q23.31	Supressor tumoral, antagonista da via PI3K–AKT–mTOR (regula ciclo celular).	LEE, CHEN e PANDOLFI, 2018
<i>TP53</i>	17p13.1	Supressor tumoral, ciclo celular, apoptose, reparo de DNA.	KASTENHUBER e LOWE, 2017
<i>APC</i>	5q22.2	Supressor tumoral, antagonista da via WNT, migração celular, adesão e apoptose.	Grasso <i>et al.</i> 2012 WANG <i>et al.</i> , 2018
<i>AR</i>	Xq12	Fator de transcrição dependente de hormônio esteróide.	TAN <i>et al.</i> , 2015
<i>PARP1</i>	1q42.12	Reparo do DNA (fita simples).	TEYSSONNEAU <i>et al.</i> , 2021
<i>CDK12</i>	17q12	Ciclo celular, expressão gênica (transcrição genes envolvidos no reparo de DNA).	(BLAZEK <i>et al.</i> , 2011).
<i>KLK3</i>	19q13.33	Codifica proteína PSA.	LAI <i>et al.</i> , 2007).
<i>GFI1B</i>	9q34.13	Repressor transcricional, regulador epigenético.	ASHOUR <i>et al.</i> , 2020

2.2.6 Diagnóstico e prognóstico do PCa

O diagnóstico do PCa inclui a combinação de dois exames: a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) no sangue e o exame de toque retal (INCA, 2020). O PSA é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais normais bem como pelas células malignas da próstata, sendo utilizado como biomarcador do PCa desde a década de 90. São considerados normais níveis de PSA até 10 ng/dL (CATALONA *et al.*, 1991). O nível elevado de PSA é indicativo para uma avaliação mais cuidadosa. No entanto, nem todo indivíduo que apresenta alteração no nível do PSA cursa com câncer. Existem alguns fatores como idade avançada, etnia, medicamentos e condições de inflamação da próstata que também podem elevar o nível do PSA (ADHYA e GUPTA, 2012). O exame de toque retal é um exame físico realizado pelo médico especialista em Urologia para avaliar a extensão da próstata. Entretanto, o único exame capaz de confirmar o diagnóstico é o estudo histopatológico do tecido obtido pela biópsia da próstata (INCA, 2021).

As recomendações de rastreamento em homens variam entre os países, mas no Brasil a Sociedade Brasileira de Urologia recomenda que os homens, em geral, comecem a partir dos 50 anos. Os indivíduos que apresentam maior risco de desenvolver a doença, ou seja, homens de raça negra ou com parente de primeiro grau com PCa, devem começar aos 45 anos.

Após o diagnóstico, é necessário avaliar a extensão da doença para estratificar o risco e assim definir o tratamento mais adequado. Essa avaliação é feita através do nível de PSA, juntamente com as características histopatológicas do tumor (escore de Gleason e/ ou *International Society of Urological*, grau ISUP) e o estágio clínico da doença (sistema de estadiamento de Tumor primário, Linfonodos e Metástase à distância, TNM).

O escore de Gleason e/ou grau ISUP classifica o tecido tumoral em bem diferenciado (baixo grau) ou pouco diferenciado (alto grau). Indivíduos com escore de Gleason ≤ 6 , são classificados com grau ISUP 1, indivíduos com Gleason 3+4=7, são classificados com grau ISUP 2, já aqueles com Gleason 4+3=7, são classificados com grau ISUP 3, Gleason 4+4=8, são classificados com grau ISUP 4 e Gleason ≥ 9 , são classificados com grau ISUP 5 (EPSTEIN *et al.*, 2016) (**Figura 6**). Quanto maior o escore de Gleason e/ou o grau ISUP, menos diferenciado é o tumor, e, portanto, maior a agressividade da doença.

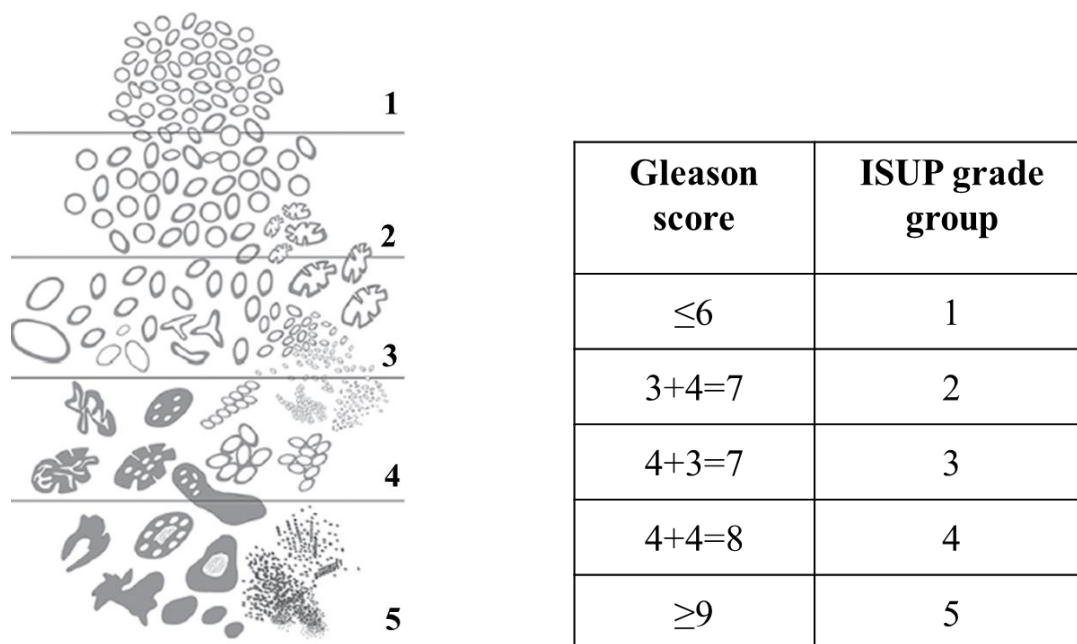


Figura 6. Classificação do tecido tumoral através do escore de Gleason e/ou grau ISUP. Figura adaptada de EPSTEIN *et al.*, 2016.

1
2
3
4
5
6
7
8
9

A classificação TNM avalia a extensão anatômica do tumor, onde T é a extensão do tumor primário, N: presença e/ou ausência e a extensão de metástase em linfonodos regionais e M: presença e/ou ausência de metástase à distância (**Tabela em anexo**) (SOBIN, GOSPODAROWICZ e WITTEKIND, 2011). Baseado nos achados mencionados anteriormente, o indivíduo é estratificado de acordo com o risco da doença em baixo, intermediário ou alto (**Figura 7**). Após a estratificação o médico Urologista escolhe a melhor conduta a ser tomada.

Tipo de risco	Parâmetros
Baixo	cT1–cT2a, PSA <10 ng/ml e ISUP grau 1
Intermediário	cT2b ou PSA >10–20 ng/ml ou ISUP grau 2/3
Alto	>cT2b ou PSA >20 ng/ml ou ISUP grau >3

Figura 7. Classificação de risco (baixo, intermediário ou alto) baseado nos parâmetros citados anteriormente.

10
11
12
13
14

2.2.7 Tratamento do PCa

A escolha do tratamento do paciente deve ser personalizada, sendo avaliados os riscos e benefícios. Desta maneira, não é analisado apenas o estágio clínico da doença e as

1 características histopatológicas, mas também as características de cada indivíduo, como
2 expectativa de vida, história familiar e condições de saúde (REBELLO *et al.*, 2021).

3 A doença localizada, ou seja, o câncer totalmente confinado dentro da próstata, é
4 responsável por cerca de 80% dos diagnósticos, seguido por metástase em linfonodos regionais
5 (15%) e metástase à distância (5%) (SIEGEL, MILLER e JEMAL, 2018).

6 Para doença confinada na próstata (pacientes pT1-T2, N0, M0) podem ser considerados
7 vigilância ativa (VA), *Watchful waiting* (WW), Prostatectomia radical (PR) e Radioterapia (RT)
8 externa e/ou Braquiterapia. A VA é indicada para pacientes de baixo risco e nessa abordagem
9 o paciente é acompanhado com a realização de sucessivos exames de PSA e biópsias, afim de
10 acompanhar a evolução da doença (MOTTET *et al.*, 2017). A abordagem WW é um tratamento
11 paliativo de acordo com os sintomas, indicada para pacientes com expectativa de vida menor
12 que 10 anos (ALBERTSEN, HANLEY e FINE, 2005). A intenção dessas duas estratégias é
13 melhorar o manejo da doença, enquanto a PR e a RT têm intenção curativa. A PR é a retirada
14 da próstata, podendo ser por via aberta (perineal ou retropúbica) e laparoscópica ou robótica
15 (REBELLO *et al.*, 2021).

16 Para os pacientes com doença metastática, isto é, a doença que envolve não só a próstata,
17 mas também outros sítios, a terapia de deprivação de andrógeno (ADT) via castração cirúrgica
18 (remoção dos testículos, orquiectomia) ou química (análogos do hormônio liberador de
19 gonadotrofina) (PALMBOS e HUSSAIN, 2013) é o tratamento padrão ouro. Além disso,
20 podem ser adicionados RT e inibidores de sinalização de receptor de andrógeno (AR)
21 (REBELLO *et al.*, 2021).

22 Pacientes que não respondem à primeira linha de ADT são definidos como pacientes
23 resistentes à castração (mCRPC). Diferentes mecanismos podem promover resistência à
24 castração, como I) super expressão do AR com esteroidogênese tumoral continuada, II)
25 ativação de AR mutante através de ligantes alternativos (estrogênio, progesterona,
26 glicocorticoides e flutamida), III) ativação do AR independente do ligante (quinases fosforilam
27 o AR e estimulam a transcrição dos genes alvos do AR) e IV) vias independentes do AR, nas
28 quais as células cancerígenas crescem e sobrevivem (via de sinalização Stat3 ou através da
29 regulação positiva da proteína BCL-2) (**Figura 8**). Esses pacientes geralmente são tratados com
30 quimioterapia, como docetaxel (TAN *et al.*, 2015), inibidores de polimerase e imunoterapia
31 (REBELLO *et al.*, 2021).

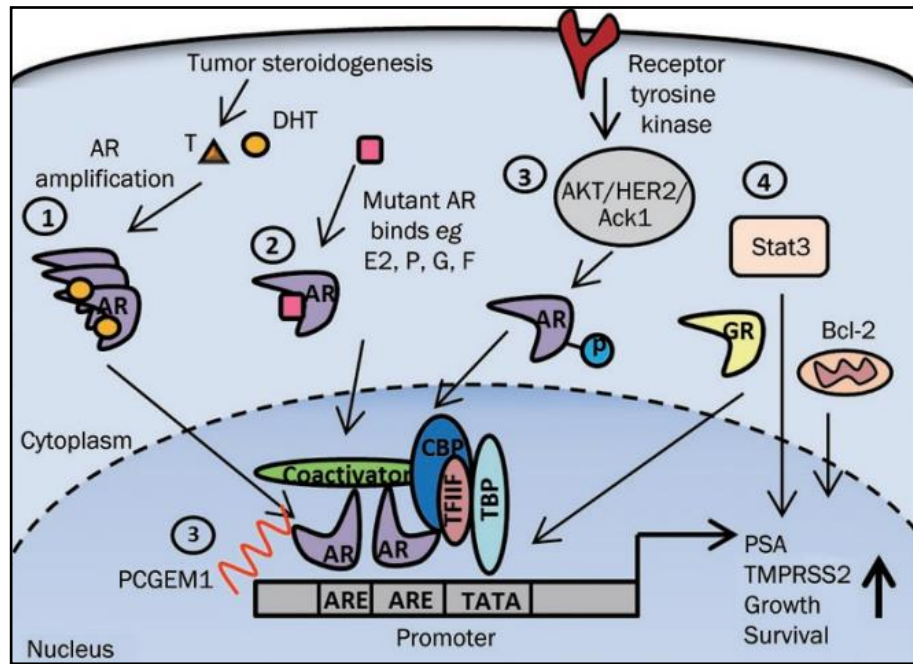


Figura 8. Mecanismos do câncer de próstata resistente à castração (mCRPC). Fonte: TAN *et al.*, 2015.

3. OBJETIVOS

1 **3.1 Objetivo geral**

2

3 3.1.1 Sequenciar o exoma de um painel de genes em DNA de sangue periférico de pacientes
4 com PCa diagnosticados com idade até 55 anos e após os 60 anos, em busca de biomarcadores
5 capazes de melhorar a estratificação de risco nestes diferentes grupos etários.

6

7 **3.2 Objetivos específicos**

8

9 3.2.1 Comparar o padrão de variantes encontradas nas células de sangue periférico de
10 pacientes com diagnóstico precoce (com idade até 55 anos) e tardio de PCa (após os 60
11 anos);

12 3.2.2 Correlacionar a ocorrência das variantes com dados clinicopatológicos dos pacientes.

4. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

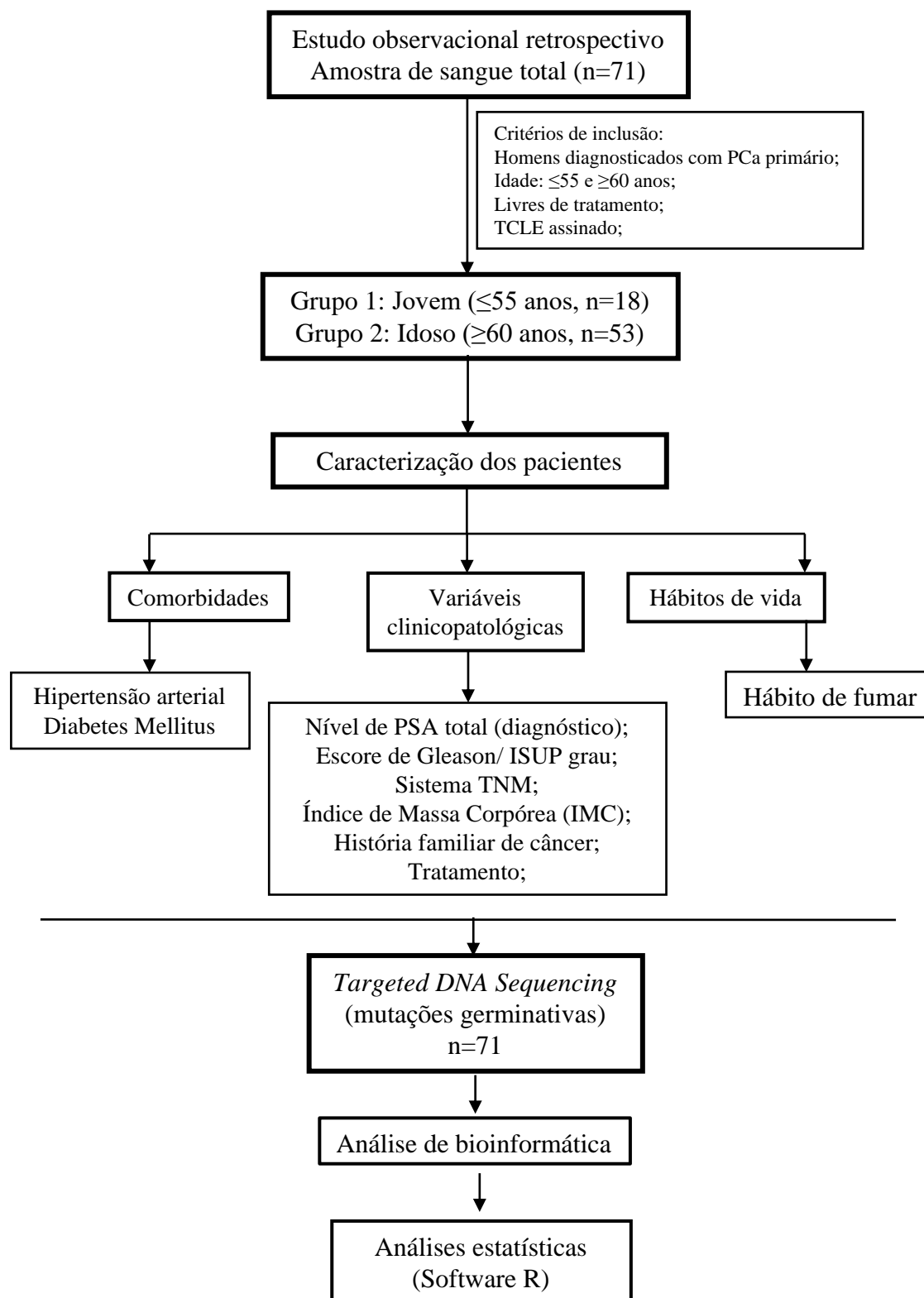
1 **4.1 Justificativa**

2 A maioria dos estudos sobre câncer de próstata baseia-se em pacientes idosos (≥ 60
3 anos), pois essa doença é mais frequente nessa faixa etária. No entanto, o PCa também ocorre
4 em pacientes jovens, para os quais a prostatectomia e a radioterapia podem ter maior impacto
5 sobre a qualidade de vida, considerando-se o tempo maior em que conviverão com as
6 complicações pós-tratamento. A ocorrência dessas complicações tem levado muitos médicos e
7 pacientes a optarem pela vigilância ativa, sem imposição imediata de tratamento. Embora essa
8 seja uma boa alternativa para uma parcela grande dos casos, é necessário um melhor
9 acompanhamento, com dosagem de PSA e consultas frequentes. Neste âmbito, a introdução de
10 novos biomarcadores de acompanhamento seria muito oportuna. Além disso, existem relatos
11 controversos na literatura sobre uma possível maior agressividade e evolução mais rápida dos
12 tumores de próstata em indivíduos mais jovens, destacando a importância de se encontrar novos
13 biomarcadores que auxiliem na correta estratificação de risco e acompanhamento destes
14 pacientes. O presente estudo propõe a busca por biomarcadores, genéticos, com potencial uso
15 para melhoria dos critérios de classificação e estratificação de risco no PCa. Tais biomarcadores
16 permitiriam acompanhar de forma mais personalizada os pacientes com diagnóstico em idade
17 precoce (≤ 55 anos) e tardio (≥ 60 anos). Para identificar estes biomarcadores, o estudo propôs
18 uma comparação das alterações genéticas encontradas em células de sangue periférico de
19 pacientes com PCa jovens com as que ocorrem em pacientes com idade mais avançada (≥ 60
20 anos). Bons biomarcadores diferenciais permitirão a seleção correta de pacientes para vigilância
21 ativa, com impacto direto na melhoria da qualidade de vida destes pacientes. Além disso,
22 haveria impacto financeiro com diminuição de custos de internação, cirurgias e tratamentos
23 desnecessários.

24 **4.2 Hipótese**

26 Existem muitas dúvidas em relação à agressividade e à conduta terapêutica em pacientes jovens
27 com PCa, principalmente em comparação com o que é atualmente aceito para os pacientes
28 idosos. Acreditamos que existam biomarcadores genéticos que possam auxiliar na
29 estratificação de risco e estabelecimento de VA de forma mais personalizada de acordo com a
30 faixa etária de diagnóstico do PCa.
31

5. DESENHO DO ESTUDO



6. MATERIAIS E MÉTODOS

1 **6.1 Pacientes e aspectos éticos**

2
3 Trata-se de um estudo observacional retrospectivo, no qual foram incluídas amostras de
4 sangue total de 71 pacientes diagnosticados com tumores de próstata primários entre 2019 e
5 2021 no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (HCRP), em São Paulo e no Hospital Erasto
6 Gaertner (HEG), no Paraná. Para caracterização da nossa amostra dividimos os pacientes em
7 dois grupos, de acordo com a idade: 1) Jovem (≤ 55 anos, $n=18$) e 2) Idoso com PCa (≥ 60 anos,
8 $n=53$). Este projeto está vinculado aos biorrepositórios criados juntamente com os projetos
9 aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP, com números CAAE
10 12905319.1.3001.0040 e 92224618.7.0000.5440. Em paralelo, o projeto também foi aprovado
11 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HEG, com número CAAE 36931020.9.1001.0098. A
12 participação dos pacientes foi de forma voluntária, consciente, livre e esclarecida. Portanto,
13 todos os pacientes foram incluídos mediante explicação verbal sobre a sua participação no
14 projeto e subsequente assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os
15 dados clinicopatológicos disponíveis foram retirados dos prontuários eletrônicos.

16 **6.2 Critérios de inclusão:**

- 17 ▪ Homens diagnosticados com PCa primário;
- 18 ▪ Idade: ≤ 55 e ≥ 60 anos;
- 19 ▪ Livres de tratamento;
- 20 ▪ Aceitação de participação no estudo;

21 Variáveis clinicopatológicas, comorbidades e hábito de vida avaliadas:

- 22 ▪ Índice de Massa Corpórea (IMC);
- 23 ▪ Nível de PSA total (ng/dL) no momento do diagnóstico;
- 24 ▪ Escore de Gleason;
- 25 ▪ ISUP grau;
- 26 ▪ Sistema TNM;
- 27 ▪ História familiar de câncer positiva;
- 28 ▪ Tratamento;
- 29 ▪ Comorbidades (Diabetes Mellitus e Hipertensão Arterial);
- 30 ▪ Hábitos de fumar;

31

1 **6.3 Coleta das amostras**

2
3 As amostras de sangue total dos 71 pacientes foram obtidas antes de iniciar quaisquer
4 tratamentos específicos para o PCa. O sangue foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos, e o
5 *buffy coat* foi usado para extração do DNA genômico.

6 **6.4 Sequenciamento**

7 **6.4.1 Extração do DNA (método *Salting out*)**

8
9
10
11 Para extração do DNA genômico, ressuspende-se a nuvem de leucócitos (*buffy coat*) da
12 primeira centrifugação do sangue total em tampão de lise II, SDS 10% e perclorato de sódio na
13 concentração (NaClO₄) na concentração 0,5 Molar. O Vórtex foi utilizado para homogeneizar
14 o precipitado por 10 segundos, à temperatura ambiente. Para precipitação de proteínas foi
15 adicionado Cloreto de Sódio (NaCl) na concentração 6 Molar. Posteriormente, foi realizada a
16 centrifugação a 3500 rpm/min, por 5 minutos em temperatura ambiente. Com cuidado, o
17 sobrenadante foi vertido sobre o Isopropanol absoluto para haver a precipitação do DNA, que
18 foi lavado em seguida com Etanol 70%. Após a lavagem, o precipitado do DNA foi desidratado
19 à temperatura ambiente. Por fim, o precipitado seco é eluído com 100-300 microlitros (µL) de
20 Tampão TE 1X.

21 22 **6.4.2 Purificação do DNA genômico**

23
24 Após a obtenção do DNA, submetemos o mesmo à purificação com o kit *DNA Clean &*
25 *Concentrator -100* (Zymo Research). Em um microtubo, preparamos o mix com 200 µL do
26 *Binding buffer* e 100 µL do DNA extraído (proporção 2:1). Em seguida esta mistura foi
27 adicionada à coluna com o filtro *Zymo-Spin V* devidamente encaixa em um tubo coletor.
28 Centrifugamos em uma microcentrífuga a 10.000g durante 1 minuto, descartamos o
29 sobrenadante e adicionamos 600 µL de *DNA Wash buffer* no orifício da coluna *Zymo-Spin V*
30 *column*, centrifugamos a 10.000g por 1 minuto e descartamos o líquido que passou na coluna.
31 Repetimos o passo anterior da lavagem e centrifugação. Seguimos com mais uma centrifugação
32 a 10.000g por 30 segundos para remover qualquer resíduo do *DNA Wash buffer*. Transferimos
33 a coluna *Zymo-Spin V column* para um novo microtubo de 1,5 mL e adicionamos 150 µL de
34 *DNA elution buffer* no centro do filtro da coluna. Esperamos a coluna hidratar (1 minuto), em

1 seguida centrifugamos a 10.000g por 1 minuto para eluir o DNA. Descartamos a coluna e
2 obtivemos 150 µl de DNA ultrapuro pronto para uso. O DNA foi quantificado em equipamento
3 Nanodrop 2000 (Thermo Fisher) e armazenado a -80°C.

4 O DNA dos pacientes do HCRP (n=48) foi enviado em gelo seco para o Instituto Carlos
5 Chagas (ICC/Fiocruz Paraná) onde foi feita a seleção dos pacientes para o sequenciamento.
6 Foram selecionados 30 pacientes do HCRP e 50 pacientes do HEG. Sendo assim, foi realizado
7 a secagem à vácuo do DNA destes 80 pacientes, em equipamento SpeedVac (Thermo Fisher),
8 por 1 hora e enviados para Arbor Biosciences (*Michigan*, Estados Unidos) para serem
9 sequenciados.

10

11 **6.4.3 Seleção dos pacientes**

12 Com objetivo de deixar os grupos mais homogêneos possíveis, selecionamos 71
13 pacientes 1) jovem (≤ 55 anos, n= 18) e 2) idoso (≥ 60 anos, n= 53) para serem sequenciados,
14 de acordo com o escore de Gleason e o estadiamento TNM.

15

16 **6.4.4 Sequenciamento de nova geração (NGS)**

17

18 O sequenciamento NGS foi direcionado (targeted) de forma a selecionar sequências
19 codificadoras completas, incluindo 1000 pares de bases da região 5'UTR e 100 bases da região
20 3'UTR dos genes BRCA1/2, MLH1, MSH6, CDK12, PALB2, CHEK2, TP53, PTEN,
21 HOXB13, KLK3, APC, KMT2C/D, FOXA1, SPOP, AR, ATR, GFI1B, NBN e PARP1, para
22 identificação de mutações germinativas. Para isso, foi empregada a tecnologia MyBaits Custom
23 DNA-Seq (Daicel Arbor Biosciences), baseada em captura com uso de sondas biotinizadas
24 específicas para regiões genômicas. O serviço de sequenciamento foi contratado e realizado
25 pela própria Daicel Arbor Biosciences.

26

27 **6.4.5 Etapas do sequenciamento NGS**

28

29 A primeira etapa é a construção da biblioteca de sequenciamento NGS. Para essa etapa,
30 foi empregado o Kit *TruSeq DNA HT Sample Prep (Illumina)*. Uma biblioteca de
31 sequenciamento é um conjunto de pequenos fragmentos de DNA de tamanhos variados (150-
32 500 pares de base). Para a construção, é necessário fragmentar o DNA e adicionar adaptadores
33 e indexes (biomarcadores de amostra) a ambas as extremidades dos fragmentos. Esses
34 adaptadores possuem sequências complementares a oligonucleotídeos que se encontram na
35 superfície da lâmina de sequenciamento (*flow cell*). Com essa biblioteca de NGS-DNA, é feito

1 o enriquecimento para que sejam selecionadas apenas as regiões de interesse, ou alvos
2 (*Targeted sequencing*).

3 A segunda etapa é de hibridização na qual a biblioteca de NGS gerada é desnaturada
4 por calor e hibridizada com uma mistura complexa de “*baits*” ou iscas de DNA biotilado
5 complementares às regiões de interesse. A ligação de adaptadores de oligonucleotídeos inibe o
6 anelamento aleatórios das moléculas da biblioteca a sítios comuns contidos nos adaptadores.

7 A terceira etapa consiste na ligação da biotina contida nas “*baits*” a esferas magnéticas
8 cobertas com estreptavidina, seguida de várias lavagens para remoção de moléculas não-alvo
9 com ligação inespecífica (*off target*) ou de forma instável (baixa hibridação).

10 A última etapa é de amplificação, na qual as moléculas da biblioteca que se ligaram aos
11 “*baits*” complementares são desnaturadas e amplificadas utilizando primers universais para as
12 bibliotecas, o que permite enriquecer a biblioteca para o sequenciamento propriamente dito,
13 que é feito em plataforma Illumina NovaSeq 6000. A biblioteca pronta, contendo as regiões-
14 alvo selecionadas com as “*baits*” é então ligada à *flow cell* (clusterização) e depois disso o
15 sequenciamento pode ser iniciado. A tecnologia SBS (“*Sequencing-by-Synthesis*”) é utilizada
16 nos sequenciadores da plataforma Illumina e baseia-se na terminação da síntese da cadeia de
17 DNA após a detecção do sinal fluorescente. Por terminação entende-se a clivagem do
18 nucleotídeo marcado já detectado que possibilita a adição do próximo nucleotídeo. Os eventos
19 de incorporação e clivagem do nucleotídeo marcado e modificado ocorrem sucessivas vezes,
20 permitindo, desta forma, a leitura base a base e ao mesmo tempo elimina possíveis erros em
21 sequências com repetições da mesma base (regiões homopoliméricas).

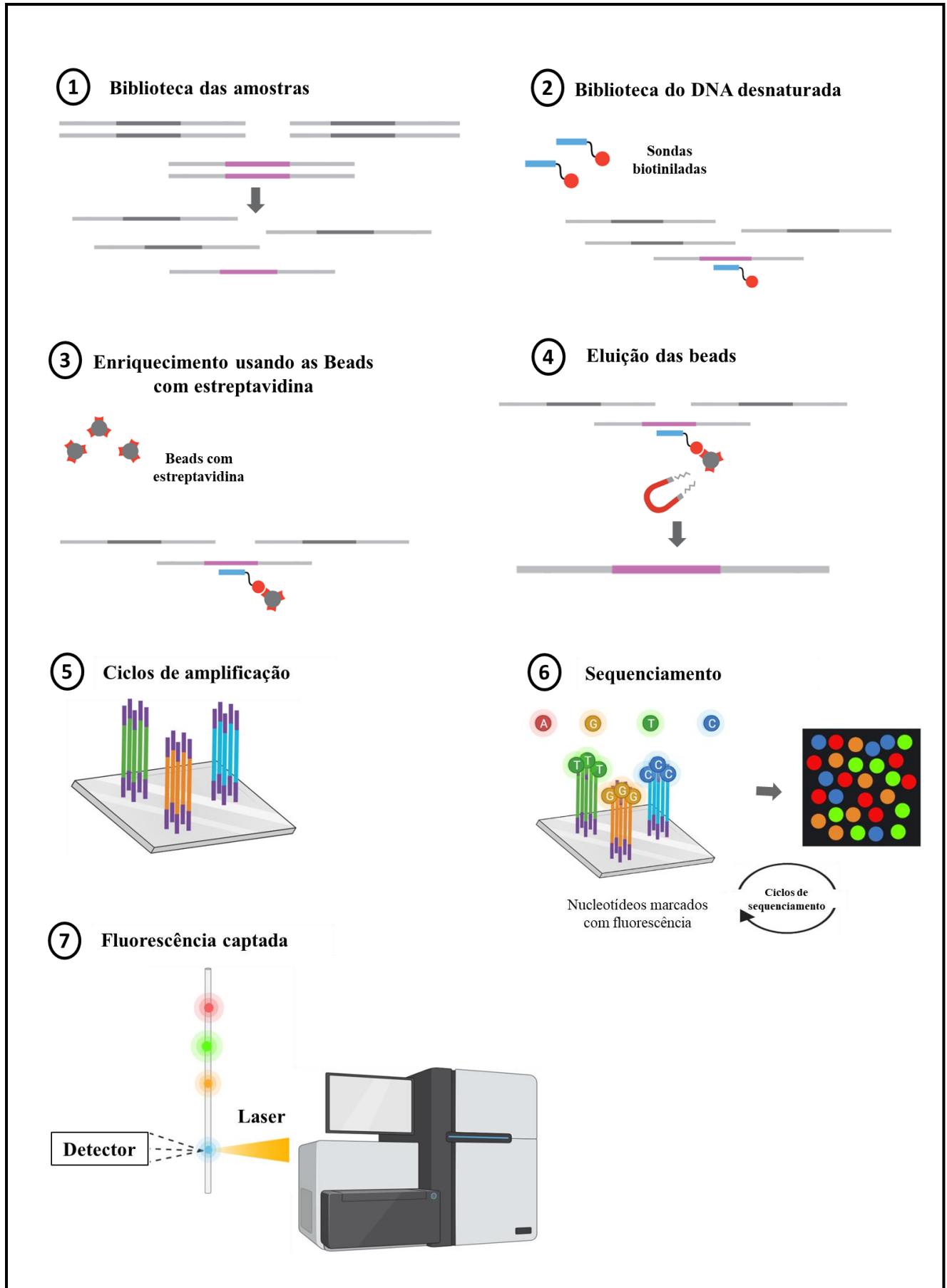


Figura 9. Workflow do sequenciamento NGS (Plataforma Illumina).

1 **6.5. Análise dos dados – bioinformática**

2 A análise de variante germinativa para os dados de sequenciamento de exoma foi
3 executada de acordo com as boas práticas do Genome Analysis Toolkit (GATK) (MCKENNA
4 *et al.*, 2010), as quais compreende as etapas de alinhamento, pré-processamento e chamada de
5 variante. Resumidamente, o software BWA-mem (LI, 2013) (v0.7.17-r1188) foi utilizado para
6 alinhamento dos arquivos FASTQ (reads) contra a sequência de referência do genoma humano
7 (GRCh37/hg19). O BWA foi executado com os parâmetros padrões, exceto para o número de
8 threads que foi definido para 8 para um processamento mais rápido.

9 Os arquivos alinhados (BAMs) foram pré-processados utilizando o GATK versão 4.2,
10 seguindo os passos: MarkDuplicates, BaseRecalibrator e ApplyBQSR. O programa
11 MarkDuplicates foi executado com os parâmetros padrões e esse passo consiste na identificação
12 de pares de reads que podem ter sido geradas a partir de duplicatas dos mesmos fragmentos de
13 DNA. Os programas BaseRecalibrator e ApplyBQSR foram executados com os parâmetros
14 padrões, exceto para o número de threads que foi definido para 8 para um processamento mais
15 rápido, e esse passo consiste na aplicação de um algoritmo de machine learning para detectar e
16 corrigir erros nos valores da qualidade de cada base gerado pelo sequenciador.

17 Para identificação das variantes, o passo HaplotypeCaller foi executado com os parâmetros –
18 ERC GVCF por amostra. A partir dos arquivos gVCF por amostra, foram executados os passos
19 GenomicsDBImport, GenotypeGVCFs e MergeVcfs, caracterizando a identificação de
20 variantes no formato ‘joint analysis’. As variantes identificadas foram anotadas com os
21 softwares snpEff e SnpSift utilizando vários bancos de polimorfismos, como dbNSFP, dbSNP
22 e ABRaOM. Em seguida, as variantes foram filtradas aplicando hard filters, uma vez que o
23 número de amostras não permitir a execução do passo de VQSR.

24 Os filtros utilizados foram: QD<2.0, QUAL<30.0, SOR>3.0, FS>60.0 (FS>200 para
25 INDELs), MQ<40.0 (somente para SNPs), MQRankSum<-12.5 (somente para SNPs),
26 ReadPosRankSum<-8.0 (ReadPosRankSum<-20.0 par INDELs), dbNSFP_ExAC_AF>=0.01,
27 dbNSFP_1000Gp3_AF>0.01, dbNSFP_gnomAD_exomes_AF>0.01 e
28 ABRaOM_Frequencies>0.01. Por fim, as variantes foram anotadas com o passo Funcotator e
29 um arquivo MAF foi gerado.

30

31 **6.6 Avaliação de dados clinicopatológicos**

32

33 Os dados clinicopatológicos foram coletados a partir dos prontuários eletrônicos do HCRP
34 e HEG. Os dados obtidos foram no momento do diagnóstico: escore de Gleason, grau ISUP,

1 estadiamento TNM, nível de PSA, idade, peso, altura, IMC, história familiar de câncer,
2 presença/ausência de Hipertensão arterial e Diabetes Mellitus e hábito de fumar.

3

4 **6.7. Análises de sobrevivência e sobrevida livre de doença em coortes de PCa**

5

6 Para análise de sobrevivência (OS) utilizamos dados públicos de mutação somática da
7 coorte TCGA, *Pan cancer*, 2018 (n=494). Estes dados de sequenciamento estão disponíveis
8 em: <https://www.cbioportal.org/>. Adicionalmente, para análise de sobrevida livre de doença
9 (DFS) utilizamos os dados do *ICGC Prostate Cancer Project* (PRAD-US + PRAD-UK,
10 n=613), disponíveis em: <https://dcc.icgc.org/>.

11

12 **6.8 Análise Estatística**

13

14 Teste exato de Fisher foi utilizado para verificar associações entre as variáveis qualitativas.
15 O método Kaplan-Meier foi utilizado para as análises de sobrevivência (*Log-rank Test*). O teste
16 de Wilcoxon para amostras independentes foi utilizado para comparar as distribuições do nível
17 de PSA total. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R. O nível de
18 significância foi estabelecido em $\alpha=0.05$.

7. RESULTADOS

1 7.1 Caracterização dos pacientes

2 7.1.1 Idade

3 Foram incluídos no estudo 71 homens com PCa primário e livres de tratamento,
4 estratificados em dois grupos de acordo com a faixa etária: 1) jovem (≤ 55 anos, $n=18$) e 2)
5 idoso (≥ 60 anos, $n=53$). A faixa de idade do grupo 1 foi 45-55 anos e a do grupo 2 60-80 anos.
6 A média de idade dos pacientes jovens foi de 51.39 anos e dos pacientes idosos foi de 70.15
7 anos (desvios-padrão de 3,7 e 4,54, respectivamente) (**Figura 10, Tabela 3**).

8

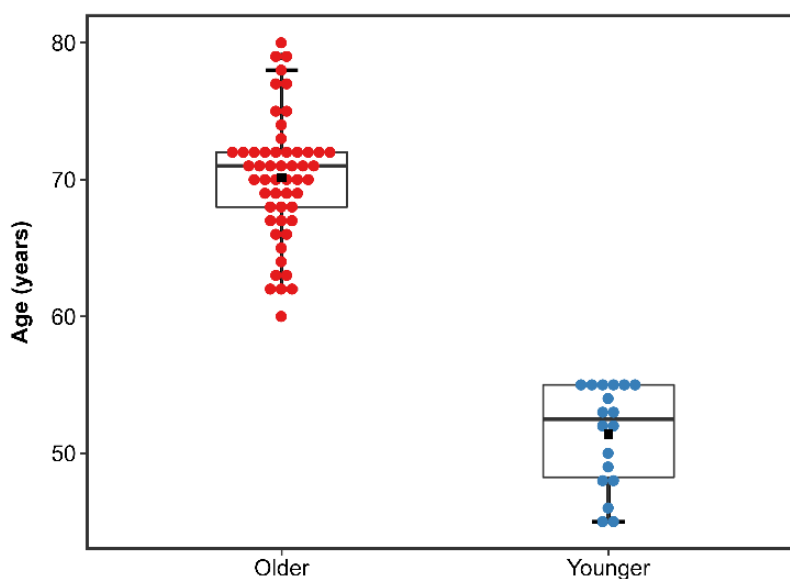


Figura 10. Diferença de idade média entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).

9

10 7.1.2 Índice de Massa Corpórea (IMC)

11

12 O IMC dos pacientes jovens flutua em torno de 28,61 e nos pacientes idosos 27,05
13 (desvios padrão 4,42 e 4,58). Dezenove (19) pacientes foram classificados como obesos (IMC
14 ≥ 30), de acordo com a classificação da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
15 (2022). Destes, 6 são jovens e 13 idosos. Não há evidência de diferença de IMC entre os grupos
16 (*T-test*, p -value = 0.2575, CI95%: -4.33;1.21) (**Figura 11, Tabela 3**).

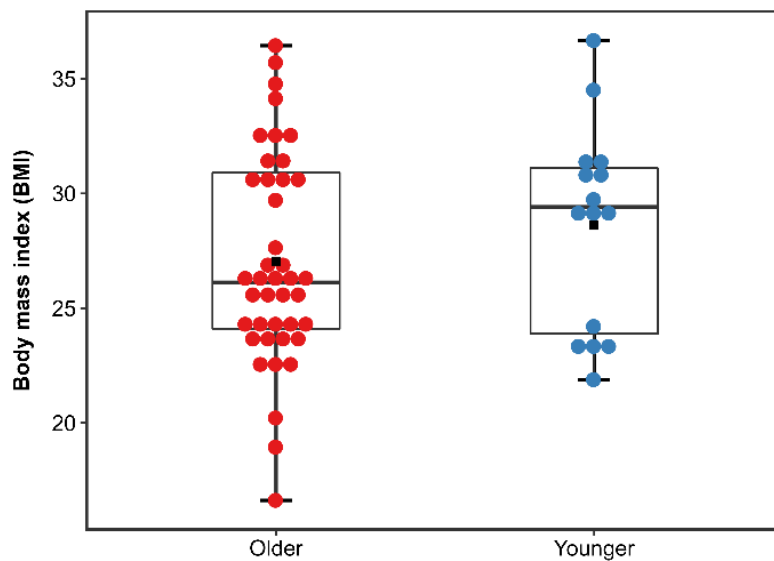


Figura 11. Distribuição do Índice de massa corpórea (IMC) entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).

1

2 7.1.3 Nível de PSA total

3

4

5

6

7

A mediana do valor de PSA total pré operatório nos jovens foi 8,05 ng/dL (faixa: 3,95-114, IQR=11,6) e nos idosos 10,1 ng/dL (faixa: 0,01-775, IQR=14,8). O estudo não tem evidência suficiente para considerar que há diferença na distribuição de PSA total pré operatório entre os grupos (*Wilcoxon test*, $p\text{-value}= 0.2873$) (**Figura 12, Tabela 3**).

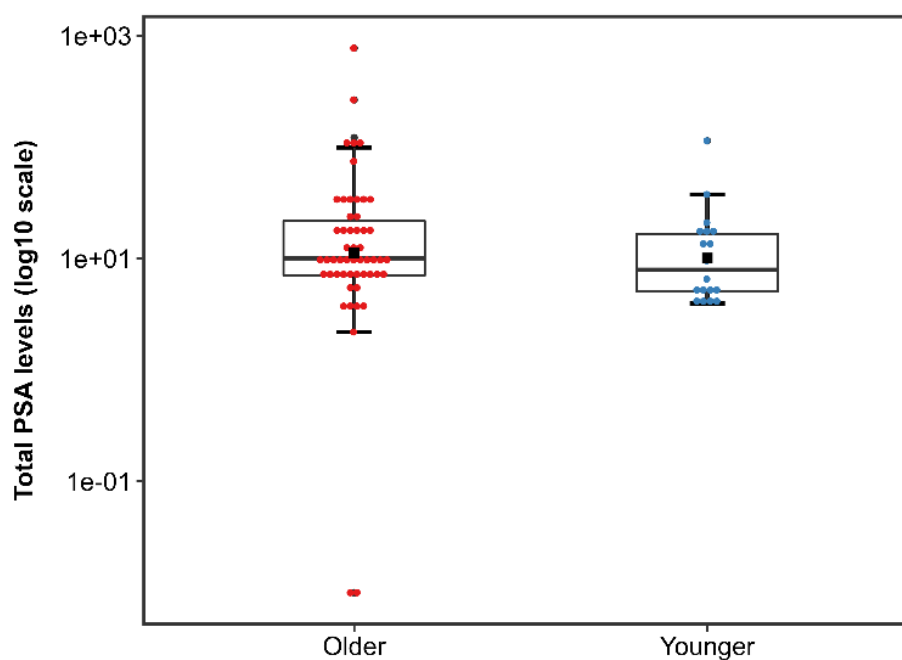


Figura 12. Distribuição do nível de PSA total entre os grupos jovem (younger) e idoso (older), no momento do diagnóstico.

7.1.4 Grupo de graduação ISUP

O grupo de graduação ISUP 2 (Gleason 7 (3+4)) foi o mais frequente na amostra (18/71), seguido pelo ISUP 1 (Gleason 6) e 3 (Gleason 7 (4+3)) com a mesma frequência (16/71, em cada grau) (Figura 13, Tabela 3). Quando analisamos os grupos separadamente, não temos evidência de associação entre os diferentes graus e os dois grupos. No entanto, dentro do grupo jovem o ISUP 1 (Gleason 6) foi o mais frequente, enquanto no grupo idoso foi graduação ISUP 2 (Fisher's Exact Test, p-value = 0.6808).

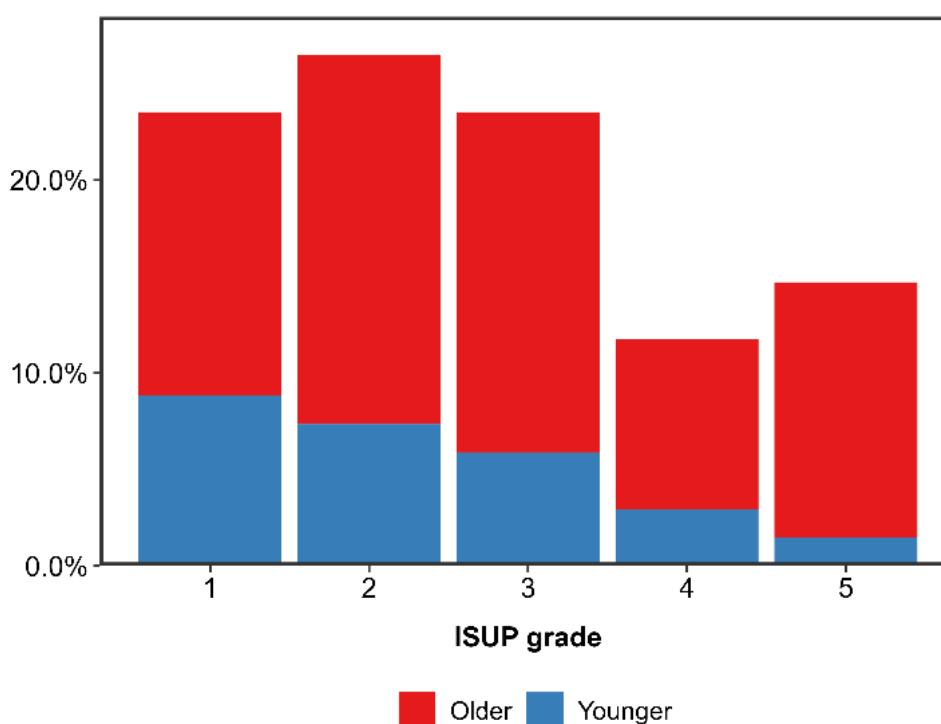


Figura 13. Grupo de graduação ISUP entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).

7.1.5 Sistema de estadiamento TNM

Ao coletar dados de estadiamento dos pacientes nos prontuários eletrônicos, estavam disponíveis dados de estadiamento de 16 jovens e 31 idosos. Quanto à classificação TNM, podemos concluir que jovens (n= 10/16) e idosos (n= 15/31) apresentaram predominantemente tumor palpável e confinado na próstata (estágio tumoral T2) (Fisher's Exact Test, p-value = 0.5638). Estratificamos os pacientes em três grupos: doença localizada (pT2), localmente avançada (pT3/pT4/N1) e metástase (M1). Este grupo de pacientes com metástase foi considerado pois três (3) pacientes do grupo idoso confirmaram metástase após a inclusão no estudo. (Figura 14, Tabela 3).

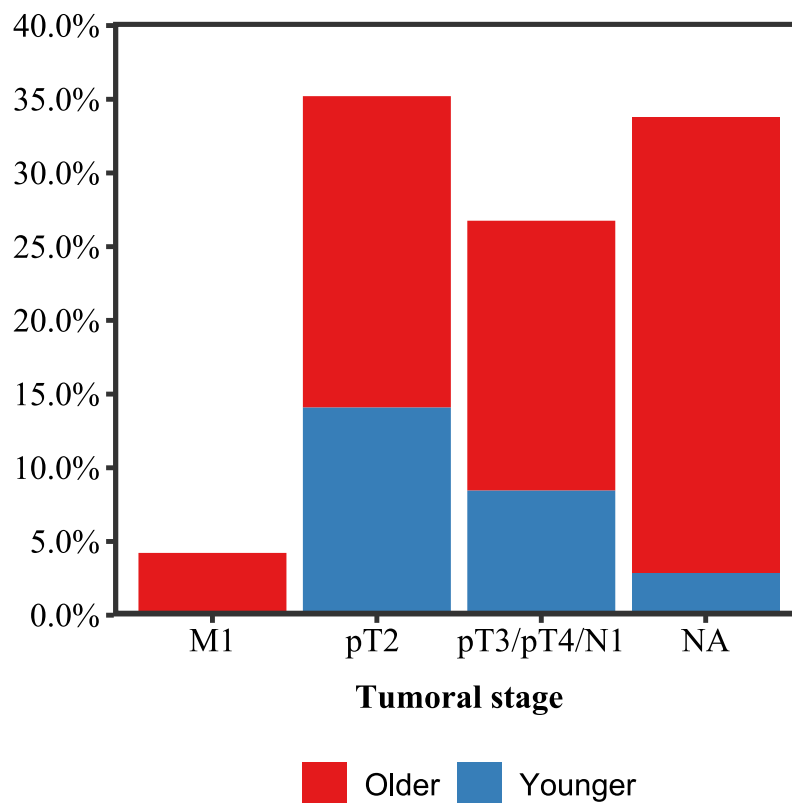


Figura 14. Distribuição do estadiamento clínico entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).

1

2 **7.1.6 História familiar (HF) de câncer**

3

4 Ao coletar dados de HF nos prontuários eletrônicos, estavam disponíveis dados de 12
 5 jovens e 31 idosos. Dentre os pacientes jovens, nove (n=9/18, 50%) apresentaram HF positiva de
 6 câncer e três (n=3/18, 16%) não apresentaram. Em contraste, dezoito (n=18/53, 32%) idosos
 7 apresentam HF positiva e quatorze (n=14/53, 26%) não apresentaram (*Fisher's Exact Test*, p-value
 8 = 0,3065, CI95% 0,48;16,59). Ao avaliar o tipo de câncer (CA), observamos que o PCa foi
 9 responsável por 50% dos casos (jovens, n=4/9 e idosos, n=9/18), seguido por estômago em idosos
 10 (n=3/17). No grupo jovem, os outros tipos de câncer apresentaram a mesma frequência (n=1/9, em
 11 cada) (**Figura 15, Tabela 3**).

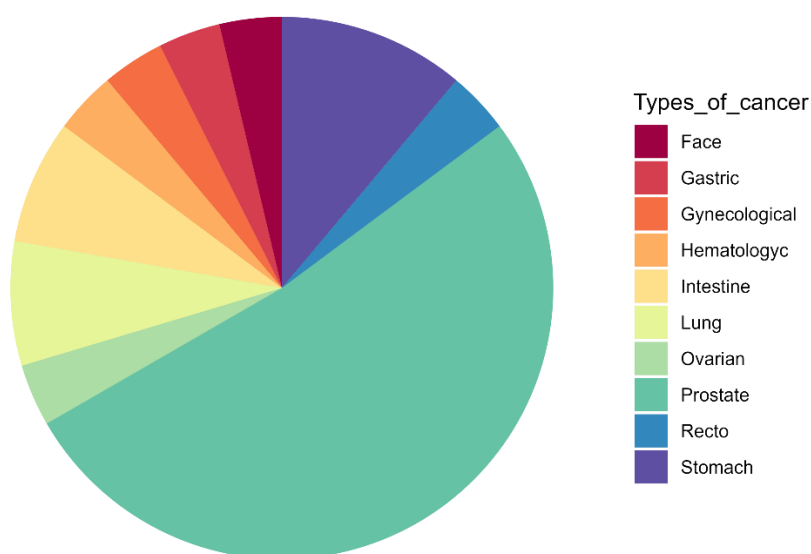
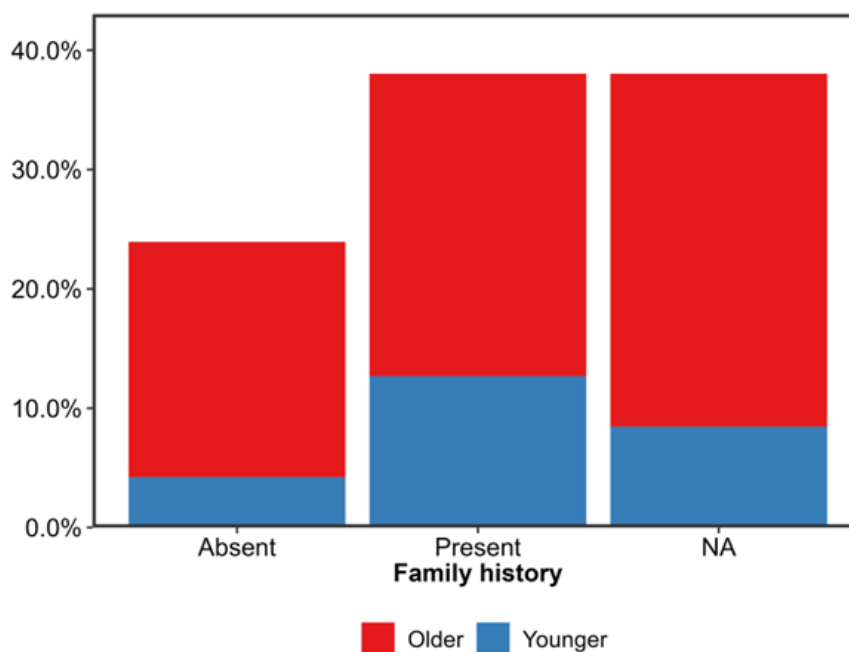


Figura 15. Distribuição de História familiar positiva entre os grupos jovem (younger) e idoso (older).

1

2 7.1.7 Tratamento

3 O tratamento mais comum nos dois grupos etários foi a Prostatectomia Radical (PR)
 4 (jovem 83%, n=15/18; idoso 58%, n=31/53). No total, quinze (15) pacientes foram submetidos
 5 à Vigilância ativa (VA), sendo treze (13) deles do grupo idoso e dois (2) no grupo jovem
 6 (*Fisher's Exact Test*, p-value = 0,3244, CI95% 0,04; 2,04) (**Tabela 3**). Dentre os pacientes que

1 foram submetidos à VA, seis (6) pacientes (jovens n=1/2; idosos n=5/13) fizeram a PR em
2 seguida. O paciente jovem fez PR após 3 meses de VA

3 .

4 **7.1.8 Comorbidades e hábitos de vida**

5 Quando avaliamos comorbidades e hábitos de vida, observamos que 62% (n=44) dos
6 pacientes são hipertensos. Destes, 13% (n=9) são do grupo jovem e 49% (n=35) do grupo idoso
7 (*Fisher's Exact Test*, p-value=0,1662). Quanto à Diabetes Mellitus (DM), 30% (n=21) são
8 diabéticos, sendo 3% (n=2) do grupo jovem e 27% (n=19) idoso (*Fisher's Exact Test*, p-value=
9 0,03267). Oito (8) pacientes se declararam como tabagistas e vinte e sete (27) ex tabagistas.
10 Não houve evidência de associação entre o hábito de fumar e ser jovem ou idoso (*Fisher's*
11 *Exact Test*, p-value=0,4333) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Características clinicopatológicas, comorbidades e hábito de vida em 71 pacientes com PCa.

		Pacientes (n=71)	
		Jovem (n= 18)	Idoso (n=53)
Idade (média; faixa)		51; 45-55	70; 60-80
PSA total ng/dL (mediana; faixa)		8,05 (3,95-114)	10,1(0,01-775)
IMC (média; faixa)		28,61(21,38-36,66)	27,05 (16,62-36,44)
Obesidade (n)		6	13
HF de câncer		9	18
Estágio clínico (n)			
Tumor (T)			
	pT2	10	15
	pT3/ pT4/N1	6	13
	M1	0	3
ISUP Grade Group			
	1	6	10
	2	5	13
	3	4	12
	4	2	6
	5	1	9
Tratamento			
	PR	15	31
	VA	2	13
HAS		9	35
DM		2	19
Hábito de fumar			
	Tabagista	1	7
	Ex-tabagista	10	17

7.1.9 Avaliação de recorrência bioquímica (BCR)

Avaliamos recorrência bioquímica (BCR) em quarenta e seis (46) pacientes submetidos à prostatectomia radical (PR). Destes, quinze (15) pertencem ao grupo jovem e trinta e um (31) ao grupo idoso. O parâmetro utilizado para BCR foi ocorrência de PSA total >0.2 ng/dL, em dois testes realizados após a PR. Dentre os quarenta e seis (46) pacientes que foram submetidos à PR, doze (12) apresentaram BCR (*Fisher's Exact Test*, p-value = 0,1524, IC95%:0,60;14,8). No grupo jovem os pacientes apresentaram BCR em uma média de *follow-up* de 37 meses (mediana 4,5 meses), enquanto no grupo idoso aproximadamente foi em uma média de *follow-up* de 4 meses (mediana 2,5 meses) (**Tabela 4**). Dentre os doze (12) pacientes que tiveram BCR, metade (6/12) apresentou ISUP 3 (4+3), cinco (5) apresentaram estadiamento clínico pT3, seis (6) apresentaram história familiar de câncer positiva e oito (8) apresentaram PSA total pré-operatório entre 4-10 ng/dL. Temos dados de HF disponíveis de três (3) pacientes do grupo jovem (Younger BCR) e três (3) pacientes do grupo de idosos (Older BCR). Todos os pacientes têm pelo menos um parente de primeiro grau (pai/irmão) / segundo grau (tio) com algum tipo de câncer, sendo que quatro (4) pacientes têm pelo menos um irmão com câncer.

Tabela 4. Pacientes submetidos à Prostatectomia Radical.

Group	Underwent PR (n)	BCR-positive (n)	BCR-negative (n)	No PR (n)	Total sample (n)
Younger (≤ 55 anos)	15	6	9	3	18
Older (≥ 60 anos)	31	6	25	22	53
Total sample (n)	46	12	34	25	71

1 7.2 Sequenciamento (Targeted Next Generation Sequencing)

2 Foi enviado DNA de sangue periférico de setenta e cinco (75) pacientes diagnosticados
3 com PCa primário, entretanto, a empresa *Daicel Arbor* informou que as amostras de quatro (4)
4 pacientes foram excluídas da análise porque não passaram no controle de qualidade do DNA.
5 Desta forma, nós analisamos dados de sequenciamento de DNA germinativo em um painel
6 contendo vinte e um (21) genes, em setenta e um (71) pacientes (grupo jovem n=18; grupo
7 idoso n=53).

8 Após o alinhamento, pré-processamento e chamada de variante germinativa, foram
9 identificadas 676 variantes sinônimas (262 no grupo jovem e 414 do grupo idoso) e 193
10 variantes não sinônimas, nos 21 genes analisados. Dentre as 676 variantes sinônimas
11 encontradas, 262 foram exclusivamente do grupo jovem e 414 do grupo idoso. Os genes *PARP*,
12 *APC*, *TP53*, *GFI1B*, *KMT2C*, *FOXA1*, *CDK12*, *PTEN*, *BRCA1* e *SPOP* foram mutados em
13 100% da amostra, enquanto *HOXB13* e *PALB2* apresentaram menor quantidade de variantes
14 sinônimas. Variantes localizadas em *Intron* foram as mais comuns em ambos os grupos,
15 seguida da 3'UTR, com metade dos pacientes apresentando até 68 variantes sinônimas. Dentre
16 as 193 variantes não sinônimas encontradas, 111 variantes foram exclusivamente do grupo
17 jovem e 82 do grupo idoso (**Figura 18, step 1**). Os genes *KMT2C* e *AR* foram os genes com
18 maior número de variantes não sinônimas em toda a amostra, correspondendo a 97% e 90%,
19 respectivamente. Em contrapartida, o *TP53*, *PTEN* e *PALB2* foram os genes com menor número
20 de variantes não sinônimas. Variantes classificadas como *Missenses* foram as mais comuns em
21 ambos os grupos, seguida da *Frame_Shift_Ins* no grupo jovem e *Nonsense* no grupo idoso, com
22 metade dos pacientes apresentando até três (3) variantes.

23 Após aplicação de filtro para variantes não sinônimas com $DP \geq 50$, foram identificadas 132
24 variantes em 17 genes (17/21), em 70 amostras (70/71). Sem considerar os grupos, os genes
25 *KMT2C* e *AR* foram os mais alterados, representando 97% e 79%, respectivamente. Em
26 contraste, *TP53* e *KLK3* foram alterados em 1% (**Figura 16**). Variantes *Missense* foram as mais
27 frequentes nos pacientes com PCa, sendo os tipos *INS* e *SNP*, com as trocas de nucleotídeo
28 C>T e T>C as mais comuns (**Figura 17**).

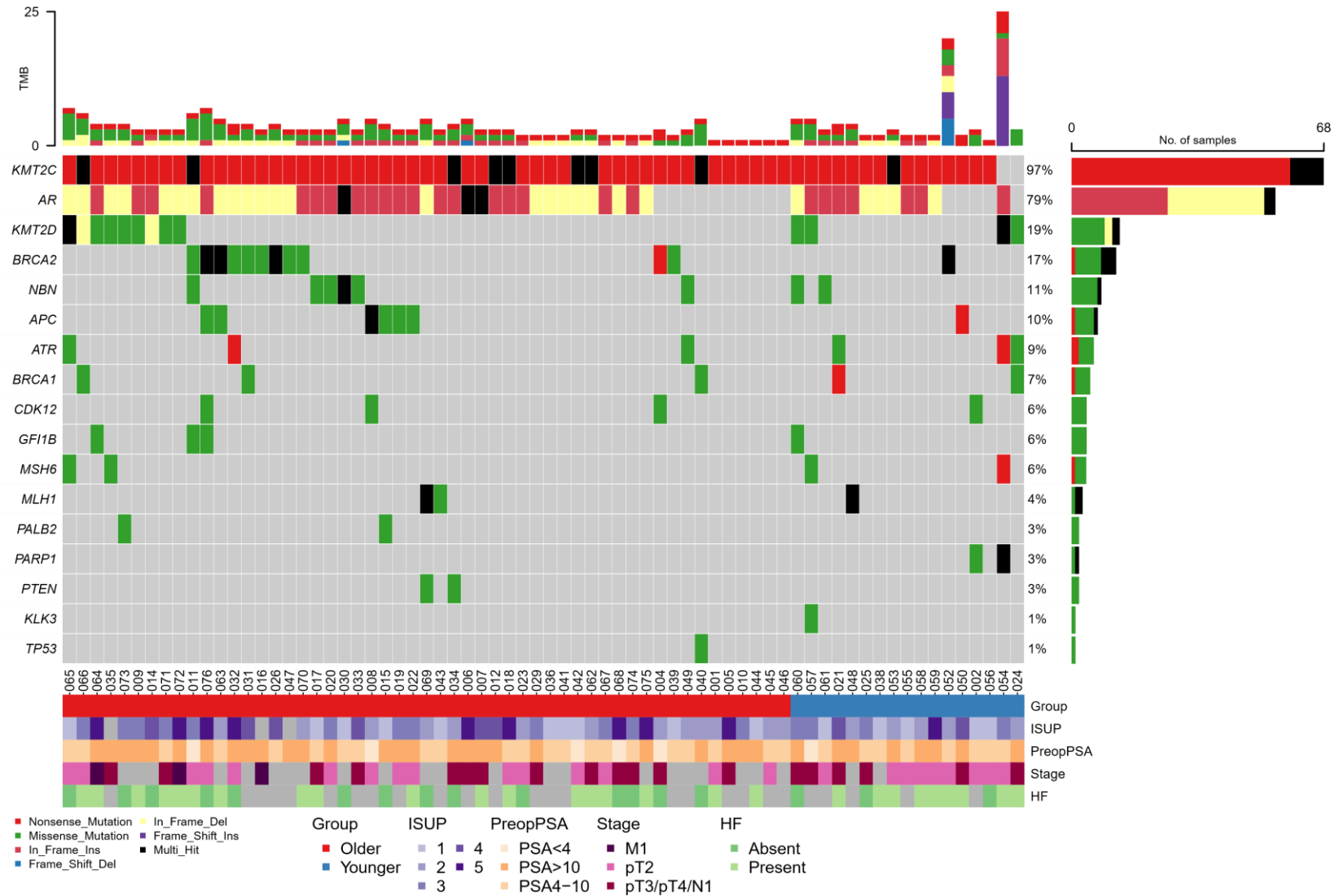


Figura 16. *Oncoplot* mostrando a distribuição de variantes em amostras de sangue de 70 pacientes. O *oncoplot* forneceu uma visão global das taxas e tipos de mutação, carga mutacional (TMB) e características clinicopatológicas para cada paciente (jovem=younger, blue; idoso=older, red). O lado direito do *oncoplot* mostra a taxa de cada gene mutado e a parte inferior os respectivos Ids das amostras, com suas respectivas características clinicopatológicas. As variantes anotadas como *multi_hit* referem-se aos genes que apresentaram mais de uma mutação na mesma amostra. ISUP, graduação ISUP; PreopPSA, nível de PSA total pré-operatório; Stage, Estágio tumoral; HF, história familiar de câncer; TMB, *Tumor mutation burden*.

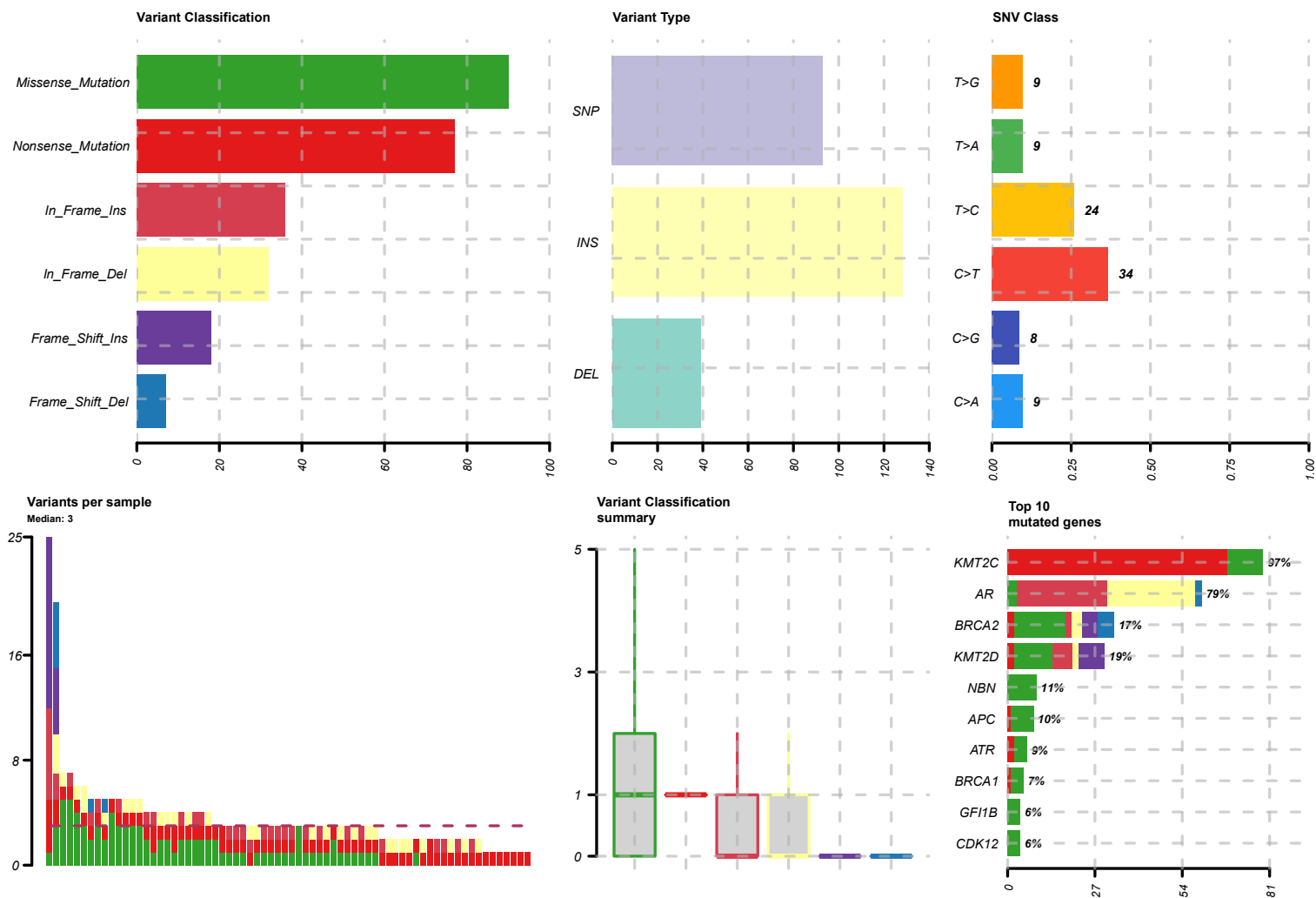


Figura 17. Resumo geral do sequenciamento. Os gráficos mostram as classificações e os tipos das variantes encontradas, as trocas de base, a mediana de variantes por amostra e os 10 genes com maior número de variantes.

1 7.2.1 Variantes exclusivas de cada grupo

2

3

4

5

6

Com objetivo de identificar variantes não sinônimas exclusivas de cada grupo com $DP \geq 50$, utilizamos a ferramenta online VENNY 2.1. A partir do *HGVs coding* encontramos 58 variantes exclusivas do grupo jovem (**Tabela 6**), 64 exclusivas do grupo idoso (**Tabela 7**) e 10 variantes em comum entre os grupos etários (**Figura 18, Step 3**).

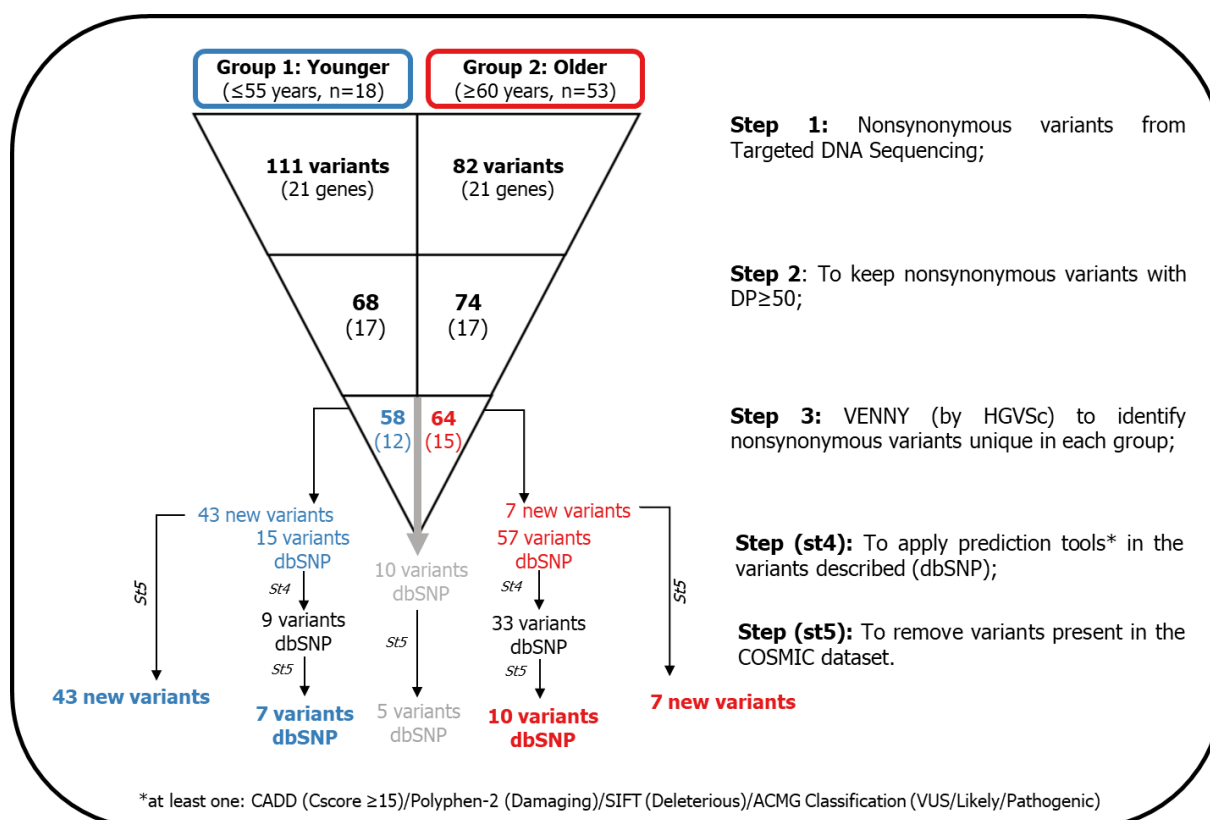


Figura 18. Fluxo de trabalho das análises de variantes.

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

Quando analisamos as 58 variantes exclusivas do grupo jovem, encontramos doze (12) genes alterados: *KMT2D*, *ATR*, *PARP1*, *BRCA1*, *MSH6*, *BRCA2*, *APC*, *AR*, *GFI1B*, *KLK3*, *KMT2C* e *NBN* em dez (10) amostras do grupo jovem (10/18). Os genes *KMT2D* (40%, 4/10) e *ATR* (30%, 3/10) foram alterados em um maior número de pacientes do grupo jovem, seguidos do *PARP1*, *BRCA1* e *MSH6* (20%, 2/10 em cada gene). Em contrapartida, *KLK3*, *GFI1B*, *AR* e *APC* foram alterados em 10% (**Figura 19**). As variantes *Frame_Shift_Ins*, *Missense* e *In_Frame_Ins* foram as mais frequentes, com metade do grupo apresentando até duas (2) variantes. O *BRCA2* foi o único gene que apresentou todos os tipos de variantes (*Frame_Shift_Ins*, *Missense*, *In_Frame_Ins*, *Nonsense*, *Frame_Shift_Del* e *In_frame_Del*), sendo responsável por todas as variantes do tipo *Frame_Shift_Del* e *In_frame_Del* do grupo jovem. No entanto, o *KMT2D*, *BRCA2* e *PARP1* foram os genes com maior número de variantes. Foram encontradas dezenove (19) variantes no *KMT2D*, dezenove (19) no *BRCA2* e

1 sete (7) no *PARP1*. Diferente do que ocorre com o *KMT2D* (4 amostras) e *PARP1* (2 amostras),
2 o *BRCA2* está alterado em apenas uma (1) amostra (7418-JK-1-052). Os genes anotados como
3 *multi_hit* foram aqueles que apresentaram mais de uma mutação na mesma amostra. Os genes
4 *multi_hit* com mutações exclusivas do grupo jovem foram *KMT2D* e *PARP1* (ambos na amostra
5 7418-JK-1-052) e *BRCA2* (na amostra 7418-JK-1-054). Somado a isto, as amostras 7418-JK-
6 1-052 e 7418-JK-1-054 apresentaram TMB atípico em relação ao grupo jovem (**Figura 19**).
7 Todo o grupo jovem apresenta até três (3) variantes, enquanto os pacientes 7418-JK-1-052 e
8 7418-JK-1-054 apresentam respectivamente, dezenove (19) e vinte e cinco (25) variantes.
9 Dentre as dezenove (19), onze (11) são *Likely/Pathogenic* e dentre as 25, dezoito (18) são
10 *Likely/Pathogenic*.

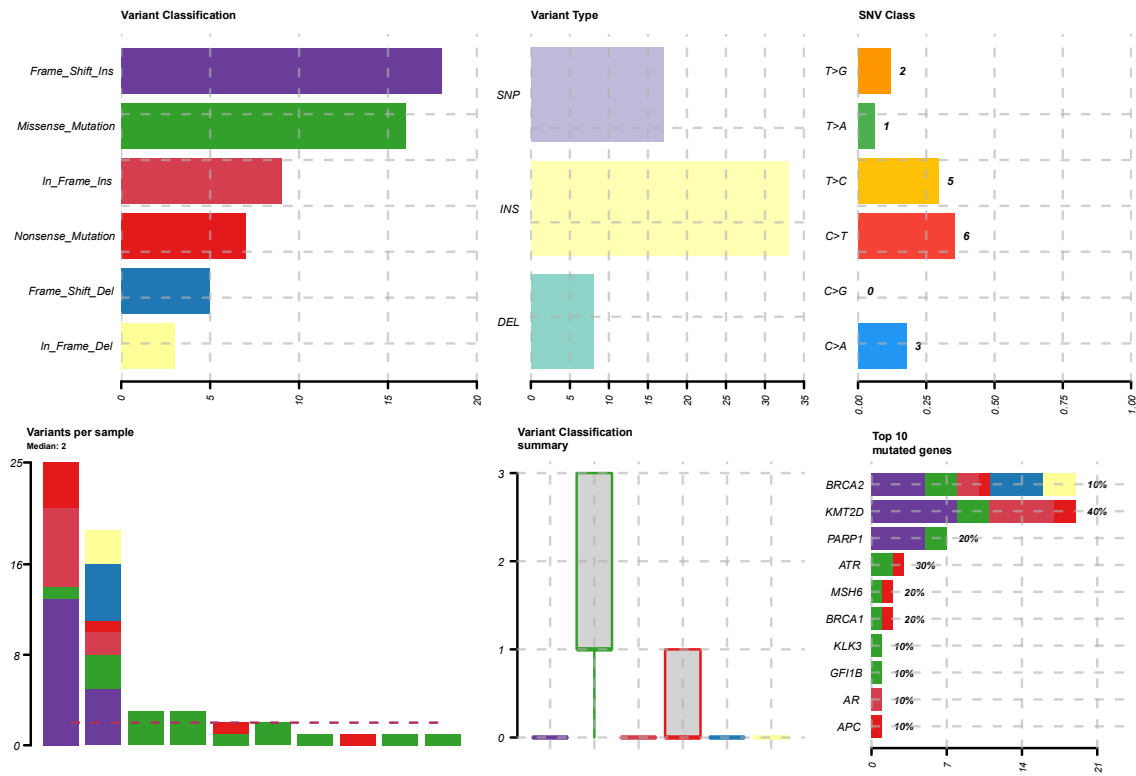
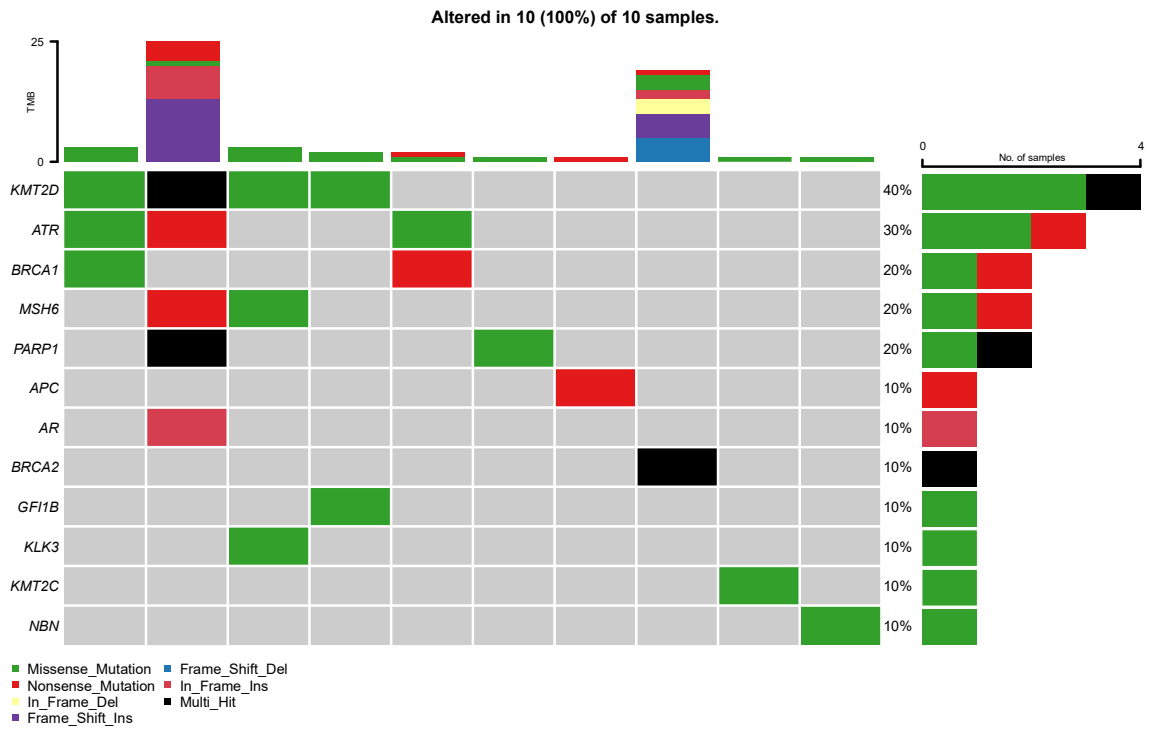


Figura 19. Oncoplot das variantes exclusivas do grupo jovem (58 variantes) e resumo dos achados do sequenciamento para tais variantes.

Tabela 5. Cinquenta e oito variantes exclusivas do grupo jovem (n=17).

Hugo_Symbol	Chr	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	dbSNP_RS	DP	HGVSc	HGVSp	Consequence
PARP1	1	226578166	226578166	Missense_Mutation	rs1805409	93	c.562G>A	p.Ala188Thr	missense_variant
BRCA1	17	41243908	41243908	Nonsense_Mutation	rs80356923	3930	c.3640G>T	p.Glu1214Ter	stop_gained
ATR	3	142284987	142284987	Missense_Mutation	rs28897763	1535	c.268C>T	p.His90Tyr	missense_variant
KMT2D	12	49428694	49428694	Missense_Mutation	rs146044282	171	c.10256A>G	p.Asp3419Gly	missense_variant
BRCA1	17	41243871	41243871	Missense_Mutation	rs1396926041	199	c.3677T>C	p.Phe1226Ser	missense_variant
ATR	3	142218546	142218546	Missense_Mutation	rs763130593	78	c.5303A>G	p.Asp1768Gly	missense_variant
APC	5	112174730	112174731	Nonsense_Mutation	novel	66	c.3439_3440insTCTCTTCATTATATTTTATC	p.Tyr1147PhefsTer9	stop_gained,frameshift_variant
BRCA2	13	32968882	32968883	Nonsense_Mutation	novel	55	c.9313_9314insAAGAAGCCCTGA	p.Phe3105delinsTer	stop_gained
BRCA2	13	32968890	32968892	In_Frame_Del	novel	60	c.9321_9323del	p.Asp3108del	inframe_deletion
BRCA2	13	32968895	32968896	Frame_Shift_Ins	novel	58	c.9326_9327insGG	p.Asn3110ValfsTer11	frameshift_variant
BRCA2	13	32968896	32968897	Frame_Shift_Ins	novel	58	c.9327_9328insCGCC	p.Asn3110ArgfsTer3	frameshift_variant
BRCA2	13	32968898	32968898	Missense_Mutation	novel	58	c.9329A>C	p.Asn3110Thr	missense_variant
BRCA2	13	32968899	32968900	Frame_Shift_Ins	novel	58	c.9331dup	p.Glu3111GlyfsTer5	frameshift_variant
BRCA2	13	32968904	32968906	In_Frame_Del	novel	58	c.9335_9337del	p.Asp3112_Ile3113delins	inframe_deletion
BRCA2	13	32968908	32968909	Frame_Shift_Ins	novel	58	c.9339_9340insGCTTGACGCA	p.Ile3114AlafsTer5	frameshift_variant
BRCA2	13	32968914	32968917	Frame_Shift_Del	novel	61	c.9345_9348del	p.Lys3115AsnfsTer4	frameshift_variant
BRCA2	13	32968923	32968924	Frame_Shift_Ins	novel	58	c.9354_9355insAGGC	p.Leu3119ArgfsTer32	frameshift_variant
BRCA2	13	32968929	32968938	Frame_Shift_Del	novel	66	c.9360_9369del	p.Ala3121ThrfsTer39	frameshift_variant
BRCA2	13	32968940	32968941	In_Frame_Ins	novel	68	c.9371_9372insTGT	p.Asn3124_Leu3125insV	inframe_insertion
BRCA2	13	32968944	32968944	Frame_Shift_Del	rs398122612	67	c.9376del	p.Gln3126SerfsTer37	frameshift_variant
BRCA2	13	32968947	32968947	Missense_Mutation	novel	69	c.9378G>T	p.Gln3126His	missense_variant
BRCA2	13	32968949	32968952	Frame_Shift_Del	novel	72	c.9380_9383del	p.Trp3127TyrfsTer35	frameshift_variant
BRCA2	13	32968954	32968955	Frame_Shift_Del	novel	71	c.9385_9386del	p.Pro3129ArgfsTer20	frameshift_variant
BRCA2	13	32968957	32968958	In_Frame_Ins	novel	73	c.9388_9389insGTC	p.Glu3130delinsGlyGln	protein_altering_variant
BRCA2	13	32968958	32968958	Missense_Mutation	novel	73	c.9389A>T	p.Glu3130Val	missense_variant
BRCA2	13	32968966	32968977	In_Frame_Del	novel	77	c.9397_9408del	p.Ser3133_Leu3136del	inframe_deletion
KMT2C	7	151874580	151874580	Missense_Mutation	rs61730547	126	c.7958T>C	p.Leu2653Pro	missense_variant
PARP1	1	226551664	226551665	Frame_Shift_Ins	novel	50	c.2765_2766insTCTCCCTG	p.Glu923LeufsTer13	frameshift_variant
PARP1	1	226578315	226578316	Frame_Shift_Ins	novel	60	c.412_413insA	p.Arg138GlnfsTer18	frameshift_variant
PARP1	1	226578317	226578318	Frame_Shift_Ins	novel	72	c.410_411insACCAAGGGAGCGACAAGCA	p.Arg138ProfsTer31	frameshift_variant
PARP1	1	226578320	226578321	Frame_Shift_Ins	novel	68	c.407_408insTATGT	p.Gln136HisfsTer18	frameshift_variant
PARP1	1	226578323	226578324	Frame_Shift_Ins	novel	65	c.404_405insAAAA	p.Gln136LysfsTer21	frameshift_variant,splice_region_variant
PARP1	1	226578324	226578324	Missense_Mutation	rs746859668	65	c.404G>A	p.Gly135Asp	missense_variant,splice_region_variant
KMT2D	12	49427525	49427526	Frame_Shift_Ins	novel	129	c.10962_10963insGG	p.Leu3655GlyfsTer4	frameshift_variant
KMT2D	12	49427526	49427527	In_Frame_Ins	novel	130	c.10961_10962insCCCCTGTGG	p.Gly3654_Leu3655insPro	inframe_insertion
KMT2D	12	49427533	49427534	Frame_Shift_Ins	novel	132	c.10954_10955insACCTCCGGCTTGCCAC	p.Ala3652AspfsTer12	frameshift_variant
KMT2D	12	49427536	49427537	Frame_Shift_Ins	novel	129	c.10951_10952insG	p.Gln3651ArgfsTer24	frameshift_variant
KMT2D	12	49427539	49427540	In_Frame_Ins	novel	129	c.10948_10949insCCATACCCCCAGGGGTC	p.Gly3650delinsAlaIlePro	protein_altering_variant
KMT2D	12	49427542	49427543	Frame_Shift_Ins	novel	124	c.10945_10946insTA	p.Gly3649ValfsTer10	frameshift_variant
KMT2D	12	49427544	49427545	Frame_Shift_Ins	novel	124	c.10943_10944insA	p.Gly3650TrpfsTer25	frameshift_variant
KMT2D	12	49427547	49427548	In_Frame_Ins	novel	124	c.10940_10941insACCAGGCTG	p.Gly3649_Gly3650insCys	inframe_insertion
KMT2D	12	49438252	49438253	In_Frame_Ins	novel	130	c.5016_5017insTTAACCTT	p.Pro1672_Asp1673insP	inframe_insertion
KMT2D	12	49438256	49438257	Nonsense_Mutation	novel	125	c.5012_5013insGGCTGACGGGGCCCTCCAG	p.Ser1671delinsArgAlaAs	stop_gained,protein_altering_variant
KMT2D	12	49440523	49440524	Frame_Shift_Ins	novel	139	c.4286_4287insCAGG	p.Cys1430ArgfsTer3	frameshift_variant
KMT2D	12	49440524	49440525	Frame_Shift_Ins	novel	139	c.4285_4286insGTGATGTCATCAAAATCG	p.Val1429GlyfsTer12	frameshift_variant
KMT2D	12	49440527	49440528	In_Frame_Ins	novel	175	c.4282_4283insCACTCCACACAACGCCAG	p.Ile1428delinsThrLeuHis	protein_altering_variant
KMT2D	12	49440529	49440530	Frame_Shift_Ins	novel	175	c.4280_4281insGCCACACACCTCACACAC	p.Cys1427TrpfsTer86	frameshift_variant
KMT2D	12	49440531	49440532	In_Frame_Ins	novel	178	c.4278_4279insGCC	p.Glu1426_Cys1427insAla	inframe_insertion
KMT2D	12	49440533	49440534	Nonsense_Mutation	novel	149	c.4276_4277insTAGCTAATATCACAGTCA	p.Glu1426ValfsTer13	stop_gained,frameshift_variant
MSH6	2	48026561	48026562	Nonsense_Mutation	novel	63	c.1439_1440insGTAGATGCATCAAAATCG	p.Ala481Ter	stop_gained,frameshift_variant
ATR	3	142281540	142281541	Nonsense_Mutation	novel	60	c.703_704insCTGGTAGTCTCCAAGCTGA	p.Val235AlafsTer7	stop_gained,frameshift_variant
AR	X	66765464	66765465	In_Frame_Ins	novel	109	c.476_477insAGTATCTTCAGTCTCTTGCC	p.Ala159_Ala160insValS	inframe_insertion
KMT2D	12	49427546	49427546	Missense_Mutation	rs777215324	662	c.10942C>T	p.Pro3648Ser	missense_variant
KLK3	9	51361451	51361451	Missense_Mutation	rs61750343	521	c.373C>T	p.Arg125Cys	missense_variant
MSH6	2	48025782	48025782	Missense_Mutation	rs1800938	206	c.660A>C	p.Glu220Asp	missense_variant
KMT2D	12	49433848	49433848	Missense_Mutation	rs201507971	2867	c.7705G>A	p.Gly2569Ser	missense_variant
GFI1B	9	135863760	135863760	Missense_Mutation	rs140090505	3732	c.415G>T	p.Gly139Cys	missense_variant
NBN	8	90993017	90993017	Missense_Mutation	rs769414	104	c.425A>G	p.Asn142Ser	missense_variant

1 Quando analisamos as sessenta e quatro (64) variantes exclusivas do grupo idoso,
2 encontramos quinze (15) genes alterados: *BRCA2*, *KMT2D*, *KMT2C*, *APC*, *NBN*, *AR*, *ATR*,
3 *BRCA1*, *GFI1B*, *CDK12*, *MSH6*, *PALB2*, *PTEN*, *MLH1* e *TP53* em trinta e nove (39) amostras
4 (39/53). A variante *Missense* foi a mais comum, com metade do grupo apresentando até uma
5 (1) variante (**Figura 20**). Os genes *BRCA2* (28%, 11/39), *KMT2C* (23%, 9/39) e *KMT2D* (21%,
6 8/39) foram os mais alterados no grupo idoso e com maior quantidade de variantes, seguidos
7 do *APC* (15%, 6/39), *NBN* (13%, 5/39) *AR* (10%, 6/39). Em contrapartida, *MLH1* e *TP53*
8 foram alterados em apenas 3% do grupo idoso. Todos os genes alterados apresentaram variantes
9 do tipo *Missense*, com exceção dos genes *BRCA2*, *KMT2D*, *AR* e *ATR* que apresentaram
10 variantes de outros tipos. Diferente do que ocorreu no grupo jovem, o grupo idoso não
11 apresentou variante *Frame_Shift_Ins*. Os genes *multi_hit* com variantes exclusivas do grupo
12 idoso foram genes *BRCA2*, *KMT2D*, *KMT2C*, *APC*, *NBN* e *AR*. No grupo idoso não houve
13 nenhum paciente com TMB atípico, portanto, a faixa foi menor comparada ao grupo jovem
14 (**Figura 20**).

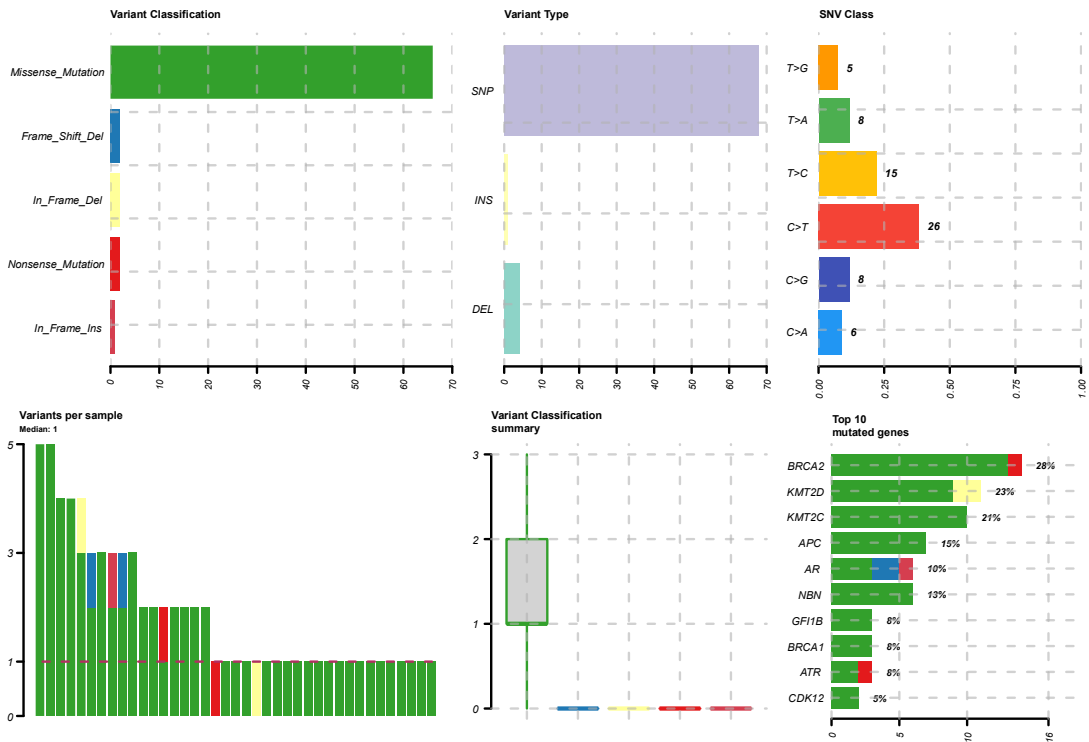
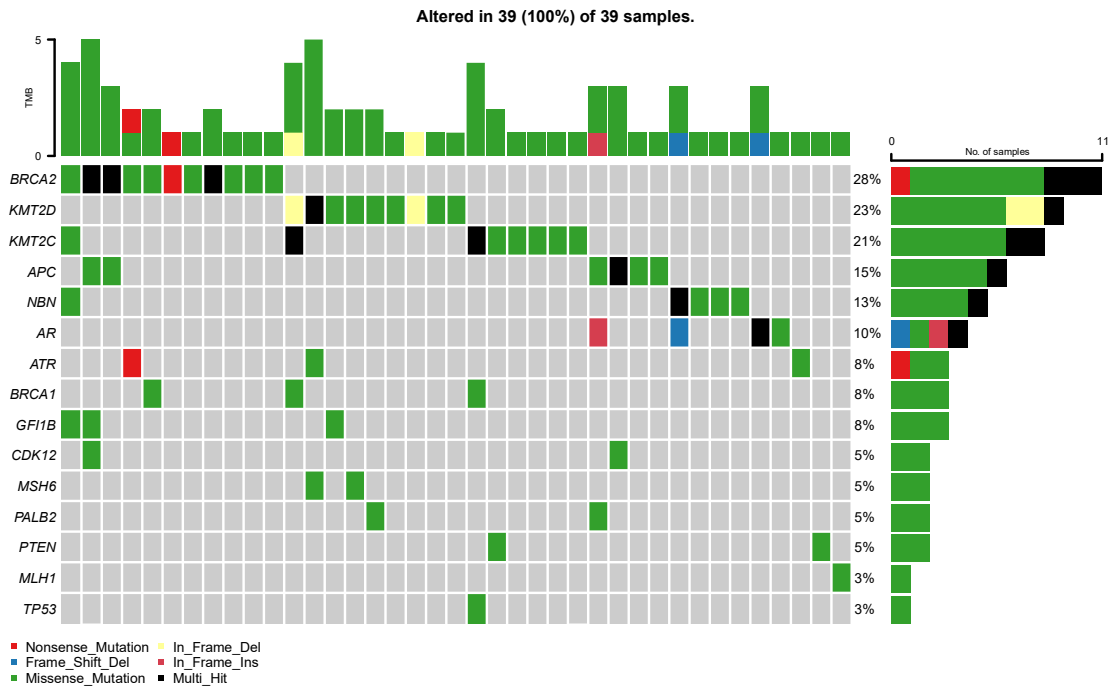


Figura 20. Oncoplot das variantes exclusivas do grupo idoso (64 variantes) e resumo dos achados do sequenciamento para tais variantes.

Tabela 6. Sessenta e quatro variantes exclusivas do grupo idoso (n=53).

Hugo_Symbol	Chr	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	dbSNP_RS	DP	HGVSc	HGVSp	Consequence
BRCA2	13	32972626	32972626	Nonsense_Mutation	rs11571833	149	c.9976A>T	p.Lys3326Ter	stop_gained
AR	X	66765176	66765176	Frame_Shift_Del	novel	225	c.188del	p.Gln63ArgfsTer112	frameshift_variant
AR	X	66765179	66765179	Missense_Mutation	rs1239669168	327	c.191A>T	p.Gln64Leu	missense_variant
AR	X	66765182	66765182	Missense_Mutation	rs1602143327	327	c.194A>T	p.Gln65Leu	missense_variant
AR	X	66765875	66765875	Missense_Mutation	novel	2864	c.887A>C	p.Asp296Ala	missense_variant
CDK12	17	37627224	37627224	Missense_Mutation	rs200075664	2868	c.1139G>A	p.Arg380His	missense_variant
APC	5	112178148	112178148	Missense_Mutation	rs200587641	122	c.6857C>T	p.Ala2286Val	missense_variant
APC	5	112179153	112179153	Missense_Mutation	rs72541816	1132	c.7862C>G	p.Ser2621Cys	missense_variant
KMT2D	12	49425443	49425443	Missense_Mutation	rs181733689	1694	c.13045C>G	p.Pro4349Ala	missense_variant
BRCA2	13	32912361	32912361	Missense_Mutation	rs41293485	3445	c.3869G>A	p.Cys1290Tyr	missense_variant
KMT2C	7	151878670	151878670	Missense_Mutation	rs140719911	2560	c.6275A>T	p.Asp2092Val	missense_variant
NBN	8	90982691	90982691	Missense_Mutation	rs769420	1369	c.797C>T	p.Pro266Leu	missense_variant
GFI1B	9	135863587	135863587	Missense_Mutation	rs115534814	2448	c.242G>T	p.Gly81Val	missense_variant
KMT2C	7	151878163	151878163	Missense_Mutation	novel	1925	c.6782T>C	p.Leu2261Ser	missense_variant
KMT2D	12	49445373	49445426	In_Frame_Del	novel	717	c.2040_2093del	p.Ala686_Glu703del	inframe_deletion
PALB2	16	23649446	23649446	Missense_Mutation	rs138789658	195	c.53A>G	p.Lys18Arg	missense_variant
APC	5	112179329	112179329	Missense_Mutation	rs587780553	138	c.8038C>A	p.Pro2680Thr	missense_variant
AR	X	66765173	66765174	In_Frame_Ins	rs3032358	63	c.185_186insGCAGCA	p.Gln79_Gln80dup	inframe_insertion
BRCA2	13	32913562	32913562	Missense_Mutation	rs56087561	2183	c.5070A>C	p.Lys1690Asn	missense_variant
NBN	8	90993640	90993640	Missense_Mutation	rs61753720	506	c.283G>A	p.Asp95Asn	missense_variant
KMT2C	7	151902197	151902197	Missense_Mutation	rs138119145	1173	c.3955G>C	p.Asp1319His	missense_variant
APC	5	112174677	112174677	Missense_Mutation	rs143638171	2423	c.3386T>C	p.Leu1129Ser	missense_variant
NBN	8	90967686	90967686	Missense_Mutation	rs34120922	1880	c.1222A>G	p.Lys408Glu	missense_variant
BRCA2	13	32893271	32893271	Missense_Mutation	rs4987046	1170	c.125A>G	p.Tyr42Cys	missense_variant
BRCA2	13	32893369	32893369	Missense_Mutation	rs28897701	1518	c.223G>C	p.Ala75Pro	missense_variant
NBN	8	90983460	90983460	Missense_Mutation	rs34767364	663	c.643C>T	p.Arg215Trp	missense_variant
BRCA2	13	32914196	32914196	Missense_Mutation	rs4987048	1371	c.5704G>A	p.Asp1902Asn	missense_variant
BRCA1	17	41244524	41244524	Missense_Mutation	rs1800704	2618	c.3024G>A	p.Met1008Ile	missense_variant
BRCA2	13	32921014	32921014	Missense_Mutation	rs876661032	382	c.6988A>G	p.Ile2330Val	missense_variant
ATR	3	142188982	142188982	Nonsense_Mutation	novel	2305	c.6265C>T	p.Arg2089Ter	stop_gained

Tabela 7. Continuação.

Hugo_Symbol	Chr	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	dbSNP_RS	DP	HGVSc	HGVSp	Consequence
NBN	8	90983475	90983475	Missense_Mutation	rs61754796	507	c.628G>T	p.Val210Phe	missense_variant
PTEN	10	89720731	89720731	Missense_Mutation	rs143335584	306	c.882T>G	p.Ser294Arg	missense_variant
KMT2C	7	152055741	152055741	Missense_Mutation	rs111826855	408	c.181A>G	p.Thr61Ala	missense_variant
KMT2D	12	49433883	49433883	Missense_Mutation	rs189888707	2046	c.7670C>T	p.Pro2557Leu	missense_variant
MSH6	2	48028282	48028282	Missense_Mutation	rs267608075	2861	c.3160A>T	p.Ile1054Phe	missense_variant
TP53	17	7579548	7579548	Missense_Mutation	rs1800371	173	c.139C>T	p.Pro47Ser	missense_variant
BRCA1	17	41245381	41245381	Missense_Mutation	rs4986845	242	c.2167A>G	p.Asn723Asp	missense_variant
KMT2C	7	151859420	151859420	Missense_Mutation	rs148366561	193	c.11242G>A	p.Ala3748Thr	missense_variant
KMT2C	7	151878292	151878292	Missense_Mutation	rs61730540	81	c.6653A>C	p.Tyr2218Ser	missense_variant
MLH1	3	37053550	37053550	Missense_Mutation	rs2308317	338	c.637G>A	p.Val213Met	missense_variant
BRCA2	13	32953604	32953604	Missense_Mutation	rs59004709	1082	c.8905G>A	p.Val2969Met	missense_variant
ATR	3	142188337	142188337	Missense_Mutation	rs28910273	100	c.6394T>G	p.Tyr2132Asp	missense_variant
KMT2C	7	151874036	151874036	Missense_Mutation	rs138845109	4834	c.8502A>T	p.Glu2834Asp	missense_variant
BRCA2	13	32929007	32929007	Missense_Mutation	rs45574331	3004	c.7017G>C	p.Lys2339Asn	missense_variant
BRCA2	13	32972380	32972380	Missense_Mutation	rs11571831	2973	c.9730G>A	p.Val3244Ile	missense_variant
APC	5	112174138	112174138	Missense_Mutation	rs147394539	2768	c.2847G>T	p.Met949Ile	missense_variant
GFI1B	9	135862741	135862741	Missense_Mutation	rs202104252	2267	c.173C>T	p.Thr58Ile	missense_variant
KMT2D	12	49425548	49425548	Missense_Mutation	rs777559590	1115	c.12940C>T	p.Pro4314Ser	missense_variant
KMT2D	12	49434032	49434032	Missense_Mutation	rs780460242	1351	c.7521T>A	p.His2507Gln	missense_variant
KMT2D	12	49435116	49435116	Missense_Mutation	rs563981206	1161	c.6437C>T	p.Pro2146Leu	missense_variant
MSH6	2	48010520	48010520	Missense_Mutation	rs374597395	554	c.148T>C	p.Trp50Arg	missense_variant
ATR	3	142272762	142272762	Missense_Mutation	rs769648140	2305	c.2437A>G	p.Met813Val	missense_variant
KMT2D	12	49445190	49445216	In_Frame_Del	rs587778449	1728	c.2250_2276del	p.Arg755_Pro763del	inframe_deletion
BRCA1	17	41243948	41243948	Missense_Mutation	rs56214134	4359	c.3600G>C	p.Gln1200His	missense_variant
KMT2C	7	151859930	151859930	Missense_Mutation	rs547763902	5350	c.10732C>A	p.His3578Asn	missense_variant
KMT2C	7	151860428	151860428	Missense_Mutation	rs567984906	5563	c.10234C>T	p.Arg3412Trp	missense_variant
PTEN	10	89624236	89624236	Missense_Mutation	novel	375	c.10A>G	p.Ile4Val	missense_variant
BRCA2	13	32907407	32907407	Missense_Mutation	rs28897710	2132	c.1792A>G	p.Thr598Ala	missense_variant
KMT2D	12	49425386	49425386	Missense_Mutation	rs189357192	1067	c.13102A>G	p.Thr4368Ala	missense_variant
KMT2D	12	49444983	49444983	Missense_Mutation	novel	782	c.2483C>T	p.Pro828Leu	missense_variant
PALB2	16	23637709	23637709	Missense_Mutation	rs780415750	1754	c.2596G>T	p.Gly866Cys	missense_variant
CDK12	17	37682375	37682375	Missense_Mutation	rs56362165	3657	c.3566T>A	p.Leu1189Gln	missense_variant
APC	5	112175711	112175711	Missense_Mutation	rs139387758	116	c.4420G>A	p.Ala1474Thr	missense_variant
GFI1B	9	135862165	135862165	Missense_Mutation	rs114955344	750	c.100G>A	p.Val34Met	missense_variant,splice

7.2.2 Variantes descritas (dbSNP)

Dentre as cinquenta e oito (58) variantes exclusivas do grupo jovem, quinze (15) já foram descritas (isto é, possuem registro no banco dbSNP) e quarenta e três (43) foram classificadas como novas (pois não há descrição de variantes com registro dbSNP na posição genômica encontrada). Dentre as sessenta e quatro (64) exclusivas do grupo idoso, cinquenta e sete (57) apresentam dbSNP e sete (7) são novas. Todas as dez variantes em comum entre os grupos já foram descritas. Para fins de investigações futuras, filtramos as variantes com as ferramentas de predição (**Figura 18, step 4**) e mantivemos apenas as variantes com pelo menos um dos critérios mencionados. Posteriormente, com objetivo de manter as variantes germinativas, removemos as variantes presentes no banco de dados COSMIC (**Figura 18, step 5**).

Sete (7) das quinze (15) variantes exclusivas e já descritas do grupo jovem cumpriram com pelo menos um dos critérios estabelecidos, e estavam localizadas nos genes: *BRCA1*, *BRCA2*, *ATR*, *PARP1*, *KLK3*, *MSH6* e *GFIIB*. De acordo com a *ACMG Classification*, uma (1) variante foi classificada como *Pathogenic*, duas (2) como *Uncertain Significance (VUS)*, uma (1) como *Likely Benign* e três (3) como *Benign*. A variante patogênica rs398122612, no gene *BRCA2*, apresenta significância clínica para o Câncer de mama e ovário e síndrome de predisposição hereditária (*ClinVar*). De maneira similar, a variante rs1396926041 do *BRCA1*, classificada como *VUS*, apresentou significância clínica para Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário (**Tabela 8**).

Para o grupo idoso, nós aplicamos os mesmos filtros mencionados anteriormente (**Figura 18, step 4 e 5**) e mantivemos dez (10) de cinquenta e sete (57) variantes exclusivas do grupo idoso (com dbSNP), presentes nos genes: *AR*, *BRCA2*, *BRCA1*, *APC*, *PALB2*, *KMT2C*, *KMT2D* e *MSH6*. De acordo com a *ACMG Classification*, nove (9) foram classificadas como *VUS* e uma (1) como *Likely Benign* (**Tabela 9**).

Dentre as dez (10) variantes compartilhadas entre os dois grupos etários, nós mantivemos cinco (5) no gene *AR*. Dentre as cinco (5), uma (1) foi classificada como *Likely Pathogenic* e quatro (4) como *VUS*, de acordo com a *ACMG Classification*, (**Tabela 10**).

O *KMT2C* foi o gene com maior número de variantes compartilhadas entre os grupos. A variante rs3032358 encontrada no *AR* apresenta cinco (5) diferentes *HGSVc*. O *HSGVc c.185_186insGCAGCAGCA (VUS)* foi encontrado em quatorze (14) pacientes, *c.180_185del (VUS)* foi encontrado em cinco (5) pacientes, *c.171_185del (VUS)* em sete (7) pacientes, *c.185_186insGCA (VUS)* em doze (12) e *c.183_185del (Likely Pathogenic)* em quinze (15).

- 1 Surpreendentemente, sessenta e oito (68) dos setenta (70) pacientes apresentaram a variante
- 2 rs150073007 (*KMT2C*) presente no COSMIC e classificada como *Likely Pathogenic (stop*
- 3 *gained)* (**Figura 21**), o que nos levou a explorar mais essa variante.

Tabela 7. Sete variantes já descritas (dbSNP) exclusivas do grupo jovem, após aplicação dos filtros (Figura 2).

Gene	dbSNP	HGVS coding	Consequence (HGVSp)	CADD (Cscore)	Reported as		ACMG Classification	Clinvar (Diseases)
					PolyPhen-2	SIFT		
<i>BRCA1</i>	rs13969260	c.3677T>C	p.Phe1226Ser	29.1	probably_damaging(0.992)	deleterious(0)	VUS	Hereditary breast and ovarian cancer syndrome
<i>ATR</i>	rs76313059	c.5303A>G	p.Asp1768Gly	20.5	benign(0.031)	tolerated(0.15)	VUS	-
<i>BRCA2</i>	rs39812261	c.9376del	p.Gln3126SerfsTer37	-	-	-	Pathogenic	Breast-ovarian cancer, familial 2 Inherited cancer-predisposing syndrome
<i>PARP1</i>	rs74685966	c.404G>A	p.Gly135Asp	17.1	benign(0.034)	tolerated(0.82)	Likely benign	-
<i>KLK3</i>	rs61750343	c.373C>T	p.Arg125Cys	24.2	possibly_damaging(0.497)	deleterious(0)	Benign	-
<i>MSH6</i>	rs1800938	c.660A>C	p.Glu220Asp	21.7	benign(0.003)	tolerated(0.46)	Benign	Hereditary Cancer-Predisposing Syndrome, Endometrial Cancer, Lynch Syndrome, Colorectal cancer hereditary nonpolyposis
<i>GFI1B</i>	rs14009050	c.415G>T	p.Gly139Cys	27.6	probably_damaging(0.962)	tolerated(0.05)	Benign	-

Tabela 8. Dez variantes já descritas (dbSNP) exclusivas do grupo idoso, após aplicação dos filtros (Figura 2).

Gene	dbSNP	HGVS coding	Consequence (HGVSp)	CADD (Cscore)	Reported as		ACMG Classification	Clinvar (Diseases)
					PolyPhen-2	SIFT		
<i>APC</i>	rs587780553	c.8038C>A	p.Pro2680Thr	23,8	probably_damaging(0.999)	tolerated(0.11)	VUS	Hereditary cancer-predisposing syndrome
<i>AR</i>	rs3032358	c.185_186insGCAGCA	p.Gln79_Gln80dup	-	-	-	VUS	-
<i>BRCA2</i>	rs876661032	c.6988A>G	p.Ile2330Val	0,002	benign(0.007)	tolerated(1)	VUS	Hereditary breast and ovarian cancer syndrome Breast-ovarian cancer, familial 2
<i>KMT2D</i>	rs777559590	c.12940C>T	p.Pro4314Ser	14,33	benign(0.444)	deleterious_low_confidence(0)	VUS	-
<i>KMT2D</i>	rs780460242	c.7521T>A	p.His2507Gln	18,69	benign(0.003)	tolerated(0.07)	VUS	-
<i>MSH6</i>	rs374597395	c.148T>C	p.Trp50Arg	7,710,7,710	benign(0)	tolerated_low_confidence(0.61)	VUS	Hereditary cancer-predisposing syndrome Hereditary nonpolyposis colorectal neoplasms Lynch syndrome Breast-ovarian cancer, familial 1 Hereditary cancer-predisposing syndrome
<i>BRCA1</i>	rs56214134	c.3600G>C	p.Gln1200His	17,55	possibly_damaging(0.482)	deleterious(0.02)	Likely Benign	Hereditary breast and ovarian cancer syndrome Breast and/or ovarian cancer
<i>KMT2C</i>	rs547763902	c.10732C>A	p.His3578Asn	9,246	benign(0.086)	tolerated(0.37)	VUS	-
<i>KMT2C</i>	rs567984906	c.10234C>T	p.Arg3412Trp	25,2	probably_damaging(0.995)	deleterious(0)	VUS	-
<i>PALB2</i>	rs780415750	c.2596G>T	p.Gly866Cys	29,1	benign(0.087)	tolerated(0.12)	VUS	Familial cancer of breast Hereditary cancer-predisposing syndrome

Tabela 9. Cinco variantes em comum entre os grupos, após aplicação dos filtros (Figura 2).

Gene	dbSNP	HGVS coding	Consequence (HGVSp)	CADD (Cscore)	Reported as		ACMG Classification	Clinvar (Diseases)
					PolyPhen-2	SIFT		
AR	rs3032358	c.185_186insGCAGCAGCA	p.Gln78_Gln80dup-	-	-	-	VUS	-
AR	rs3032358	c.180_185del	p.Gln79_Gln80del-	-	-	-	VUS	Kennedy disease Androgen resistance syndrome
AR	rs3032358	c.171_185del	p.Gln76_Gln80del-	-	-	-	VUS	Kennedy disease Androgen resistance syndrome
AR	rs3032358	c.185_186insGCA	p.Gln80dup	-	-	-	VUS	Androgen resistance syndrome, Kennedy disease
AR	rs3032358	c.183_185del	p.Gln80del	-	-	-	Likely Pathogenic	-
<i>KMT2C</i>	rs150073007	c.2447dup	p.Tyr816Ter	-	-	-	Likely Pathogenic	-

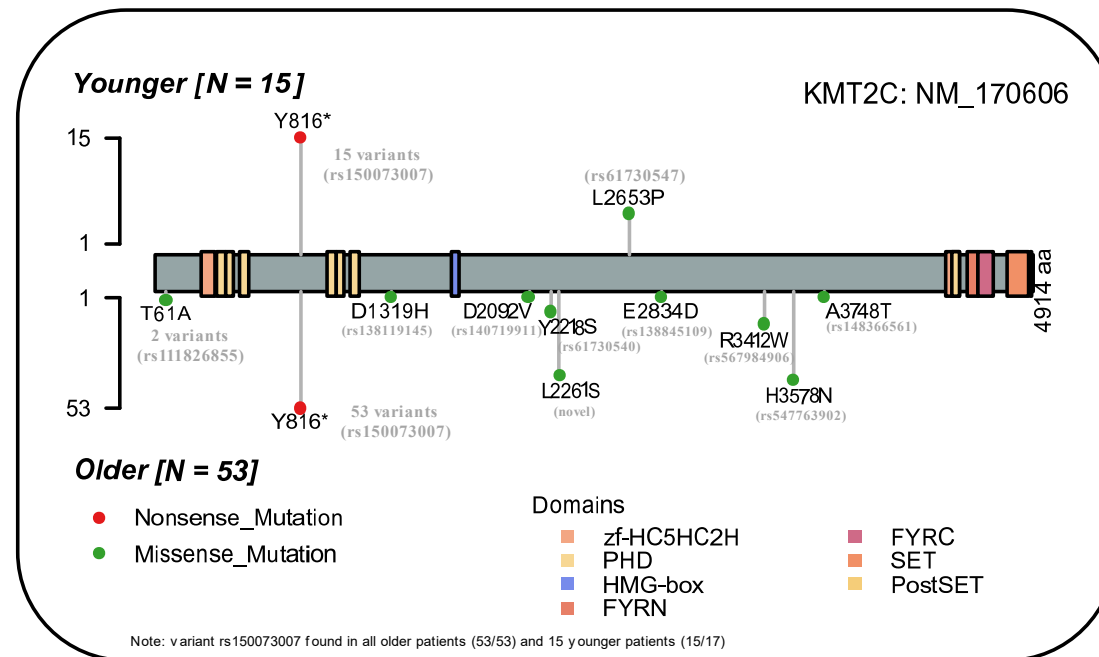


Figura 21. Localização das variantes ao longo da proteína *KMT2C*.

1 7.2.3 Variantes novas exclusivas de cada grupo

2

3 Identificamos quarenta e três (43) novas variantes exclusivas do grupo jovem e sete (7)
4 novas variantes exclusivas do grupo idoso (**Tabela 11, Figura 22**). Como essas variantes
5 nunca foram descritas na literatura, não aplicamos o filtro das ferramentas de predição
6 mencionado na Figura 18. Aqui, aplicamos apenas o filtro do COSMIC (banco de variantes
7 somáticas) (**Figura 18, Step 5**). No entanto, nenhuma variante foi encontrada no COSMIC.
8 Portanto, sugerimos que todas as novas variantes identificadas realmente são germinativas.

9 Dentre as quarenta e três (43) novas variantes exclusivas do grupo jovem nos genes:
10 *BRCA2* (18 variantes), *KMT2D* (16 variantes), *PARP1* (5 variantes), *AR*, *APC*, *ATR* e *MSH* (1
11 variante em cada) Dentre elas, onze (11, 26%) foram classificadas como *Pathogenic*, dezoito
12 (18, 42%) *Likely Pathogenic* e quatorze (14, 32%) *VUS*. O paciente 7418-JK-1-052 apresentou
13 dezoito (18) novas variantes, sendo uma (1) *Pathogenic*, nove (9) *Likely Pathogenic* e oito (8)
14 *VUS*. Interessantemente, todas as novas variantes no *BRCA2* (18 variantes) foram encontradas
15 neste paciente. O paciente 7418-JK-1-054 apresentou vinte e quatro (24) novas variantes, sendo
16 nove (9) *Pathogenic*, nove (9) *Likely Pathogenic* e seis (6) *VUS*.

17 As sete (7) novas variantes exclusivas do grupo idoso nos genes encontravam-se nos
18 genes: *KMT2D* (2 variantes), *AR* (2 variantes), *KMT2C*, *PTEN* e *ATR* (1 variante em cada).
19 Quatro (4) delas são SNPs (3 *missenses* e 1 *nonsense*) e três (3) deleções (de mais de uma base).
20 Dentre elas, três (3) foram classificadas como *Likely Pathogenic* e quatro (4) *VUS*. Não
21 encontramos novas variantes patogênicas exclusivas do grupo idoso.

Tabela 10. Identificação de novas variantes exclusivas em cada grupo (jovem=younger, idoso=older).

Group	Gene	Position (GRCh37/hg19)/dbSNP	HGVS coding	Consequence (HGVSp)	DP	CADD (Cscore)	Reported as		ACMG Classification
							PolyPhen-2	SIFT	
Younger									
<i>BRCA2</i>	chr13:32968883::AAGAAGGCC	c.9313_9314insAAGA	p.F3105delins*		55	-	-	-	LP
<i>BRCA2</i>	chr13:32968890:AGA	c.9321_9323del	p.D3108del		60	-	-	-	VUS
<i>BRCA2</i>	chr13:32968896:GG	c.9326_9327insGG	p.N3110Vfs*11		58	-	-	-	LP
<i>BRCA2</i>	chr13:32968897::CGCC	c.9327_9328insCGCC	p.N3110Rfs*3		58	-	-	-	LP
<i>BRCA2</i>	BRCA2:c.9329A>C	c.9329A>C	p.N3110T		58	25	probably_damaging(0.992)	deleterious(0)	VUS
<i>BRCA2</i>	chr13:32968899:32968900:DUP	c.9331dup	p.E3111Gfs*5		58	-	-	-	P
<i>BRCA2</i>	chr13:32968904:ACA	c.9335_9337del	p.D3112_I3113delinsV		58	-	-	-	VUS
<i>BRCA2</i>	chr13:32968909:GCTTGCA	c.9339_9340insGCTT	p.I3114Afs*5		58	-	-	-	LP
<i>BRCA2</i>	chr13:32968914:GCCT	c.9345_9348del	p.K3115Nfs*4		61	-	-	-	LP
<i>BRCA2</i>	chr13:32968924::AGGC	c.9354_9355insAGGC	p.L3119Rfs*32		58	-	-	-	LP
<i>BRCA2</i>	chr13:32968929:TGCTGCAAGC	c.9360_9369del	p.A3121Tfs*39		66	-	-	-	LP
<i>BRCA2</i>	chr13:32968941::TGT	c.9371_9372insTGT	p.N3124_L3125insV		68	-	-	-	VUS
<i>BRCA2</i>	BRCA2:c.9378G>T	c.9378G>T	p.Q3126H		69	25.6	probably_damaging(0.951)	deleterious(0)	VUS
<i>BRCA2</i>	chr13:32968949:GGCG	c.9380_9383del	p.W3127Yfs*35		72	-	-	-	LP
<i>BRCA2</i>	chr13:32968954:CC	c.9385_9386del	p.P3129Rfs*20		71	-	-	-	LP
<i>BRCA2</i>	chr13:32968958::GTC	c.9388_9389insGTC	p.E3130delinsGQ		73	-	-	-	VUS
<i>BRCA2</i>	BRCA2:c.9389A>T	c.9389A>T	p.E3130V		73	26.6	possibly_damaging(0.786)	deleterious(0)	VUS
<i>BRCA2</i>	chr13:32968966:TCAGGCCCTTC	c.9397_9408del	p.S3133_L3136del		77	-	-	-	VUS
<i>PARP1</i>	chr1:226551665::CAGGGAGA	c.2765_2766insTCTC	p.E923Lfs*13		50	-	-	-	P
<i>PARP1</i>	chr1:226578316::T	c.412_413insA	p.R138Qfs*18		60	-	-	-	P
<i>PARP1</i>	chr1:226578318::CCGTATCATG	c.410_411insACCAA	p.R138Pfs*31		72	-	-	-	P
<i>PARP1</i>	chr1:226578321::ACATA	c.407_408insTATGT	p.Q136Hfs*18		68	-	-	-	P
<i>PARP1</i>	chr1:226578324::TTTT	c.404_405insAAAA	p.Q136Kfs*21		65	-	-	-	LP
<i>KMT2D</i>	chr12:49427526::CC	c.10962_10963insGG	p.L3655Gfs*4		129	-	-	-	LP
<i>KMT2D</i>	chr12:49427527::CCACAGGGG	c.10961_10962insCCC	p.G3654_L3655insPCG		130	-	-	-	VUS
<i>KMT2D</i>	chr12:49427534::GTGGGCAAGC	c.10954_10955insACC	p.A3652Dfs*12		132	-	-	-	LP
<i>KMT2D</i>	chr12:49427537::C	c.10951_10952insG	p.Q3651Rfs*24		129	-	-	-	LP
<i>KMT2D</i>	chr12:49427540::TGACCCCTGG	c.10948_10949insCCA	p.G3650delinsAIPPGVR		129	-	-	-	VUS
<i>KMT2D</i>	chr12:49427543::TA	c.10945_10946insTA	p.G3649Vfs*10		124	-	-	-	LP
<i>KMT2D</i>	chr12:49427545::T	c.10943_10944insA	p.G3650Wfs*25		124	-	-	-	LP
<i>KMT2D</i>	chr12:49427548::CAGCCTGGT	c.10940_10941insACC	p.G3649_G3650insCPG		124	-	-	-	VUS
<i>KMT2D</i>	chr12:49438253::AAGGTAAA	c.5016_5017insTTTA	p.P1672_D1673insFNL		130	-	-	-	VUS
<i>KMT2D</i>	chr12:49438257::CCTATAGTTC	c.5012_5013insGGCT	p.S1671delinsRADGALQFNALHVLHTTCVW*		125	-	-	-	VUS
<i>KMT2D</i>	chr12:49440524::CCTG	c.4286_4287msCAGG	p.C1430Rfs*3		139	-	-	-	P
<i>KMT2D</i>	chr12:49440525::GAAGTCCCA	c.4285_4286insGTGA	p.V1429Gfs*12		139	-	-	-	P
<i>KMT2D</i>	chr12:49440530::TTGTGTGATC	c.4280_4281insGCCA	p.C1427Wfs*86		175	-	-	-	P
<i>KMT2D</i>	chr12:49440532::GGC	c.4278_4279insGCC	p.E1426_C1427insA		178	-	-	-	LP
<i>KMT2D</i>	chr12:49440534::CCGACCCCTC	c.4276_4277insTAGC	p.E1426Vfs*13		149	-	-	-	P
<i>MSH6</i>	chr2:48026562::GTAGATGCATC	c.1439_1440insGTAG	p.A481*		63	-	-	-	P
<i>ATR</i>	chr3:142281541::CTCTTACTTT	c.703_704insCTGGTA	p.V235Afs*7		60	-	-	-	LP
<i>AR</i>	chrX:66765465::AGTATCTTCA	c.476_477insAGTATC	p.A159_A160insVSSVLLPALSSSREPLHSANGAQGVGRTAG		109	-	-	-	VUS
<i>APC</i>	chr5:112174731::TCTCTTCATT	c.3439_3440insTCTC	p.Y1147Ffs*9		66	-	-	-	P
<i>KMT2D</i>	chr12:49440528::GGTGTGCTG	c.4282_4283insCACT	p.I1428delinsTLHTTPALEQHHL		175	-	-	-	LP
Older									
<i>KMT2C</i>	KMT2C:c.6782T>C	c.6782T>C	p.Leu2261Ser		1925	20.8	probably_damaging(0.994)	tolerated(0.14)	VUS
<i>KMT2D</i>	chr12:49445373:GTGGGGGAGT	c.2040_2093del	p.Ala686_Glu703del		717	-	-	-	VUS
<i>PTEN</i>	PTEN:c.10A>G	c.10A>G	p.Ile4Val		375	6.70	benign(0)	tolerated(1)	LP
<i>KMT2D</i>	KMT2D:c.2483C>T	c.2483C>T	p.Pro828Leu		782	11.6	benign(0)	leleterious_low_confidence(0)	VUS
<i>AR</i>	chrX:66765176:A	c.188del	p.Gln63ArgfsTer112		276	-	-	-	LP
<i>AR</i>	AR:c.887A>C	c.887A>C	p.Asp296Ala		2864	17.04	benign(0.341)	leleterious_low_confidence(0)	VUS
<i>ATR</i>	ATR:c.6265C>T	c.6265C>T	p.Arg2089Ter		2305	46	-	-	LP

LP – Likely Pathogenic, P – Pathogenic, VUS - Uncertain Significance.

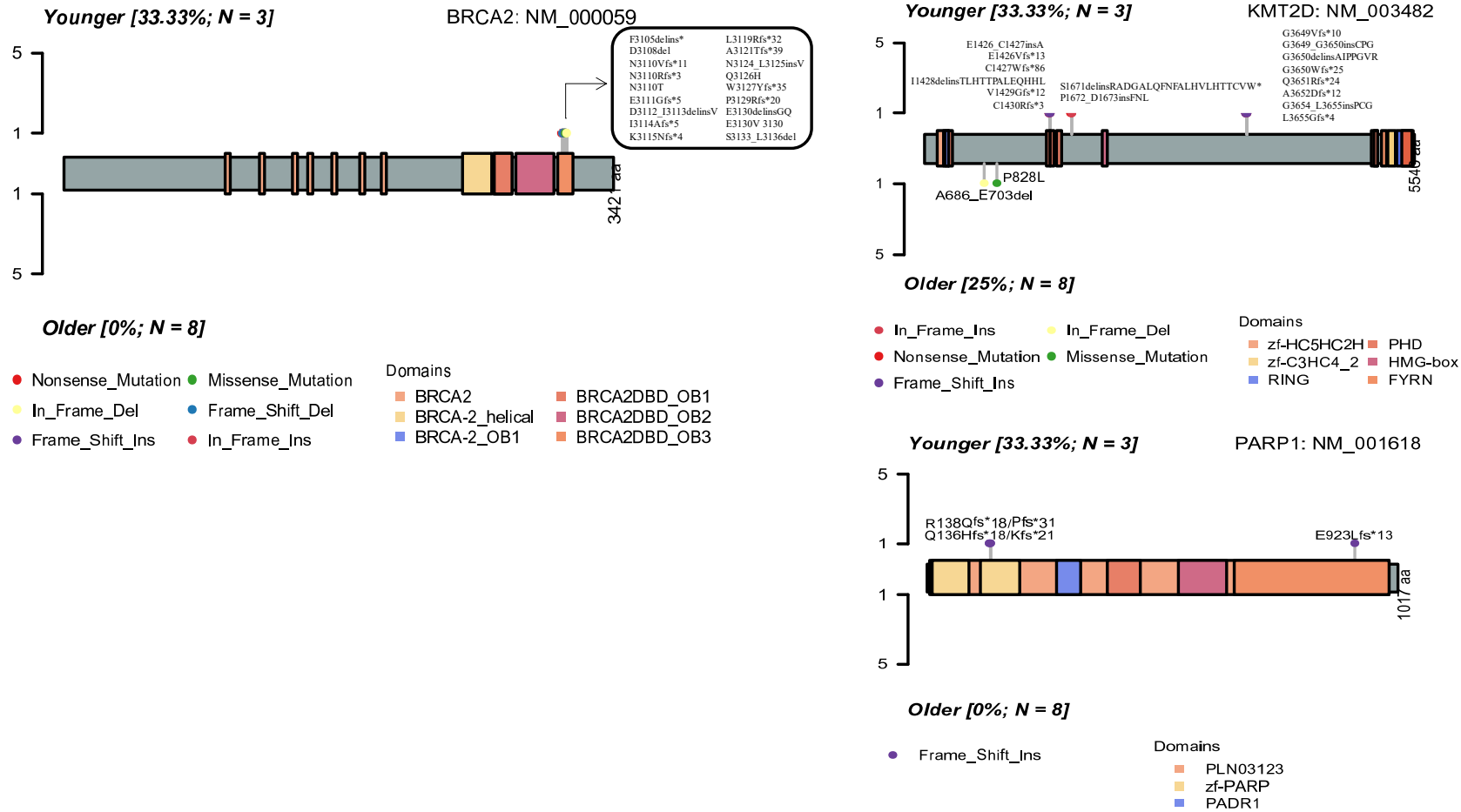
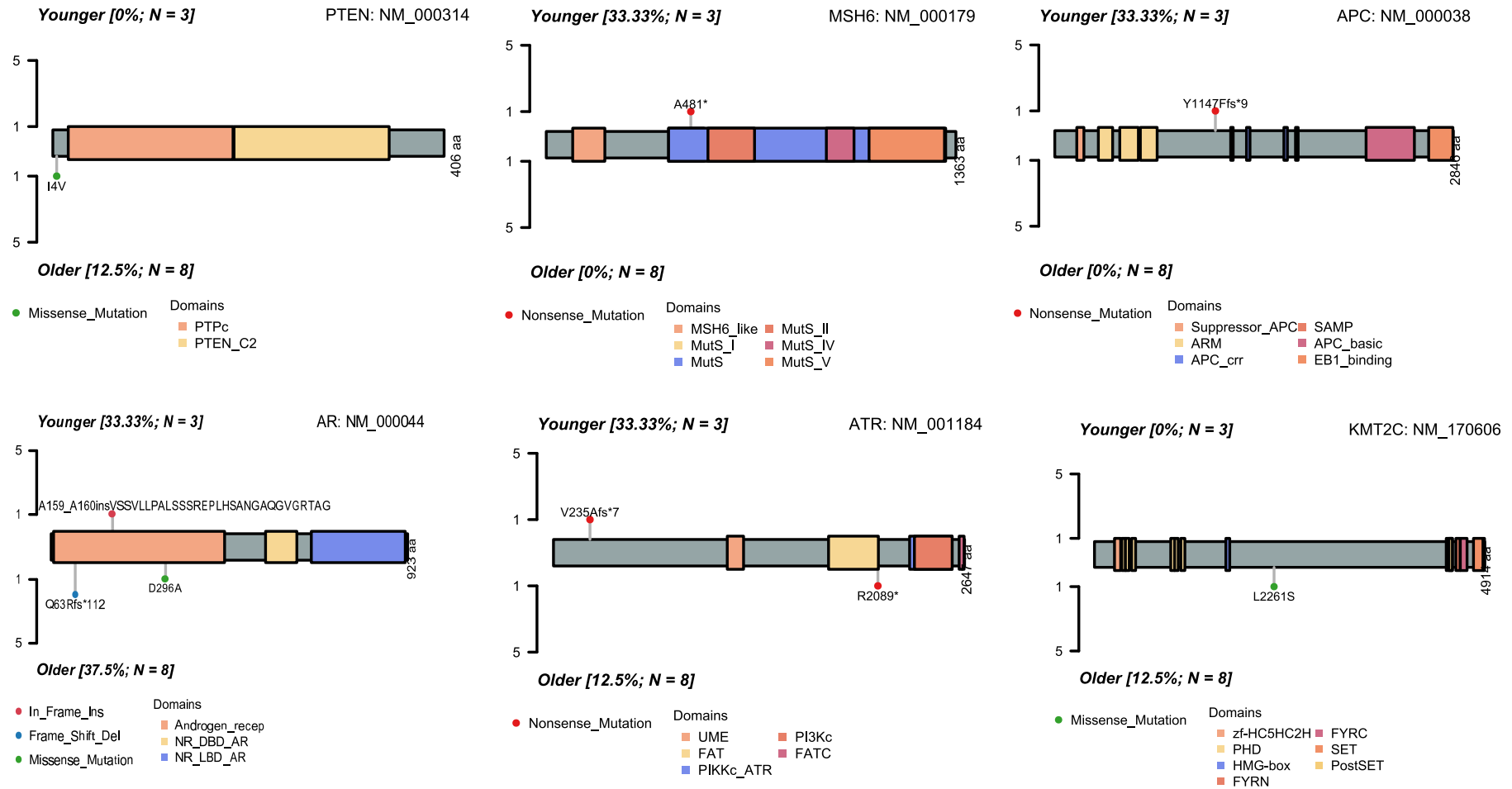


Figura 22. Localização das novas variantes e os respectivos domínios das proteínas. As variantes encontradas na nossa coorte são mostradas por um *lollipopplot*, com o tipo de variante e domínio indicados por cores. Acima: novas variantes exclusivas do grupo jovem; abaixo: novas variantes exclusivas do grupo idoso.



Continuação da **Figura 22**.

1 7.2.4 Genes de reparo de DNA (DRGs)

2
3 Foram sequenciadas regiões codificadoras de nove (9) genes de reparo de DNA
4 (DRGs): *ATR*, *BRCA1/2*, *CHEK2*, *MLH1*, *MSH6*, *NBN*, *PALB2* e *PARP1*. No entanto, após
5 aplicação dos filtros: variantes não sinônimas e $DP \geq 50$, o gene *CHEK2* foi excluído da análise
6 pois não apresentou variantes com $DP \geq 50$. Um total de sessenta e sete (67) variantes
7 germinativas (jovem: 37 variantes; idoso: 30 variantes) em oito (8) DRGs foram detectadas em
8 amostra de sangue venoso periférico de trinta e três (33) pacientes (33/70) (**Figura 23**). Destes,
9 nove (9) são do grupo jovem (27%) e vinte e quatro (24) do grupo idoso (73%). Apesar do
10 grupo idoso apresentar maior frequência de variantes em DRGs quando comparado ao grupo
11 jovem (73% vs. 27%), nosso estudo não fornece evidência de associação entre ser jovem/idoso
12 e apresentar/não apresentar variantes germinativas em DRGs (*Chi-square Test*, p-
13 value=0.582).

14 Os genes mais frequentemente mutados na amostra total foram *BRCA2* (17%), *NBN*
15 (11%) e *ATR* (9%). O gene *PARP1* está mutado em 22% do grupo jovem, mas não apresenta
16 variante no grupo idoso, enquanto o gene *PALB2* está mutado 8% do grupo idoso, mas não está
17 mutado no grupo jovem. Quando analisamos os grupos separadamente, observamos que
18 *BRCA2* e *PARP1* foram os genes com maior número de variantes no grupo jovem, enquanto no
19 grupo idoso foi *BRCA2* e *NBN*. Dentre as trinta e sete (37) variantes em DRGs do grupo jovem,
20 vinte (20) são classificadas como *Pathogenic/Likely Pathogenic* e se distribuem nos genes:
21 *BRCA2* (60%), *PARP1* (25%), *ATR* (5%), *MSH6* (5%) e *BRCA1* (5%). Por outro lado,
22 observamos apenas uma (1) variante *Likely Pathogenic* no grupo idoso, localizada no gene
23 *ATR*.

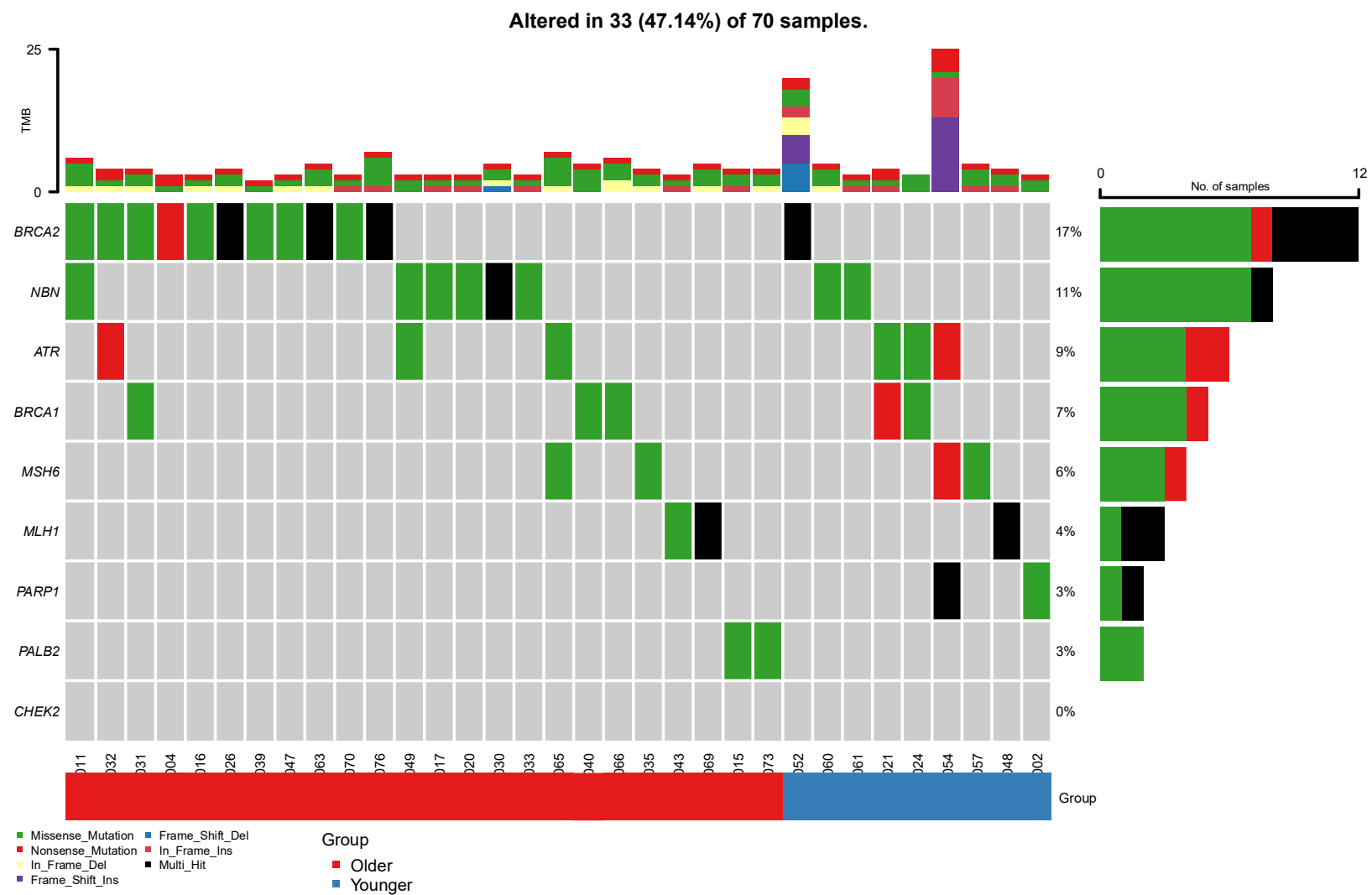


Figura 23. Oncoplot com as variantes nos genes de reparo.

7.2.5 Análise de evento exclusivo/ co-ocorrendo nos 10 genes com maior número de variantes encontradas (top10)

Com objetivo de detectar variantes em genes mutuamente exclusivos ou co-ocorrendo, utilizamos o *pair-wise Fisher's Exact Test*. Nosso estudo fornece evidência de evento mutuamente exclusivo entre os genes *KMT2C* e *ATR* (*pair-wise Fisher's Exact*, p-value: 0,006) e *KMT2C* e *KMT2D* (*pair-wise Fisher's Exact*, p-value: 0,03). Em contraste, temos evidência de evento co-ocorrendo entre os genes e *APC* e *CDK12* (*pair-wise Fisher's Exact*, p-value: 0,047) (**Figura 24**).

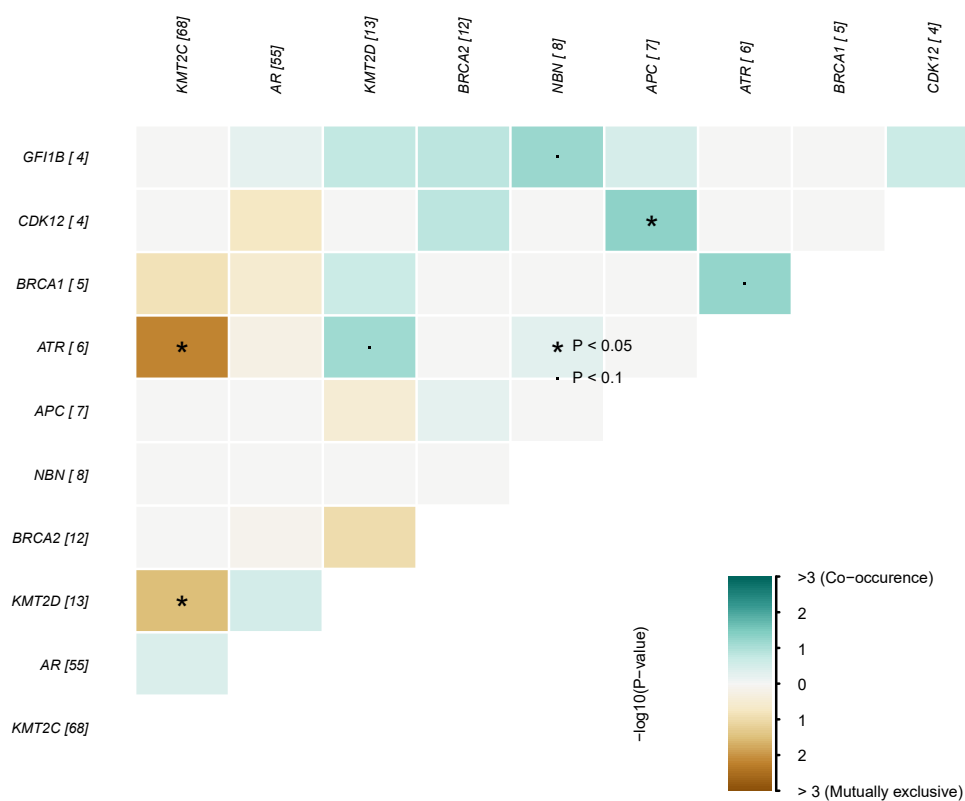


Figura 24. Análise de evento exclusivo/ co-ocorrendo nos 10 genes com maior número de variantes.

1 **7.3 Análise de sobrevivência em coortes de PCa**

2 Com o objetivo de investigar o efeito da perda de função do *KMT2C*, gene mais mutado na
3 nossa coorte, analisamos dados públicos genômicos de PCa. Para análise de sobrevivência
4 utilizamos dados de mutação da coorte *TCGA, Pan cancer*, 2018 (n=494) Adicionalmente, para
5 análise de sobrevida livre de doença (DFS) utilizamos os dados do *ICGC Prostate Cancer*
6 *Project* (PRAD-US + PRAD-UK). As coortes independentes analisadas no nosso estudo
7 mostraram a tendência em pior sobrevida livre de doença e sobrevida geral em pacientes com
8 mutações em *KMT2C* comparados àqueles sem mutação (**Figura 25**).

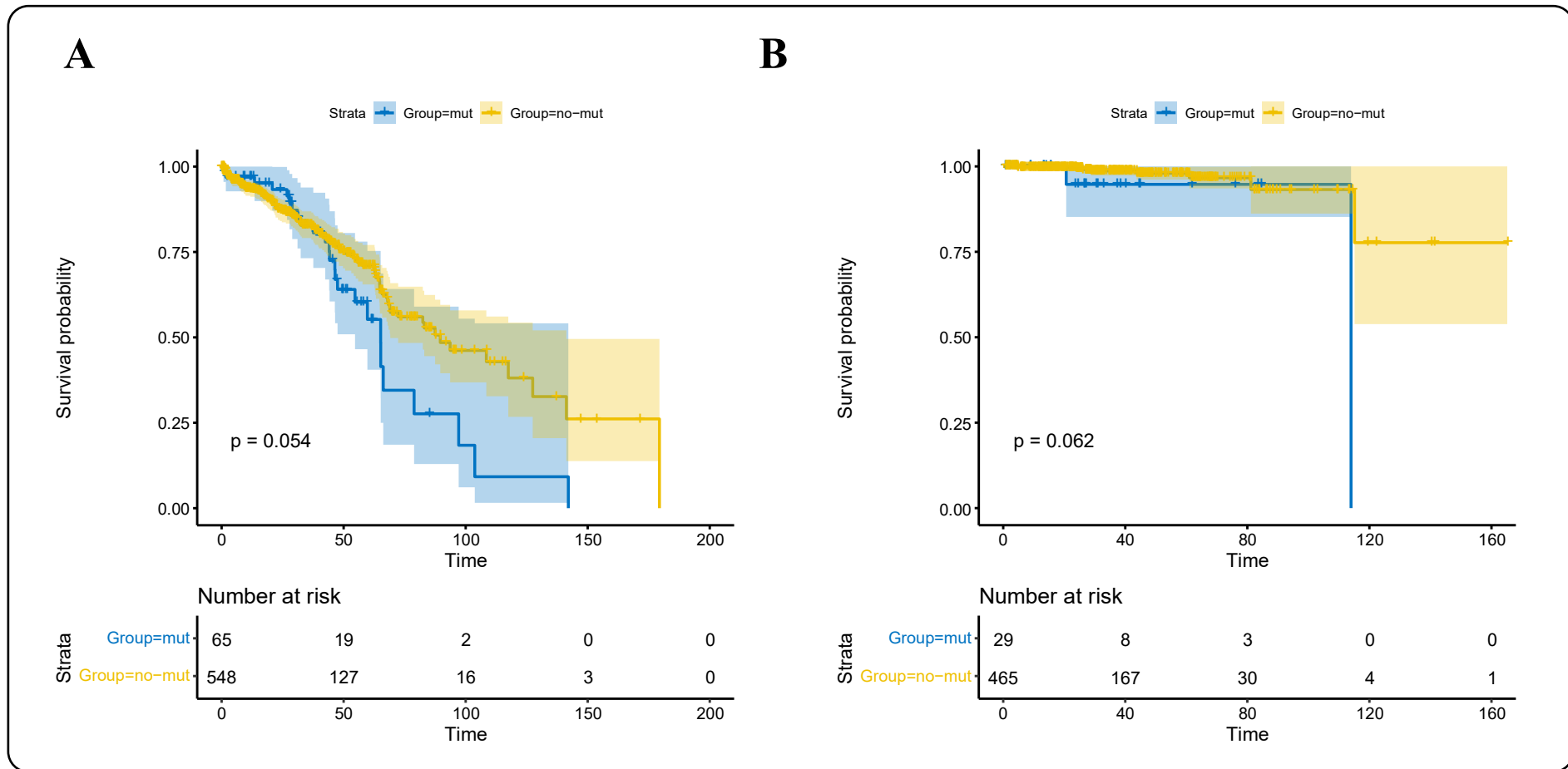


Figure 25. Curva Kaplan-Meier ilustrando a DFS e OS de pacientes com PCa de acordo com status mutacional do gene *KMT2C*. **A** Curva ilustrando a probabilidade de DFS de pacientes com PCa da coorte ICGC Prostate Cancer Project (PRAD-US + PRAD-UK, n=613). **B** Curva ilustrando a probabilidade de OS de pacientes com PCa da coorte TCGA, Pan-cancer (2018, n=494). Kaplan-Meier P value was determined by the log-rank test. DFS, *Disease free survival*; OS, *Overall survival*.

8. DISCUSSÃO

1 Cerca de 10% dos homens diagnosticados com PCa têm menos de 55 anos
2 (HOWLADER *et al.*, 2019). Embora os casos venham aumentando nesta faixa etária, os dados
3 disponíveis para esse grupo de pacientes são escassos e conflitantes. Na literatura, o *cut-off* de
4 idade para definir o PCa precoce (*early-onset*) é arbitrário, podendo variar entre 50-55 anos
5 (HUSSEIN, SATTURWAR e VAN DER KWAST, 2015). Aqui, definimos PCa precoces
6 indivíduos diagnosticados com idade ≤ 55 anos e comparamos o comportamento clínico
7 patológico e os achados do sequenciamento de DNA germinativo desse subgrupo com os
8 indivíduos que são diagnosticados tardiamente (≥ 60 anos).

9 Este estudo retrospectivo demonstrou que as características clinicopatológicas dos
10 pacientes mais jovens (≤ 55 anos) foram similares à pacientes idosos (≥ 60 anos) diagnosticados
11 com PCa. Esses dados são concordantes com estudos mais antigos que reportaram que o estágio
12 tumoral e a sobrevida geral em homens com idade < 50 anos, nos quais não foram notadas
13 diferenças marcantes em relação aos homens diagnosticados mais tardiamente (HUBEN *et al.*,
14 1982) (WERTHMAN *et al.*, 1992) (APRIKIAN, ZHANG e FAIR, 1994). Em contraste, alguns
15 trabalhos mostraram que homens diagnosticados mais precocemente apresentam piores
16 desfechos clínicos (KANTO *et al.*, 2002) (BRATT *et al.*, 2010) (THORSTENSON *et al.*,
17 2017), caracterizados com doença mais agressiva e mais alta mortalidade específica de PCa
18 (JOHNSON, LANIERI JR e AYALA 1972) (HUBEN *et al.*, 1982) (WILSON, KEMP e STEIN,
19 1984) (LIN, PORTER e MONTGOMERY, 2009). Apesar dos dados controversos, um estudo
20 mais recente sugeriu que os pacientes *early-onset* não representam um subgrupo distinto com
21 características clinicopatológicas específicas (BANIAK *et al.*, 2021). Os dados deste trabalho
22 demonstraram que 50% dos pacientes do grupo jovem apresentam HF positivo de câncer,
23 comparado a 32% dos pacientes do grupo idoso. Esse dado é consistente com estudos prévios
24 nos quais foi reportado que homens mais jovens apresentam maior frequência de HF positivo
25 quando comparados àqueles diagnosticados com a idade regular (PARKER *et al.*, 2011)
26 (BANIAK *et al.*, 2021) e essa frequência em coortes *early-onset* pode variar entre 0-43%
27 (CARTER *et al.*, 1992) (KANTO *et al.*, 2002) (PARKER *et al.*, 2011) (GIELCHINSKY *et al.*,
28 2018).

29 Embora não tenhamos encontrado diferenças entre os achados clinicopatológicos, o
30 grupo jovem tendeu a ter mais baixo grau (ISUP 1) e tumor confinado na próstata (T2), de
31 maneira similar aos achados de alguns estudos com este subgrupo, nos quais foi relatado que
32 os jovens tinham características mais favoráveis (SMITH *et al.*, 2000) (PARKER *et al.*, 2011)
33 (KINNEAR *et al.*, 2016) (POMPE *et al.*, 2018). Um estudo na Coreia reportou que os homens
34 com idade < 50 anos não tem características patológicas menos favoráveis (CHUNG *et al.*,

1 2019). Esses achados contrastam com o grupo comparador (≥ 60 anos), no qual a proporção de
2 indivíduos com a doença localizada (T2) e localmente avançada (T3-T4) é equivalente (30% e
3 27%, respectivamente).

4 Baniak e colaboradores (2021) e Kinnear e colaboradores (2016) relataram que os
5 pacientes jovens têm maior probabilidade de serem submetidos a PR, em concordância com os
6 nossos achados. Apesar da PR ter sido o tratamento mais comum da nossa coorte, 83%
7 (n=15/18) do grupo jovem realizou a PR, enquanto no grupo idoso essa proporção foi de 58%
8 (n=31/53). Na VA, 87% dos pacientes submetidos (13/15) pertencem ao grupo idoso. A VA
9 não é recomendada exclusivamente para pacientes com expectativa de vida reduzida, diferente
10 da *Watchful waiting*, mas sim para qualquer paciente de baixo risco (ISUP 1 e 2) (CHOYKE e
11 LOEB, 2017). A maior frequência de pacientes idosos submetidos a VA no nosso estudo pode
12 ser explicada de diferentes maneiras, mas destacamos aqui que o próprio médico pode optar
13 por não indicar a VA e o próprio paciente, mesmo que jovem e elegível, pode não optar pela
14 VA, visto que onze (11) jovens (11/18) apresentaram ISUP 1/2. Dentre os quinze (15) pacientes
15 submetidos a VA, dez (10) apresentaram ISUP 1 no momento da tomada de decisão e, apenas
16 1 deles não permaneceu na VA, com subsequente realização da PR. Os outros pacientes que
17 realizaram a PR após a VA foram classificados com ISUP ≥ 2 . Isso sugere que a VA é uma
18 opção viável para os pacientes classificados com ISUP 1 e corrobora com os estudos que
19 mostram que a VA é uma estratégia de sucesso e deve ser considerada como uma opção de
20 tratamento para esses pacientes (KLOTZ *et al.*, 2015). Em relação aos níveis PSA, observamos
21 diferença entre os níveis de PSA total pré-operatório (4, 4-10 e >10 ng/dL) entre os grupos
22 etários, em discordância com Baniak e colaboradores (2021), que reportaram níveis mais baixos
23 de PSA nos homens mais jovens. Ainda que 43% (6/14) dos pacientes jovens que realizaram
24 PR tenham apresentado BCR e no grupo idoso tenha sido 19% (6/31), não encontramos
25 evidência de associação entre os grupos. Nosso achado foi concordante com Baniak e
26 colaboradores (2021), que utilizou os mesmos critérios de definição de BCR. Huang e
27 colaboradores (2017) também não encontraram diferença na sobrevida livre de recorrência
28 entre homens com idade maior ou menor que 50 anos.

29 Nossos achados apresentam discordâncias e similaridades com os estudos já publicados.
30 Embora o número de pacientes do nosso estudo seja limitado, é importante destacar que há
31 poucos (ou nenhum) estudos brasileiros que comparam pacientes jovens e idosos. A
32 importância de estudos genéticos é ainda maior em populações miscigenadas, como a brasileira.

1 Em conclusão, a literatura atual evidencia grandes lacunas de conhecimento acerca do
2 comportamento clínico do PCa precoce. Estudos com coortes maiores deste subgrupo são
3 necessários para definir padrões clinicopatológicos e genéticos para estes pacientes.

4 Nesse estudo, realizamos o *Targeted DNA Sequencing* em amostras de sangue de
5 setenta e um (71) pacientes com PCa em dois hospitais do Brasil. Supreendentemente,
6 encontramos o *KMT2C/MLL3* como o gene mais frequentemente mutado na nossa coorte
7 (97%), seguido do *AR* (79%) e *BRCA2* (19%).

8 Alterações no regulador epigenético *KMT2C/MLL3* têm sido detectadas em vários tipos
9 de câncer humano, incluindo mama, próstata, colón, bexiga, síndrome mielodisplásica e
10 leucemia mieloide aguda (GUI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011; ELLIS *et al.*, 2012). Apesar do
11 *KMT2C/MLL3* ser o regulador mais frequentemente mutado em tumor de pacientes com PCa
12 (ARMENIA *et al.*, 2018) e, recentemente, ter sido descoberto como um gene condutor (*driver*)
13 da hematopoese clonal (PICH *et al.*, 2020), ainda não há estudos mostrando a frequência de
14 alterações genéticas em *KMT2C/MLL3* em amostra de sangue de pacientes com PCa. Aqui, nós
15 descrevemos pela primeira vez, no alcance do nosso conhecimento, a presença da variante
16 rs150073007 em células de sangue periférico de pacientes com PCa.

17 O gene *KMT2C/MLL3*, um dos membros da família de proteínas Metiltransferase Lisina
18 do tipo 2 (KMT2), codifica a histone-lysine N-methyltransferase 2C na qual adiciona um
19 radical metila à lisina 4 da histona H3 (H3K4me1). Com isso, ocorre maior acessibilidade
20 genômica e transcrição do gene-alvo (CHO *et al.*, 2018) (LAVERY *et al.*, 2020). Apesar de
21 estar mais frequentemente descrito em neoplasias hematológicas, estudos mais recentes têm
22 identificado diversas mutações em genes da família KMT2 em tumores sólidos, incluindo
23 mama, colón e pulmão (KANDOTH *et al.*, 2013) (CHEN *et al.*, 2014) (KUDITHIPUDI e
24 JELTSCH, 2014) (RAO e DOU, 2015). A maioria das mutações somáticas associadas ao câncer
25 são alterações *nonsense* e *frameshift* e ocorrem em heterozigose, embora aproximadamente
26 15% ocorram em homozigose (RAO e DOU, 2015). Na nossa coorte, *KMT2C/MLL3*
27 apresentou predominantemente alterações *nonsense*, que geralmente estão associadas à
28 formação de proteína truncada com perda da função. Esse achado está em concordância com o
29 de Limberger e colaboradores (2022) que, embora tenham analisado tecido tumoral prostático,
30 também notaram que a maioria das alterações em *KMT2C* eram truncadas (*nonsense*, *frameshift*
31 e *splicing*) em pacientes com PCa (coorte MSKCC/DFCI). Estes autores estabeleceram um
32 modelo murino com deleção próstata-específica do domínio SET de *KMT2C* e observaram
33 áreas focais de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) nos animais mutados com apenas
34 dezenove (19) semanas *post partum*, ao passo que os animais selvagens não apresentaram essas

1 alterações. Os animais mutados apresentaram mais células proliferativas e grupos de células
2 com maior expressão de AR, que é um *driver* primário da iniciação do PCA, sugerindo que a
3 perda da atividade catalítica de *KMT2C* aumenta a proliferação e inicia a tumorigênese. Como
4 estes animais mutados continuaram apenas com PIN até as noventa (90) semanas de vida,
5 concluiu-se que eventos secundários sejam necessários para a progressão do PCa
6 (LIMBERGER *et al.*, 2022). Além disso, o silenciamento do *KMT2C/MLL3* foi associado com
7 a expressão reduzida de componentes do sistema de reparo de DNA incluindo *ATM*, *ATR*,
8 *BRCA1* e *BRCA2* (RAMPIAS *et al.*, 2019).

9 Apesar das consequências biológicas das alterações em *KMT2C/MLL3* ainda não
10 estarem bem elucidadas, alterações em reguladores epigenéticos incluindo *KMT2C* estão
11 significativamente enriquecidas em tumores metastáticos e como um todo definem uma
12 assinatura genômica de doença de alto-risco (ARMENIA *et al.*, 2018). Em pacientes com
13 tumores gástricos apresentando mutações em *KMT2C* foi relatada pior recorrência livre de
14 doença comparado aos pacientes com tumores *KMT2C wild-type*, além de ser demonstrado que
15 a maioria dos tumores mutados apresentavam expressão baixa ou ausente da proteína *KMT2C*,
16 enquanto a maioria dos tumores selvagens expressavam altos níveis desta proteína (CHO *et al.*,
17 2018). Juntos, esses resultados sugerem que *KMT2C/MLL3* desempenha papel *driver* na
18 carcinogênese.

19 Ainda que a maioria dos achados estejam indicando um papel de *KMT2C* na
20 carcinogênese, Lian e colaboradores (2022) demonstraram que a expressão de *KMT2C/MLL3*
21 estava elevada em PCa e que *CLDN8* e *ITGAV* são seus genes-alvo, visto que apresentaram
22 maior diminuição de expressão após silenciamento do *KMT2C/MLL3*. Nesse contexto,
23 *KMT2C/MLL3* atuaria como oncogene no PCa, pois quando foi feito seu *knockdown* houve
24 diminuição da proliferação, da formação de colônias e da migração em algumas linhagens de
25 PCa (LIAN *et al.*, 2022).

26 *KMT2C/MLL3* foi detectado como *driver* da hematopoese clonal (HC) (PICH *et al.*,
27 2022), um fenômeno de expansão asintótica das células sanguíneas que descendem de uma
28 única célula progenitora hematopoética (CPH) que acumula mutações somáticas devido ao
29 aumento da idade. A maioria dessas mutações somáticas da HC são neutras, mas conferem
30 vantagem competitiva às CPH mutadas durante a hematopoese. Assim, uma única CPH pode
31 produzir uma população clonal de células sanguíneas que herdaram o mesmo grupo de mutações
32 (HONG *et al.*, 2022). Tais mutações têm sido descritas em tumores sólidos, como mama, ovário
33 e pulmão (RUARK *et al.*, 2013) (HONG *et al.*, 2022). Recentemente, um estudo utilizando

1 dados públicos de sequenciamento mostrou que 35% dos pacientes com PCa apresentam
2 (523/1494) CH (BOLTON *et al.*, 2020).

3 Os nossos dados indicaram a presença de onze (11) variantes em *KMT2C/MLL3* nas
4 células do sangue periférico. Após aplicação dos filtros mencionados na Figura 18, restaram
5 quatro (4) variantes, sendo uma (1) em comum entre os grupos e três (3) exclusivas do grupo
6 idoso. A variante em comum (rs150073007) foi a variante destacada na Tabela 7. Dentre as três
7 (3) exclusivas, duas (2) já foram descritas (p.His3578Asn e p.Arg3412Trp) e uma (1) é nova
8 (p.Leu2261Ser). A única variante em comum entre os grupos é a variante rs150073007
9 NM_170606.3(KMT2C):c.2447dup (p.Tyr816Ter). Esta variante não foi previamente
10 reportada em PCa, mas está descrita no banco de dados COSMIC como uma alteração somática
11 encontrada em câncer endometrial, colorretal, melanoma e em leucemia prolinfocítica. De
12 acordo com o COSMIC, a rs150073007 está amplamente distribuída em tecido hematopoético
13 e linfóide e, surpreendentemente, é a primeira vez que é descrita em sangue de pacientes com
14 PCa. Na nossa coorte, essa variante *nonsense* (associada a uma proteína truncada), está presente
15 em quinze (15) pacientes do grupo jovem e em todos os pacientes idosos. De acordo com a
16 ACMG, a variante está classificada como *Likely Pathogenic* e no nosso sequenciamento
17 apresenta uma faixa de profundidade entre 80-6689. A mesma variante já foi descrita em
18 carcinoma ovariano (KIM *et al.*, 2019), leucemia infantil (BOWLER *et al.*, 2014) e mais
19 recentemente como uma alteração somática em câncer de pulmão (ZHU *et al.*, 2022).
20 Consideramos improvável que esta seja uma variante germinativa, uma vez que ela não está
21 presente na população saudável segundo os bancos de dados ABraOM e gnomAD. Por outro
22 lado, esta variante tampouco está presente nos bancos de dados de mutações somáticas de
23 tecidos tumorais de próstata, o que nos levou à hipótese que essa variante seja somática e
24 associada à hematopoese clonal, uma vez que encontramos nas células do sangue de nos nossos
25 pacientes. Experimentos adicionais estão em andamento para elucidar a questão. O compendio
26 de genes *drivers* da CH está disponível em www.intogen.org/ch.

27 Assim como o presente estudo, encontramos relatos científicos sobre mutações que
28 resultam em perda de função da proteína associada. Limberg e colaboradores (2022)
29 analisaram dados de PCa derivados do *International Cancer Genome Consortium* (n=724) e
30 encontraram que as mutações truncadas (*nonsense e frameshift*) estão correlacionadas com
31 redução da sobrevida livre de doença, de modo consistente com nossos achados. Apesar da
32 pouca evidência no PCa, a mesma correlação já foi reportada para outros tipos de tumor sólido.
33 Mutações somáticas e baixa expressão de *KMT2C* foram correlacionados com pior sobrevida
34 geral e sobrevida livre de doença em câncer de mama (LIU *et al.*, 2021). Outro estudo com

1 câncer de mama reportou que mutações em *KMT2C* estão associadas ao pior prognóstico e mais
2 baixa sobrevida geral comparado ao grupo *wild-type* (CHEN *et al.*, 2019). Análises em
3 adenocarcinoma gástrico mostraram que pacientes com alta expressão de *KMT2C* tem melhor
4 sobrevida livre de recorrência e sobrevida global comparados àqueles com baixa expressão
5 (perda de função) de *KMT2C* (CHO *et al.*, 2018). Juntos, esses dados mostram que as mutações
6 truncadas de *KMT2C*, incluindo a mutação rs150073007, podem ser usadas como
7 biomarcadores para doença agressiva.

8 O AR foi o segundo gene com mais mutações na nossa coorte (55/70, 79%). A variante
9 mais comumente encontrada no AR (rs3032358, com 5 alterações diferentes) está
10 compartilhada entre os grupos e não há relatos na literatura associando-a com o PCa. Além
11 disso, nenhuma das alterações encontradas na nossa coorte está presente em bancos de dados
12 de indivíduos saudáveis, incluindo ABraOM. No entanto, ainda não há evidência de
13 patogenicidade dessas variantes, de acordo com os bancos de dados disponíveis. A única
14 alteração encontrada no ABraOM para essa variante (rs3032358) quando aplicamos o filtro de
15 qualidade do GATK é a “c.170_171insGC:p.L57delinsLQ”, que não está presente nos dados
16 do nosso grupo de pacientes.

17 Alterações em genes envolvidos com mecanismos de reparo de DNA (DGRs) (reparo
18 de excisão de base/nucleotídeo, malpareamento, recombinação homóloga (HRR) e união de
19 extremidades não homólogas,) podem aumentar o risco de desenvolver câncer (DOAN *et al.*,
20 2021). Aqui, trinta e três (33) pacientes (47%) apresentaram uma ou mais mutações
21 germinativas nestes genes, sendo o *BRCA2* o gene com mais mutações e com maior número de
22 variantes LP/P, concordando com os estudos publicados por Nicolosi e colaboradores (2019) e
23 Tang e colaboradores (2022). O *BRCA2* envolvido no mecanismo de HRR está associado a
24 susceptibilidade genética ao PCa (ABIDA *et al.*, 2017) e mutações neste gene aumentam o
25 risco de 2-5 vezes comparado aos homens da população geral (NYBERG *et al.*, 2020). A
26 inativação deste gene está associada à doença mais agressiva, ao risco aumentado para doença
27 metastática e à pior sobrevida global (CASTRO *et al.*, 2013) (MILLER *et al.*, 2018) (TAYLOR
28 *et al.*, 2017) (NIENTIEDT *et al.*, 2022) (NAROD *et al.*, 2008) (EDWARDS *et al.*, 2010).

29 Mutações em DGRs são mais prevalentes em pacientes com estágio clínico avançado
30 diagnosticados até os 65 anos (TANG *et al.*, 2022). Nosso estudo não fornece evidência de
31 associação entre ser jovem (≤ 55 anos) ou idoso (≥ 60 anos) e apresentar variantes germinativas
32 em DGRs. De maneira similar, quando analisamos as mutações em *BRCA2*, não encontramos
33 evidência de associação com a idade, em concordância com Nyberg e colaboradores (2020)
34 que descreveram que o risco relativo de *BRCA2* não varia substancialmente com a idade

1 (NYBERG *et al.*, 2020). Por outro lado, um estudo anterior sugere risco mais alto em homens
2 mais jovens (<55 anos) que apresentaram mutações truncadas em *BRCA2* (AGALLIU *et al.*,
3 2007).

4 Nossa coorte não fornece evidências suficientes de associação entre doença mais
5 agressiva (estágio tumoral, ISUP, PSA pré-operativo) em indivíduos com *BRCA2* mutados
6 (n=12) comparados aos indivíduos que não tem mutações em *BRCA2* (n=58). Esse achado
7 contrasta com muitos estudos (MITRA *et al.*, 2008) (TAYLOR *et al.*, 2017) (NYBERG *et al.*,
8 2020). Essa discrepância pode ser devida à variabilidade entre os tipos de análises de dados
9 clinicopatológicos disponíveis na literatura, principalmente ISUP e nível de PSA. Essa é uma
10 limitação do nosso estudo e talvez alguns dados estejam discrepantes devido ao pequeno
11 número de indivíduos jovens, embora essa seja uma limitação da maioria dos estudos, devido
12 à baixa frequência do PCa em indivíduos jovens. Estudos maiores com este subgrupo são
13 necessários para confirmar essas associações.

14 Em particular, a mutação truncada rs11571833 (p.Lys3326Ter) no *BRCA2* conhecida
15 como K3326X e associada ao risco de desenvolvimento de tumores sólidos, como mama
16 (THOMPSON *et al.*, 2015), pâncreas (MARTIN *et al.*, 2005) (OBAZEE *et al.*, 2019) e bexiga
17 (GE *et al.*, 2016) foi encontrada no nosso estudo. No PCa, parece ser uma variante de baixo a
18 moderado risco, porém, esse dado ainda não está bem elucidado (BOYLE *et al.*, 2020).

19 Além do *BRCA2*, o loci 17q-21-22 que foi inicialmente reportado por um grupo da
20 Universidade de Michigan como uma região de susceptibilidade ao PCa (LANGE *et al.*, 2003),
21 tem sido extensivamente estudado por outros consórcios. Embora existam inúmeras variantes
22 descritas no *HOXB13*, gene localizado nesse loci, a mutação germinativa rara G84E
23 identificada em 2012 [p.(Gly84Glu), c.251G>A, rs138213197] é a mais conhecida por conferir
24 susceptibilidade genética ao PCa em homens de ancestralidade europeia (TIMOFTE *et al.*,
25 2021). Esta variante determina uma mudança de uma guanina para adenosina (c.251G→A) na
26 segunda posição do códon 84 (GGA→GAA), resultando em uma substituição de um ácido
27 glutâmico por uma glicina (G84E). A mutação G84E está incluída nas diretrizes do *National*
28 *Comprehensive Cancer Network (NCCN)* para rastreamento de PCa hereditário (DUPONT *et*
29 *al.*, 2021).

30 Apesar da G84E estar associada ao PCa precoce (≤ 55 anos) e a história familiar positiva,
31 nosso estudo não forneceu evidência da presença da mutação em homens brasileiros com PCa
32 (EWING *et al.*, 2012) (XU *et al.*, 2013). Em concordância, até o presente momento não há
33 estudos com brasileiros relatando a presença da variante. No entanto, estudos do Hospital Johns

1 Hopkins e de um Consórcio internacional de ancestralidade europeia relataram que homens
2 com PCa têm maior probabilidade de apresentar a alteração G84E comparados aos homens sem
3 PCa (EWING *et al.*, 2012) (DUONT *et al.*, 2021). Um outro estudo independente do Reino
4 Unido (UK Biobank) com diferentes tipos de câncer mostrou que esta mutação está
5 significativamente associada ao risco aumentado de câncer apenas em homens e é relativamente
6 comum em descendentes europeus (WEI *et al.*, 2020). No nosso estudo, vinte e sete (27)
7 pacientes apresentam história familiar positiva de câncer. Destes, nove (9) pertencem ao grupo
8 jovem e dezoito (18) ao grupo idoso. O PCa foi responsável por 52% dos casos de história
9 família positiva e nenhum paciente apresentou mais de 2 familiares afetados com PCa.

10 As variantes novas exclusivas do grupo jovem foram encontradas nos pacientes 7418-
11 JK-1-050, 7418-JK-1-052 e 7418-JK-1-054. Entretanto, como os dois últimos apresentaram
12 TMB atípicos em relação ao restante do grupo jovem, apenas separamos estes dois pacientes
13 para investigações futuras. Além da idade ao diagnóstico, a história familiar positiva de câncer
14 e a recorrência bioquímica (BCR) após a PR foram as características em comum entre estes
15 pacientes. Os pacientes 7418-JK-1-052 e 7418-JK-1-054 apresentaram BCR após seis (6) e sete
16 (7) anos de PR, respectivamente. O primeiro relatou dois parentes de primeiro grau afetados
17 (pai com PCa e irmã com câncer de estômago) enquanto o 7418-JK-1-054 relatou HF em um
18 parente de primeiro grau (irmão com câncer de intestino). Ambos tiveram irmãos
19 diagnosticados, o que sugere haver componente hereditário na família.

20 O paciente 7418-JK-1-052 apresentou alterações predominantemente no *BRCA2*
21 classificadas como 1) significância clínica incerta, 2) prováveis de serem patogênicas ou 3)
22 patogênicas. Ou seja, a presença dessas variantes pode ter contribuído na carcinogênese do PCa
23 deste paciente, visto que são alterações germinativas no gene de susceptibilidade genética mais
24 bem descrito no PCa (HUSSEIN, SATTURWAR e VAN DER KWAST, 2015). Entretanto,
25 como são alterações novas, seria necessário validar por outro método (sequenciamento Sanger)
26 para excluir a possibilidade de serem artefatos de sequenciamento NGS (DP: 55-77). Em
27 contrapartida, o 7418-JK-1-054 apresentou alterações novas predominantemente no *PARP1* e
28 *KMT2D*. Embora o grupo jovem tenha sido menor comparado ao grupo idoso, identificamos
29 43 novas variantes no primeiro grupo e 7 no segundo. As novas variantes exclusivas do grupo
30 idoso nos genes *KMT2D*, *AR*, *KMT2C*, *PTEN* e *ATR* foram classificadas com significância
31 clínica incerta ou prováveis de serem patogênicas, com uma mediana de profundidade (DP) de
32 782 (range:276- 2864). Diferente do ocorreu no grupo jovem, no grupo dos idosos não houve
33 paciente com TMB atípico.

1 A maior limitação do presente estudo é o número baixo de amostras, embora o número
2 de pacientes jovens tenha sido melhor que a nossa expectativa, uma vez que contamos com
3 amostras mais antigas que já haviam sido coletadas pelo grupo de Uro-oncologia da FMRP-
4 USP. Outra limitação do estudo foi não alcançar o objetivo específico 3.2.2. Isso ocorreu pois
5 não houve nenhuma variante que tenha se acumulado em um número suficiente de pacientes
6 com determinada característica clínico-patológica. Isso impossibilitou a realização de análises
7 de associação entre uma determinada variante com as diferentes variáveis clinicopatológicas
8 encontradas. Apesar de considerarmos esse fato uma limitação, também estamos cientes que
9 seja apenas o reflexo da grande heterogeneidade inerente ao câncer de próstata, amplamente
10 conhecida e debatida na literatura.

9. CONCLUSÕES

1 Nossa hipótese inicial de que biomarcadores genéticos poderiam auxiliar na
2 estratificação de risco e estabelecimento de VA de forma mais personalizada de acordo com a
3 faixa etária de diagnóstico do PCa. Apesar de não ter encontrado genes que possam estratificar
4 o risco entre os grupos etários, nosso estudo identificou 43 novas variantes exclusivas do grupo
5 jovem e 7 novas variantes exclusivas do grupo idoso. Validações serão necessárias para avaliar
6 o potencial dessas variantes na predição de risco, especialmente dos pacientes jovens. Para
7 validar essas variantes, buscaremos colaborações com outros grupos de pesquisa, pois faz-se
8 necessário um número maior de amostras, especialmente de pacientes jovens com PCa.

9 Surpreendentemente, encontramos a variante (rs150073007) localizada no gene *KMT2C*
10 em 68 dos 71 pacientes avaliados. As análises de sobrevivência complementares a partir de
11 dados públicos sugerem que o gene *KMT2C* seja um potencial biomarcador genético, capaz de
12 auxiliar a estratificação de risco de pacientes com PCa, independente da faixa etária.

13 Este estudo seguirá em desenvolvimento para confirmação do caráter somático ou
14 germinativo da variante rs150073007 no *KMT2C*. Para isso, será realizado sequenciamento
15 tradicional da região do *KMT2C* contendo a variante em todos os pacientes, incluindo não só
16 as amostras de DNA de sangue, mas também de saliva e tecido tumoral parafinado. Estudos
17 com coortes maiores são necessários para confirmar os achados clinicopatológicos e sua
18 associação com as características genéticas.

10. REFERÊNCIAS

AALINKEEL, Ravikumar *et al.* Gene expression of angiogenic factors correlates with metastatic potential of prostate cancer cells. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5311-5321, 2004.

ABIDA, Wassim *et al.* Prospective genomic profiling of prostate cancer across disease states reveals germline and somatic alterations that may affect clinical decision making. **JCO precision oncology**, v. 1, p. 1-16, 2017.

ABDEL-WAHAB, Omar *et al.* ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. **Cancer cell**, v. 22, n. 2, p. 180-193, 2012.

ADEKOYA, Timothy O.; RICHARDSON, Ricardo M. Cytokines and chemokines as mediators of prostate cancer metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4449, 2020.

ADHYAM, Mohan; GUPTA, Anish Kumar. A review on the clinical utility of PSA in cancer prostate. **Indian journal of surgical oncology**, v. 3, n. 2, p. 120-129, 2012.

AGALLIU, I. *et al.* Rare germline mutations in the BRCA2 gene are associated with early-onset prostate cancer. **British journal of cancer**, v. 97, n. 6, p. 826-831, 2007.

AGGARWAL, Bharat B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature reviews immunology**, v. 3, n. 9, p. 745-756, 2003.

ALBERTSEN, Peter C.; HANLEY, James A.; FINE, Judith. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. **Jama**, v. 293, n. 17, p. 2095-2101, 2005.

AL OLAMA, Ali Amin *et al.* A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. **Nature genetics**, v. 46, n. 10, p. 1103-1109, 2014.

ANGUITA, Eduardo *et al.* Transcription factor GFI1B in health and disease. **Frontiers in oncology**, v. 7, p. 54, 2017.

APRIKIAN, Armen G.; ZHANG, Zuo-Feng; FAIR, William R. Prostate adenocarcinoma in men younger than 50 years. A retrospective review of 151 patients. **Cancer**, v. 74, n. 6, p. 1768-1777, 1994.

ARMENIA, Joshua *et al.* The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. **Nature genetics**, v. 50, n. 5, p. 645-651, 2018.

ARORA, Kaveri; BARBIERI, Christopher E. Molecular subtypes of prostate cancer. **Current Oncology Reports**, v. 20, n. 8, p. 1-9, 2018

ASHOUR, Nadia *et al.* Epigenetic regulation of *gfi1* in endocrine-related cancers: A role regulating tumor growth. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 13, p. 4687, 2020

AUGELLO, Michael A.; HICKEY, Theresa E.; KNUDSEN, Karen E. FOXA1: master of steroid receptor function in cancer. **The EMBO journal**, v. 30, n. 19, p. 3885-3894, 2011.

BANCHEREAU, Jacques et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.

BANIAK, Nicholas et al. Clinicopathological and molecular characteristics of prostate cancer diagnosed in young men aged up to 45 years. **Histopathology**, v. 78, n. 6, p. 857-870, 2021.

BARBIERI, Christopher E. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. **Nature genetics**, v. 44, n. 6, p. 685-689, 2012.

BARTEK, Jiri; LUKAS, Jiri. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer cell**, v. 3, n. 5, p. 421-429, 2003.

BERGMANN, Stephan; PANDOLFI, Pier Paolo. Giving blood: a new role for CD40 in tumorigenesis. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 11, p. 2409-2412, 2006.

BERNARDO, Gina M.; KERI, Ruth A. FOXA1: a transcription factor with parallel functions in development and cancer. **Bioscience reports**, v. 32, n. 2, p. 113-130, 2012.

BIXLER, Sandra L.; GOFF, Arthur J. The role of cytokines and chemokines in filovirus infection. **Viruses**, v. 7, n. 10, p. 5489-5507, 2015.

BOLTON, Kelly L. *et al.* Cancer therapy shapes the fitness landscape of clonal hemtopoiesis. **Nature genetics**, v. 52, n. 11, p. 1219-1226, 2020.

BLAZEK, Dalibor *et al.* The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. **Genes & development**, v. 25, n. 20, p. 2158-2172, 2011.

BRANDÃO, Andreia *et al.* The CHEK2 variant C. 349A> G is associated with prostate cancer risk and carriers share a common ancestor. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3254, 2020.

BRATT, Ola *et al.* Prostate cancer diagnosed after prostate-specific antigen testing of men without clinical signs of the disease: a population-based study from the National Prostate Cancer Register of Sweden. **Scandinavian journal of urology and nephrology**, v. 44, n. 6, p. 384-390, 2010.

BROWN, Julia A. *et al.* Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 3, p. 1257-1266, 2003.

BRUNO, Tiziana *et al.* Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint. **Cancer cell**, v. 10, n. 6, p. 473-486, 2006.

BOYLE, Julie L. *et al.* Pathogenic germline DNA repair gene and HOXB13 mutations in men with metastatic prostate cancer. **JCO Precision Oncology**, v. 4, p. 139-151, 2020.

BOWLER, Timothy Geoffrey et al. Exome sequencing of familial MDS reveals novel mutations and high rates of false positive mutations in MLL3 due to pseudogene effects. **Blood**, v. 124, n. 21, p. 4591, 2014.

BUTTE, Manish J. *et al.* Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. **Immunity**, v. 27, n. 1, p. 111-122, 2007.

CARNEY, James P. *et al.* The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 477-486, 1998.

CARSON, Christian T. *et al.* The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. **The EMBO journal**, v. 22, n. 24, p. 6610-6620, 2003.

CARTER, Paul *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 10, p. 4285-4289, 1992.

CASTRO, Elena *et al.* Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 14, p. 1748, 2013.

CATALONA, William J. *et al.* Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. **New England journal of medicine**, v. 324, n. 17, p. 1156-1161, 1991.

CECCHINATO, Valentina *et al.* Chemokine interaction with synergy-inducing molecules: fine tuning modulation of cell trafficking. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, n. 6, p. 851-855, 2016.

CHALMERS, Zachary R. *et al.* Early-onset metastatic and clinically advanced prostate cancer is a distinct clinical and molecular entity characterized by increased TMPRSS2-ERG fusions. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 24, n. 2, p. 558-566, 2021.

CHANG, Antao *et al.* Recruitment of KMT2C/MLL3 to DNA damage sites mediates DNA damage responses and regulates PARP inhibitor sensitivity in cancer. **Cancer research**, v. 81, n. 12, p. 3358-3373, 2021.

CHEN, Juhua *et al.* Metastatic properties of prostate cancer cells are controlled by VEGF. **Cell communication & adhesion**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2004.

CHEN, Xiao-Hui *et al.* TGF- β and EGF induced HLA-I downregulation is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells. **Molecular immunology**, v. 65, n. 1, p. 34-42, 2015.

CHEN, Chong *et al.* MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. **Cancer cell**, v. 25, n. 5, p. 652-665, 2014.

CHEN, Xiaoqing *et al.* Association between histone lysine methyltransferase KMT2C mutation and clinicopathological factors in breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 116, p. 108997, 2019.

CHO, Soo-Jeong *et al.* KMT2C Mutations in Diffuse-Type Gastric Adenocarcinoma Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition. **Clinical Cancer Research**, v. 24, n. 24, p. 6556-6569, 2018.

CHUNG, Mun Su *et al.* Pathological characteristics of prostate cancer in men aged < 50 years treated with radical prostatectomy: a multi-centre study in Korea. **Journal of Korean medical science**, v. 34, n. 10, 2019.

CHULPANOVA, Daria S. *et al.* Molecular aspects and future perspectives of cytokine-based anti-cancer immunotherapy. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 402, 2020.

CONTI, David V. *et al.* Trans-ancestry genome-wide association meta-analysis of prostate cancer identifies new susceptibility loci and informs genetic risk prediction. **Nature genetics**, v. 53, n. 1, p. 65-75, 2021.

CHOYKE, Peter L.; LOEB, Stacy. Active surveillance of prostate cancer. **Oncology (Williston Park, NY)**, v. 31, n. 1, p. 67, 2017.

CULIG, Zoran. Response to Androgens and Androgen Receptor Antagonists in the Presence of Cytokines in Prostate Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 12, p. 2944, 2021.

CZYGIER, Małgorzata *et al.* Plasma granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and activity of enzymes in granulocytes of breast cancer patients. **Przegląd Lekarski**, v. 63, n. 8, p. 654-657, 2006.

DAS, Sanjay *et al.* Bringing prostate cancer germline genetics into clinical practice. **The Journal of urology**, v. 202, n. 2, p. 223-230, 2019.

DING, Yuanchun *et al.* Gene expression differences in prostate cancers between young and old men. **PLoS genetics**, v. 12, n. 12, p. e1006477, 2016.

DOAN, David K. *et al.* Germline genetics of prostate cancer: prevalence of risk variants and clinical implications for disease management. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2154, 2021.

DOMINGUEZ-VALENTIN, Mev *et al.* Frequent mismatch-repair defects link prostate cancer to Lynch syndrome. **BMC urology**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2016.

DONEHOWER, Lawrence A. *et al.* Integrated analysis of TP53 gene and pathway alterations in the cancer genome atlas. **Cell reports**, v. 28, n. 5, p. 1370-1384. e5, 2019.

DRANOFF, Glenn *et al.* Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 8, p. 3539-3543, 1993.

DRANOFF, Glenn. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 1, p. 11-22, 2004.

DUFAIT, Inès *et al.* Ex vivo generation of myeloid-derived suppressor cells that model the tumor immunosuppressive environment in colorectal cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 14, p. 12369, 2015.

DUPONT, William D. *et al.* Prostate cancer risk variants of the HOXB genetic locus. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.

EDWARDS, Stephen M. *et al.* Prostate cancer in BRCA2 germline mutation carriers is associated with poorer prognosis. **British journal of cancer**, v. 103, n. 6, p. 918-924, 2010.

EELES, Rosalind A. *et al.* Multiple newly identified loci associated with prostate cancer susceptibility. **Nature genetics**, v. 40, n. 3, p. 316-321, 2008.

EISENBARTH, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 2, p. 89-103, 2019

ELGUETA, Raul *et al.* Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. **Immunological reviews**, v. 229, n. 1, p. 152-172, 2009.

ELLIS, Matthew J. *et al.* Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 353-360, 2012.

EMERSON, Laurel; MORALES, Alvaro. Intralesional recombinant α -interferon for localized prostate cancer: a pilot study with follow-up of > 10 years. **BJU international**, v. 104, n. 8, p. 1068-1070, 2009.

ENGELAND, Kurt. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 114-132, 2018.

EPSTEIN, Jonathan I. *et al.* The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. **The American journal of surgical pathology**, v. 40, n. 2, p. 244-252, 2016.

ERLANDSSON, Ann *et al.* M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. **The Prostate**, v. 79, n. 4, p. 363-369, 2019.

EWING, Charles M. *et al.* Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 2, p. 141-149, 2012.

GAO, Nan *et al.* The role of hepatocyte nuclear factor-3 α (Forkhead Box A1) and androgen receptor in transcriptional regulation of prostatic genes. **Molecular endocrinology**, v. 17, n. 8, p. 1484-1507, 2003.

GE, Yuqiu *et al.* Rare variants in BRCA2 and CHEK2 are associated with the risk of urinary tract cancers. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2016.

GENG, Chuandong *et al.* Prostate cancer-associated mutations in speckle-type POZ protein (SPOP) regulate steroid receptor coactivator 3 protein turnover. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 17, p. 6997-7002, 2013.

GIELCHINSKY, Ilan *et al.* Prostate cancer in 432 men aged < 50 years in the prostate-specific antigen era: a new outlook. **BJU international**, v. 122, p. 35-41, 2018.

GILLESSEN, Silke *et al.* CD1d-restricted T cells regulate dendritic cell function and antitumor immunity in a granulocyte–macrophage colony-stimulating factor-dependent fashion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 15, p. 8874-8879, 2003.

GUI, Yaoting *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling genes in transitional cell carcinoma of the bladder. **Nature genetics**, v. 43, n. 9, p. 875-878, 2011.

GRIFFITH, Jason W.; SOKOL, Caroline L.; LUSTER, Andrew D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 659-702, 2014.

HAFERLACH, T. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 28, n. 2, p. 241-247, 2014.

HAFFNER, Michael C. *et al.* Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 18, n. 2, p. 79-92, 2021.

HANSEN, Torben Frostrup *et al.* Correlation between natural killer cell activity and treatment effect in patients with disseminated cancer. **Translational oncology**, v. 12, n. 7, p. 968-972, 2019.

HE, Qin *et al.* The contrasting roles of inflammasomes in cancer. **American journal of cancer research**, v. 8, n. 4, p. 566, 2018.

HOWLADER, N. N. A. M. *et al.* SEER cancer statistics review, 1975–2016. **National Cancer Institute**, v. 1, 2019.

HROUDA, David; NICOL, David; GARDINER, Robert. The role of angiogenesis in prostate development and the pathogenesis of prostate cancer. **Urological research**, v. 30, n. 6, p. 347-355, 2003.

HONG, Wei *et al.* Clonal hematopoiesis mutations in lung cancer patients are associated with lung cancer risk factors. **Cancer research**, v. 82, n. 2, p. 199, 2022.

HUANG, Jianping *et al.* Elevated serum soluble CD40 ligand in cancer patients may play an immunosuppressive role. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 120, n. 15, p. 3030-3038, 2012.

HUANG, Tzu-Hao *et al.* Prostate cancer in young adults—Seventeen-year clinical experience of a single center. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 80, n. 1, p. 39-43, 2017

HUBEN, Robert *et al.* Carcinoma of prostate in men less than fifty years old Data from American College of Surgeons' national survey. **Urology**, v. 20, n. 6, p. 585-588, 1982.

HUSSEIN,FORD, David J.; DINGWALL, Andrew K. The cancer COMPASS: navigating the functions of MLL complexes in cancer. **Cancer genetics**, v. 208, n. 5, p. 178-191, 2015.

JACKSON, Michael W. *et al.* A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. **Cancer research**, v. 62, n. 3, p. 854-859, 2002.

JAISWAL, Siddhartha; EBERT, Benjamin L. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science*, v. 366, n. 6465, 2019. PMID 31672865.

JINUSHI, Masahisa *et al.* MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro-and antiinflammatory activities of GM-CSF. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 7, p. 1902-1913, 2007.

JOHNS, L. E.; HOULSTON, R. S. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. **BJU international**, v. 91, n. 9, p. 789-794, 2003.

JORGOVANOVIC, Dragica *et al.* Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review. **Biomarker Research**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2020.

JUAN, H. C. *et al.* Cdk12 is essential for embryonic development and the maintenance of genomic stability. **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 6, p. 1038-1048, 2016.

JOHNSON, Douglas E.; LANIERI JR, John P.; AYALA, Alberto G. Prostatic adenocarcinoma occurring in men under 50 years of age. **Journal of surgical oncology**, v. 4, n. 3, p. 207-216, 1972.

KANDOTH, Cyriac *et al.* Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. **Nature**, v. 502, n. 7471, p. 333-339, 2013.

KANTO, Satoru *et al.* Clinical features of prostate cancer patients younger than 50 years: report of seven cases. **International journal of urology**, v. 9, n. 2, p. 91-94, 2002.

KIM, Y.-S. *et al.* Genome-wide association study of recurrent endometriosis related with ovarian cancer. **Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology**, v. 46, n. 4, p. 553-559, 2019.

KINNEAR, Ned J. *et al.* Prostate cancer in men aged less than 50 years at diagnosis. **World Journal of Urology**, v. 34, n. 11, p. 1533-1539, 2016.

KUDITHIPUDI, Srikanth; JELTSCH, Albert. Role of somatic cancer mutations in human protein lysine methyltransferases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1846, n. 2, p. 366-379, 2014.

KLOTZ, Laurence *et al.* Long-term follow-up of a large active surveillance cohort of patients with prostate cancer. **J Clin oncol**, v. 33, n. 3, p. 272-277, 2015.

KODAK, James A. *et al.* Activation of innate immunity by prostate specific antigen (PSA). **The Prostate**, v. 66, n. 15, p. 1592-1599, 2006

KOTE-JARAI, Z. *et al.* Prevalence of theHOXB13 G84E germline mutation in British men and correlation with prostate cancer risk, tumour characteristics and clinical outcomes. **Annals of oncology**, v. 26, n. 4, p. 756-761, 2015.

LAI, John *et al.* PSA/KLK3 ARE1 promoter polymorphism alters androgen receptor binding and is associated with prostate cancer susceptibility. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 5, p. 1032-1039, 2007.

LANGE, Ethan M. *et al.* Genome-wide scan for prostate cancer susceptibility genes using families from the University of Michigan prostate cancer genetics project finds evidence for linkage on chromosome 17 near BRCA1. **The Prostate**, v. 57, n. 4, p. 326-334, 2003.

LANGE, Ethan M. *et al.* Assessing the cumulative contribution of new and established common genetic risk factors to early-onset prostate cancer. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 25, n. 5, p. 766-772, 2016.

LAVERY, William J. *et al.* KMT2C/D COMPASS complex-associated diseases [KCDCOM-ADs]: an emerging class of congenital regulopathies. **Clinical epigenetics**, v. 12, n. 1, p. 1-20, 2020.

LAWRENCE, Mitchell G.; LAI, John; CLEMENTS, Judith A. Kallikreins on steroids: structure, function, and hormonal regulation of prostate-specific antigen and the extended kallikrein locus. **Endocrine reviews**, v. 31, n. 4, p. 407-446, 2010.

LEBER, Mathias Felix; EFFERTH, Thomas. Molecular principles of cancer invasion and metastasis. **International journal of oncology**, v. 34, n. 4, p. 881-895, 2009.

LEE, Kevin MC; ACHUTHAN, Adrian A.; HAMILTON, John A. GM-CSF: a promising target in inflammation and autoimmunity. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 9, p. 225, 2020.

LEE, Yu-Ru; CHEN, Ming; PANDOLFI, Pier Paolo. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 19, n. 9, p. 547-562, 2018.

LI, Yan *et al.* Downregulation of RBMS3 is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer research**, v. 71, n. 19, p. 6106-6115, 2011.

LI, Heng. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. **arXiv preprint arXiv:1303.3997**, 2013.

LI, Jun *et al.* Targeted massively parallel sequencing of a panel of putative breast cancer susceptibility genes in a large cohort of multiple-case breast and ovarian cancer families. **Journal of medical genetics**, v. 53, n. 1, p. 34-42, 2016

LI, Huifeng *et al.* Association of gene polymorphisms of klk3 and prostate cancer: A meta-analysis. **Adv. Clin. Exp. Med**, v. 29, p. 1001-1009, 2020.

LI, Kai *et al.* Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. **Cancer cell international**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

- LI, Yun-Fei *et al.* Low dose of interferon- α improves the clinical outcomes of docetaxel in patients with castration-resistant prostate cancer: A pilot study. **Oncology letters**, v. 7, n. 1, p. 125-130, 2014.
- LIAN, Jianpo *et al.* Histone methyltransferase KMT2C plays an oncogenic role in prostate cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, p. 1-14, 2022.
- LIU, Xinhua *et al.* KMT2C is a potential biomarker of prognosis and chemotherapy sensitivity in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 189, n. 2, p. 347-361, 2021.
- LIMBERGER, Tanja *et al.* KMT2C methyltransferase domain regulated INK4A expression suppresses prostate cancer metastasis. **Molecular cancer**, v. 21, n. 1, p. 1-19, 2022.
- LIN, Daniel W.; PORTER, Michael; MONTGOMERY, Bruce. Treatment and survival outcomes in young men diagnosed with prostate cancer: A population-based cohort study. **Cancer**, v. 115, n. 13, p. 2863-2871, 2009.
- LIPKIN, Steven M. *et al.* MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. **Nature genetics**, v. 24, n. 1, p. 27-35, 2000.
- LUKENS, John R. *et al.* Inflammasome-derived IL-1 β regulates the production of GM-CSF by CD4⁺ T cells and $\gamma\delta$ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 7, p. 3107-3115, 2012.
- MACH, Nicolas *et al.* Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. **Cancer research**, v. 60, n. 12, p. 3239-3246, 2000.
- MAIMELA, Nomathamsanqa Resegofetse; LIU, Shasha; ZHANG, Yi. Fates of CD8⁺ T cells in tumor microenvironment. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 17, p. 1-13, 2019.
- MAO, Chenyu; DING, Yongfeng; XU, Nong. A Double-Edged Sword Role of Cytokines in Prostate Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.
- MAOLAKE, Aerken *et al.* Tumor necrosis factor- α induces prostate cancer cell migration in lymphatic metastasis through CCR 7 upregulation. **Cancer science**, v. 109, n. 5, p. 1524-1531, 2018.
- MARTIN, Sean T. *et al.* Increased prevalence of the BRCA2 polymorphic stop codon K3326X among individuals with familial pancreatic cancer. **Oncogene**, v. 24, n. 22, p. 3652-3656, 2005.
- MCKENNA, Aaron *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. **Genome research**, v. 20, n. 9, p. 1297-1303, 2010.
- MELTER, Michael *et al.* Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 96, n. 12, p. 3801-3808, 2000

- MICHALAKI, V. *et al.* Serum levels of IL-6 and TNF- α correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. **British journal of cancer**, v. 90, n. 12, p. 2312-2316, 2004.
- MILLER, Kurt *et al.* The phase 3 COU-AA-302 study of Abiraterone acetate plus prednisone in men with chemotherapy-naive metastatic castration-resistant prostate Cancer: stratified analysis based on pain, prostate-specific antigen, and Gleason score. **European urology**, v. 74, n. 1, p. 17-23, 2018.
- MITRA, A. *et al.* Prostate cancer in male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers has a more aggressive phenotype. **British journal of cancer**, v. 98, n. 2, p. 502-507, 2008.
- MOJIC, Marija; TAKEDA, Kazuyoshi; HAYAKAWA, Yoshihiro. The dark side of IFN- γ : its role in promoting cancer immunoevasion. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 89, 2017.
- MOTTET, Nicolas *et al.* EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent. **European urology**, v. 71, n. 4, p. 618-629, 2017.
- MROCZKO, B. *et al.* Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor in patients with colorectal cancer. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 39, p. 110-111, 2001.
- MS / INCA / Coordenação de Prevenção e Vigilância / Divisão de Vigilância e Análise de Situação, 2022. www.inca.gov.br/numeros-de-cancer
- MUGHEES, Mohd *et al.* Mechanism of tumour microenvironment in the progression and development of oral cancer. **Molecular biology reports**, v. 48, n. 2, p. 1773-1786, 2021.
- MUGHEES, Mohd *et al.* Chemokines and Cytokines: Axis and Allies in Prostate Cancer Pathogenesis. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2022.
- MULTHOFF, Gabriele; MOLLS, Michael; RADONS, Jürgen. Chronic inflammation in cancer development. **Frontiers in immunology**, v. 2, p. 98, 2012.
- MURUGAIYAN, Gopal; MARTIN, Sunil; SAHA, Bhaskar. CD40-induced countercurrent conduits for tumor escape or elimination?. **Trends in immunology**, v. 28, n. 11, p. 467-473, 2007.
- MVALASTYAN, Scott; WEINBERG, Robert A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-292, 2011.
- NAROD, S. A. *et al.* Rapid progression of prostate cancer in men with a BRCA2 mutation. **British journal of cancer**, v. 99, n. 2, p. 371-374, 2008.
- NICOLOSI, Piper *et al.* Prevalence of germline variants in prostate cancer and implications for current genetic testing guidelines. **JAMA oncology**, v. 5, n. 4, p. 523-528, 2019.

NIENTIEDT, Cathleen *et al.* Mutations in TP53 or DNA damage repair genes define poor prognostic subgroups in primary prostate cancer. In: **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**. Elsevier, 2022. p. 8. e11-8. e18

NIU, Yuanjie *et al.* Tissue prostate-specific antigen facilitates refractory prostate tumor progression via enhancing ARA70-regulated androgen receptor transactivation. **Cancer research**, v. 68, n. 17, p. 7110-7119, 2008.

NGUYEN, Luan *et al.* Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2020.

NYBERG, Tommy *et al.* Prostate cancer risks for male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a prospective cohort study. **European urology**, v. 77, n. 1, p. 24-35, 2020.

OBAZEE, Ofure *et al.* Germline BRCA2 K3326X and CHEK2 I157T mutations increase risk for sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma. **International journal of cancer**, v. 145, n. 3, p. 686-693, 2019.

OTTO, Helge *et al.* In silico characterization of the family of PARP-like poly (ADP-ribosyl) transferases (pARTs). **BMC genomics**, v. 6, n. 1, p. 1-23, 2005.

OUHTIT, Allal *et al.* Hoxb13, a potential prognostic biomarker for prostate cancer. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 8, p. 40-45, 2016.

PALMBOS, Phillip L.; HUSSAIN, Maha. Non-castrate metastatic prostate cancer: have the treatment options changed?. In: **Seminars in oncology**. WB Saunders, 2013. p. 337-346.

PATENTE, Thiago A. *et al.* Human dendritic cells: their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. **Frontiers in immunology**, p. 3176, 2019.

PEIFER, Mark. Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. **Science**, v. 262, n. 5140, p. 1667-1668, 1993.

PISEDDU, Ignazio *et al.* Constitutive Expression of CCL22 Is Mediated by T Cell-Derived GM-CSF. **The Journal of Immunology**, v. 205, n. 8, p. 2056-2065, 2020

PARKER, Patrick M. *et al.* Prostate cancer in men less than the age of 50: a comparison of race and outcomes. **Urology**, v. 78, n. 1, p. 110-115, 2011.

PICH, Oriol *et al.* Discovering the drivers of clonal hematopoiesis. **bioRxiv**, 2020.

PRITCHARD, Colin C. *et al.* Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. **N Engl J Med**, v. 375, p. 443-453, 2016.

PESTKA, Sidney; KRAUSE, Christopher D.; WALTER, Mark R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological reviews**, v. 202, n. 1, p. 8-32, 2004.

POWELL, Isaac J. *et al.* Reducing prostate cancer racial disparity: evidence for aggressive early prostate cancer PSA testing of African American men. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 8, p. 1505-1511, 2014.

QU, H. U. *et al.* IL-7/IL-7 receptor axis stimulates prostate cancer cell invasion and migration via AKT/NF- κ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 40, p. 203-210, 2016.

RAFIEI, Shahrzad *et al.* ATM loss confers greater sensitivity to ATR inhibition than PARP inhibition in prostate cancer. **Cancer research**, v. 80, n. 11, p. 2094-2100, 2020.

RAMPIAS, Theodoros *et al.* The lysine-specific methyltransferase KMT 2C/MLL 3 regulates DNA repair components in cancer. **EMBO reports**, v. 20, n. 3, p. e46821, 2019.

RANI, Aradhana; DASGUPTA, Prokar; MURPHY, John J. Prostate cancer: the role of inflammation and chemokines. **The American journal of pathology**, v. 189, n. 11, p. 2119-2137, 2019.

RAO, Rajesh C.; DOU, Yali. Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 6, p. 334-346, 2015.

RANI, Aradhana; DASGUPTA, Prokar; MURPHY, John J. Prostate cancer: the role of inflammation and chemokines. **The American journal of pathology**, v. 189, n. 11, p. 2119-2137, 2019.

REBELLO, Richard J. *et al.* Prostate cancer (Primer). **Nature Reviews: Disease Primers**, v. 7, n. 1, 2021.

RITTMASER, Roger S. 5 α -reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer risk reduction. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 389-402, 2008.

ROY, Rohini; CHUN, Jarin; POWELL, Simon N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68-78, 2012.

RUARK, Elise *et al.* Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 406-410, 2013.

RUSSO, Joshua W.; BALK, Steven P. Initiation and evolution of early onset prostate cancer. **Cancer Cell**, v. 34, n. 6, p. 874-876, 2018.

SAFRAN, Marilyn *et al.* The GeneCards Suite. In: **Practical Guide to Life Science Databases**. Springer, Singapore, 2021. p. 27-56.

SALMENA, Leonardo; CARRACEDO, Arkaitz; PANDOLFI, Pier Paolo. Tenets of PTEN tumor suppression. **Cell**, v. 133, n. 3, p. 403-414, 2008.

SCHROTEN, Caroline *et al.* The additional value of TGF β 1 and IL-7 to predict the course of prostate cancer progression. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 61, n. 6, p. 905-910, 2012.

SEER, Cancer Stat Fact. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>

SEOL, Min A. *et al.* Interleukin-7 contributes to the invasiveness of prostate cancer cells by promoting epithelial–mesenchymal transition. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

SHAH, Neel; BROWN, Myles. The Sly Oncogene: FOXA1 mutations in prostate cancer. **Cancer cell**, v. 36, n. 2, p. 119-121, 2019.

SHARMA, Meenal; YANG, Zhiming; MIYAMOTO, Hiroshi. Loss of DNA mismatch repair proteins in prostate cancer. **Medicine**, v. 99, n. 19, 2020.

SHAW, Julie LV; DIAMANDIS, Eleftherios P. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. **Clinical chemistry**, v. 53, n. 8, p. 1423-1432, 2007.

SHEN, Tao *et al.* MAPK4 promotes prostate cancer by concerted activation of androgen receptor and AKT. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 4, 2021.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2018. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2021. **CA: a cancer journal for clinicians**, 2021.

SHAH, Neel; BROWN, Myles. The Sly Oncogene: FOXA1 mutations in prostate cancer. **Cancer cell**, v. 36, n. 2, p. 119-121, 2019.

SMITH, CAROLYN V. *et al.* Prostate cancer in men age 50 years or younger:: a review of the department of defense center for prostate disease research multicenter prostate cancer database. **The Journal of urology**, v. 164, n. 6, p. 1964-1967, 2000.

SONNENBLICK, Amir *et al.* An update on PARP inhibitors—moving to the adjuvant setting. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 12, n. 1, p. 27-41, 2015.

STEINMAN, Ralph M.; BANCHEREAU, Jacques. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449, n. 7161, p. 419-426, 2007.

STEFANSKI, Casey D.; PROSPERI, Jenifer R. Wnt-independent and Wnt-dependent effects of APC loss on the chemotherapeutic response. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 21, p. 7844, 2020.

SUN, Xiao-Ya; DONALD, Steven P.; PHANG, James M. Testosterone and prostate specific antigen stimulate generation of reactive oxygen species in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 11, p. 1775-1780, 2001.

TAN, M. H. *et al.* Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 36, n. 1, p. 3-23, 2015.

TANG, Tang *et al.* Germline Mutations in Patients With Early-Onset Prostate Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 12, 2022.

TAUBE, Janis M. *et al.* Differential expression of immune-regulatory genes associated with PD-L1 display in melanoma: implications for PD-1 pathway blockade. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 17, p. 3969-3976, 2015.

TAYLOR, Renea A. *et al.* Germline BRCA2 mutations drive prostate cancers with distinct evolutionary trajectories. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2017.

TEYSSONNEAU, Diego *et al.* Prostate cancer and PARP inhibitors: Progress and challenges. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 1-19, 2021.

TIMOFTE, Andrei Daniel *et al.* HOXB13 and TFF3 can contribute to the prognostic stratification of prostate adenocarcinoma. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 62, n. 1, p. 41, 2021.

TISONCIK, Jennifer R. *et al.* Into the eye of the cytokine storm. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 16-32, 2012.

TOIVANEN, Roxanne; SHEN, Michael M. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. **Development**, v. 144, n. 8, p. 1382-1398, 2017.

THOMPSON, Ella R. *et al.* Reevaluation of the BRCA2 truncating allele c. 9976A> T (p. Lys3326Ter) in a familial breast cancer context. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2015.

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

UGGE, Henrik *et al.* Circulating inflammation markers and prostate cancer. **The Prostate**, v. 79, n. 11, p. 1338-1346, 2019.

VARON, Raymonda *et al.* Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 467-476, 1998.

VEVERIS-LOWE, T. L. *et al.* Kallikrein 4 (hK4) and prostate-specific antigen (PSA) are associated with the loss of E-cadherin and an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like effect in prostate cancer cells. **Endocrine-related cancer**, v. 12, n. 3, p. 631-643, 2005.

VERZE, Paolo; CAI, Tommaso; LORENZETTI, Stefano. The role of the prostate in male fertility, health and disease. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 7, p. 379-386, 2016.
KASTENHUBER, Edward R.; LOWE, Scott W. Putting p53 in context. **Cell**, v. 170, n. 6, p. 1062-1078, 2017.

VIETRI, Maria Teresa *et al.* Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3753, 2021.

WACHSMANNOVA, L. *et al.* Novel strategies for comprehensive mutation screening of the APC gene. **Neoplasma**, v. 64, n. 3, p. 338-343, 2017.

WANG, Yue; DAI, Bo; YE, Dingwei. CHEK2 mutation and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 9, p. 15708, 2015.

WANG, Guocan *et al.* Genetics and biology of prostate cancer. **Genes & development**, v. 32, n. 17-18, p. 1105-1140, 2018.

WEI, Jun *et al.* Germline HOXB13 G84E mutation carriers and risk to twenty common types of cancer: Results from the UK Biobank. **British journal of cancer**, v. 123, n. 9, p. 1356-1359, 2020.

WERTHMAN, Philip *et al.* Carcinoma of prostate in men aged fifty and under: therapeutic options. **Urology**, v. 39, n. 1, p. 48-51, 1992.

WILCZAK, Waldemar *et al.* Up-regulation of mismatch repair genes MSH6, PMS2 and MLH1 parallels development of genetic instability and is linked to tumor aggressiveness and early PSA recurrence in prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 1, p. 19-27, 2017.

WILSON, J. M. G.; KEMP, I. W.; STEIN, G. J. Cancer of the prostate. Do younger men have a poorer survival rate?. **British journal of urology**, v. 56, n. 4, p. 391-396, 1984.

WISE, Gilbert J. *et al.* Cytokine variations in patients with hormone treated prostate cancer. **The Journal of urology**, v. 164, n. 3 Part 1, p. 722-725, 2000.

WOKOŁORCZYK, Dominika *et al.* Mutations in ATM, NBN and BRCA2 predispose to aggressive prostate cancer in Poland. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 10, p. 2793-2800, 2020.

WOKOŁORCZYK, Dominika *et al.* PALB2 mutations and prostate cancer risk and survival. **British Journal of Cancer**, v. 125, n. 4, p. 569-575, 2021.

WU, Xudong *et al.* Tumor suppressor ASXL1 is essential for the activation of INK4B expression in response to oncogene activity and anti-proliferative signals. **Cell research**, v. 25, n. 11, p. 1205-1218, 2015.

WU, Yi-Mi *et al.* Inactivation of CDK12 delineates a distinct immunogenic class of advanced prostate cancer. **Cell**, v. 173, n. 7, p. 1770-1782. e14, 2018.

YANG, Ke-Qin *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by inflammatory cytokines produce angiogenetic factors and promote prostate cancer growth. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2017.

YUE, Feng Yun *et al.* Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. **International journal of Cancer**, v. 71, n. 4, p. 630-637, 1997.

ZAFAR, Sadia *et al.* Intravenously usable fully serotype 3 oncolytic adenovirus coding for CD40L as an enabler of dendritic cell therapy. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 2, p. e1265717, 2017.

ZAFAR, Sadia *et al.* CD40L coding oncolytic adenovirus allows long-term survival of humanized mice receiving dendritic cell therapy. **Oncoimmunology**, v. 7, n. 10, p. e1490856, 2018.

ZAFAR, Sadia *et al.* Oncolytic adenovirus type 3 coding for CD40L facilitates dendritic cell therapy of prostate cancer in humanized mice and patient samples. **Human Gene Therapy**, v. 32, n. 3-4, p. 192-202, 2021.

ZANNINI, Laura; DELIA, Domenico; BUSCEMI, Giacomo. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. **Journal of molecular cell biology**, v. 6, n. 6, p. 442-457, 2014.

ZEHIR, Ahmet *et al.* Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. **Nature medicine**, v. 23, n. 6, p. 703-713, 2017.

ZHANG, Feng *et al.* PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. **Current Biology**, v. 19, n. 6, p. 524-529, 2009.

ZHU, Kuikui *et al.* Novel germline mutation in lung cancer pedigrees establishes BCAR1 as a human cancer susceptibility gene: a case report. **Annals of Translational Medicine**, v. 10, n. 4, 2022.

11. ANEXOS

ANEXO A - Classificação TNM para avaliação da extensão anatômica do tumor.
T: extensão do tumor primário, N: presença e/ou ausência e a extensão de metástase em linfonodos regionais e M: presença e/ou ausência de metástase à distância.

T - Tumor Primário	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou visível por meio de exame de imagem
T1a	Achado histológico incidental em 5% ou menos de tecido ressecado
T1b	Achado histológico incidental em mais de 5% de tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (p.ex., devido a PSA elevado)
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor que envolve uma metade de um dos lobos ou menos
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 que se estende através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (uni- ou bilateral)
T3b	Tumor que invade vesícula(s) seminal(ais)
T4	Tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes, que não as vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores do ânus, ou parede pélvica
N - Linfonodos Regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em linfonodo regional
M - Metástase à Distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
M1a	Linfonodo(s) não regional(ais)
M1b	Osso(s)
M1c	Outra(s) localização(ões)

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e esclarecido do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA MATERIAL BIOLÓGICO

Título do estudo: Hematopoese clonal em pacientes com tumores primários de próstata.

Nome do investigador principal: Prof. Dr. Rodolfo Borges dos Reis
Outros pesquisadores envolvidos: Dalila Luciola Zanette e Claudia Tarsila Gomes Soares.

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP – USP.

Introdução:

Este é um CONVITE de participação em pesquisa que tem por finalidade pesquisar mutações em alguns genes e sua possível relação com características do tumor e do paciente. Você pode recusá-la ou interrompê-la a qualquer momento, pois trata-se de um convite e a eventual recusa não afetará em nada a sua assistência. Leia este documento com o devido cuidado e atenção podendo fazer qualquer pergunta, a qualquer momento.

Natureza e objetivo do estudo:

A próstata é uma glândula cuja principal função é sintetizar e secretar um fluido que, junto à vesícula seminal, origina o sêmen. Participando deste estudo você contribuirá para o conhecimento de alterações genéticas no organismo masculino, conhecidas como mutações. Além disso, no futuro, essa pesquisa poderá ajudar os homens a diagnosticar precocemente o câncer de próstata. O sangue coletado será utilizado para análises genéticas por meio do isolamento e avaliação do DNA das células do sangue em laboratório de pesquisa. Os seus dados clínicos serão avaliados a partir do seu prontuário médico, de onde serão coletadas informações sobre seus exames laboratoriais e história clínica.

Duração do estudo:

A participação do Sr. _____ como doador de uma pequena quantidade de sangue – 4 mililitros, cerca de uma colher de chá em volume - para esta pesquisa, deve ser autorizada pelo participante de forma totalmente voluntária. Caso concorde em colaborar com este estudo, a sua participação se encerrará logo após o procedimento de coleta sanguínea, porém o senhor poderá ser chamado para fornecer informações adicionais, por ventura forem necessárias. Garantimos qualquer tipo de esclarecimentos antes e durante a pesquisa. Desta forma, o estudo poderá contribuir para o aprimoramento do tratamento do câncer de próstata.

Despesas:

A coleta de sangue acontecerá na data do seu retorno já agendado previamente pelo Hospital das Clínicas para consulta de rotina no ambulatório de Uro-Oncologia, desta forma, não haverá despesas extras ao senhor para que possa participar do estudo.

Riscos e benefícios:

Os riscos que o senhor corre ao participar deste estudo estão relacionados coleta de sangue da veia do seu braço. No momento da coleta do sangue, poderão aparecer manchas roxas e dor local ocasionadas pela agulha no momento da coleta do sangue.

Você não terá benefícios diretos com a sua participação nesse tipo de estudo, mas estará contribuindo para o conhecimento de novas variações genéticas associadas ao câncer de próstata e a identificação de fatores que ajudem a melhorar o diagnóstico prévio da doença.



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

Participação voluntária e Confidencialidade:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, o senhor não é obrigado a autorizar a extração de sangue em questão. Além disso, o senhor poderá interromper a sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo após a extração do sangue. A garantia de sigilo e privacidade das informações está absolutamente assegurada de acordo com as normas brasileiras. No entanto, existem riscos, mesmo que muito reduzidos, de quebra de privacidade e/ou confidencialidade.

O senhor é livre para se recusar a participar e pode retirar o seu consentimento, em qualquer fase de pesquisa, sem penalização alguma e sem qualquer tipo de prejuízo.

Outras garantias:

O senhor receberá uma via assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Além disso, o senhor tem direito a acesso aos resultados desta pesquisa assim que estiverem disponíveis.

O senhor ou a sua família tem direito a indenização conforme as leis brasileiras se, por algum motivo, uma eventual perda de sigilo ou confidencialidade venha a prejudicá-lo, ou à sua família.

O senhor receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas pelo senhor e pelo pesquisador.

O senhor e sua família também terão acesso aos resultados da pesquisa quando esta se encerrar.

Outras informações importantes:

O investigador principal deste estudo é o pesquisador Dr. Rodolfo Borges dos Reis (médico urologista), que pode ser encontrado no seguinte endereço: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo FMRP-USP, Departamento de Cirurgia e Anatomia, 2º andar, sala 18, Laboratório de biologia molecular em urologia, telefones (16) 3315-3298 ou (71)99117-6918.

Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que estão sendo feitas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto está localizado no Subsolo do Hospital e funciona das 8:00 às 17:00. O telefone de contato é o (16) 3602-2228.

Pesquisadores colaboradores:

Dra. Cláudia Tarcila Gomes Sares (Departamento de Cirurgia e Anatomia) (16) 3315-3298.

Dra. Dalila Luciola Zanette (Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz Bahia) 71 99117-6918

Nome do participante

Assinatura: _____ data: _____

Nome do pesquisador

Assinatura: _____ data: _____

ANEXO C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Hospital Erasto Gartner, Curitiba, Paraná.

Título do projeto:

“Marcadores genéticos germinativos e somáticos no câncer de próstata de início precoce e tardio”

Informações aos participantes

Você _____ está sendo convidado(a) para participar voluntariamente do estudo acima citado. Antes de concordar em participar, é importante que entenda os objetivos deste estudo, bem como das possibilidades de riscos e benefícios, e esclareça todas as suas dúvidas. Caso aceite participar deste estudo, será necessário que o(a) Sr(a), ou seu familiar, e o pesquisador, assinem duas vias deste documento. A decisão de fazer parte do estudo é **voluntária** e o(a) senhor(a), pode recusar ou retirar-se do estudo a qualquer momento sem nenhum tipo de consequência para o seu tratamento.

Quais os objetivos deste estudo?

A próstata é uma glândula que fica abaixo da bexiga e envolve a uretra, que pode apresentar alterações como o câncer. Ao participar desse trabalho você contribuirá para o avanço do conhecimento de alterações genéticas no organismo masculino, que podem levar ao câncer de próstata. Além disso, no futuro, essa pesquisa poderá ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer de próstata e auxiliar seus familiares homens com uma vigilância ativa, caso necessário. O sangue coletado será utilizado para análises genéticas através de ensaios em laboratórios.

Quem serão os participantes do estudo e qual é a duração de minha participação?

Serão convidados a participar deste estudo os pacientes com suspeita ou confirmação de câncer de próstata atendidos no Hospital Erasto Gaertner e no Hospital do Câncer Uopecan, **com idade menor ou igual a 55 anos** ou com idade igual/maior do que 60 anos.

Procedimentos realizados nesta pesquisa

O projeto usará sangue colhido do antebraço dos participantes para realizar procedimentos não-rotineiros, como análises em laboratório com o material genético derivado das células, para a verificação de diferenças genéticas entre os pacientes.

Riscos e inconveniências

A coleta de sangue será feita por equipe profissional, com o maior cuidado possível, mas algumas vezes pode causar desconforto e uma mancha roxa. Todos os procedimentos serão realizados por profissionais competentes e treinados, seguindo normas de biossegurança.

Garantia de confidencialidade

Este projeto foi avaliado e está sendo acompanhado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste hospital para garantir que os direitos e bem-estar sejam protegidos. As informações obtidas serão analisadas de forma sigilosa, nunca sendo divulgado o nome, ou qualquer informação de saúde de nenhum dos participantes. Somente a equipe da pesquisa terá acesso às informações. Portanto, todas as informações são confidenciais e usadas somente para a pesquisa. Tudo que for possível será feito para evitar a quebra de sigilo da identidade do

participante e confidencialidade dos seus dados, incluindo acesso a documentos do estudo somente a pessoas da equipe de pesquisa, armazenamento de documentos impressos em arquivo trancado em local com acesso restrito, e armazenamento de dados eletrônicos em uma base de dados com acesso seguro por meio de usuário e senha individuais somente para os pesquisadores e outros membros da equipe de pesquisa. Os resultados do estudo serão divulgados para fins acadêmicos e científicos, mas sem a identificação de nenhum dado que revele a identidade do participante. Esse estudo poderá ser interrompido, mediante autorização do CEP e/ou CONEP, ou quando for necessário, para manter a segurança do participante. Caso isso aconteça, você será informado e continuará sendo acompanhado e tratado pelo tempo que for necessário.

Benefício da sua participação no estudo

Não há benefício direto para o participante, mas no final do estudo pode-se obter a descrição de algumas características genéticas da doença.

Quais são minhas responsabilidades ou de meu familiar?

Como participante dessa pesquisa, você só terá que autorizar a coleta dos dados do seu prontuário e uma coleta de sangue da veia do seu antebraço.

Direitos do participante, Indenização e Ressarcimento

Como participante dessa pesquisa, você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. A qualquer momento você pode deixar de participar do estudo, sem nenhum problema na continuidade de seu tratamento na Instituição. Você não há despesas pessoais ou custo para participar do estudo, incluindo exames e consultas. Também não haverá pagamento pela sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Como possível compensação, o paciente poderá ter acesso a informações genéticas que podem auxiliar no tratamento. Você não precisará abrir mão a quaisquer de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento, incluindo o direito de pedir indenização por danos resultantes da participação no estudo. Você poderá ser ressarcido de despesas como transporte e alimentação no caso de visitas ao hospital, especificamente relacionadas ao projeto.

Garantia de esclarecimento

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisadora responsável é a Dra. Dalila Luciola Zanette, que pode ser encontrada no seguinte endereço: Instituto Carlos Chagas, Fiocruz Paraná. Rua Algacyr Munhoz Mader 3775, telefone (41) 3316-3230. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em

Pesquisa (CEP), no Hospital Erasto Gaertner– Rua Dr. Ovando do Amaral, 201. – Bairro Jardim das Américas – Fone: (41) 3361-5271.

Declaração de consentimento e assinatura

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Marcadores genéticos germinativos e somáticos no câncer de próstata de início precoce e tardio”**. Eu discuti com a equipe do estudo sobre a minha decisão em participar, ou meu familiar participar, dessa pesquisa. Ficaram claros quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação, ou a de meu familiar, é isenta de despesas e que tenho, ou meu familiar tem, garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar, ou do meu familiar participar, deste estudo e poderei, ou meu familiar poderá retirar o consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu ou meu familiar possa ter adquirido, ou no atendimento neste Serviço.

Nome completo do participante da pesquisa

_____ Data: __/__/__ Assinatura do
participante da pesquisa

Nome completo e legível do pesquisador responsável pela aplicação do TCLE

_____ Data: __/__/__ Assinatura do
pesquisador responsável pela aplicação do TCLE

Nome completo do representante legal ou da testemunha imparcial

(analfabetos ou portadores de deficiência auditiva, visual ou com incapacidade de consentir)

_____ Data: __/__/__ Assinatura do
representante legal ou da testemunha imparcial