

ANA SHEILA CYPRIANO PINTO

**IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES
DE REPARO DE DNA COMO POSSÍVEIS
MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE AO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO VISANDO À OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2012

ANA SHEILA CYPRIANO PINTO

IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES
DE REPARO DE DNA COMO POSSÍVEIS
MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE AO
CÂNCER DE PRÓSTATA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biofísica, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológica (Biofísica).

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudia de Alencar Santos Lage
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Gilda Alves Brown



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2012

Rio de Janeiro
2012

Ficha Catalográfica

Pinto, Ana Sheila Cypriano.

Identificação de polimorfismos em genes de reparo de DNA como possíveis marcadores de suscetibilidade ao câncer de próstata

Ana Sheila Cypriano Pinto- Orientadora: Claudia de Alencar Santos Lage
Rio de Janeiro: UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2012.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2012.

Referências bibliográficas: p. 97 – 107

1. Genes de Reparo 2. Câncer de Próstata 3. Polimorfismo

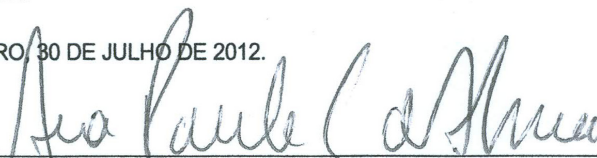
“IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE REPARO DE DNA COMO POSSÍVEIS MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE AO CÂNCER DE PRÓSTATA”

ANA SHEILA CYPRIANO PINTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

APROVADA POR:

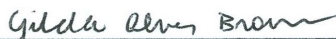
RIO DE JANEIRO, 30 DE JULHO DE 2012.



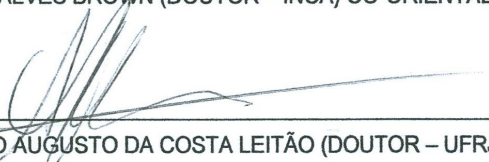
PROF^a. ANA PAULA CABRAL DE ARAUJO LIMA (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADORA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA))



PROF^a. CLAUDIA DE ALENCAR SANTOS LAGE (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADORA



PROF^a. GILDA ALVES BROWN (DOUTOR – INCA) CO-ORIENTADORA



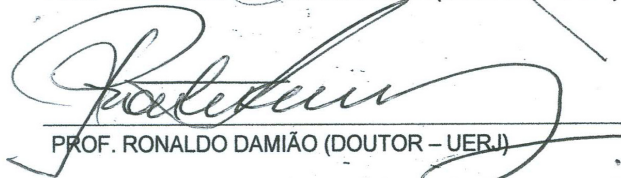
PROF. ALVARO AUGUSTO DA COSTA LEITÃO (DOUTOR – UFRJ) - REVISOR



PROF. EDSON RONDINELLI (DOUTOR – UFRJ)



PROF^a. DAYSE APARECIDA DA SILVA (DOUTOR – UERJ)



PROF. RONALDO DAMIÃO (DOUTOR – UERJ)

DEDICATÓRIA

**Dedico a Deus, por ser a fonte do saber e vida do meu ser.
E à minha família, pelo apoio incondicional.**

Não importa se o que fazemos é pouco ou pequeno; o que importa é que nossas palavras e ações carreguem a força dos nossos sentimentos, dos nossos sonhos, do nosso trabalho, do nosso amor e do nosso ideal de construir um mundo melhor.

(Autor desconhecido)

Agradecimentos

Aqui, tento expressar a imensa gratidão por tudo que realizei no período de construção desse trabalho. Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram na realização deste estudo e que me acompanharam durante o período em que estive cursando o mestrado.

A Deus, por ter me iluminado, me dado forças, saúde e determinação para alcançar mais este objetivo.

Aos pacientes, pela atenção, compreensão e disponibilidade em participar do trabalho de forma voluntária e extremamente contributiva. Eles foram os grandes motivadores dessa realização.

Aos funcionários, técnicos de enfermagem, enfermeiros e médicos do Hospital Universitário Antônio Pedro em Niterói e do Instituto Nacional do Câncer, por terem abraçado junto comigo a ideia do trabalho.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Claudia de Alencar Santos Lage pela orientação, sugestões, críticas e infinito apoio. Por nunca ter deixado de acreditar em mim.

A minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Gilda Alves Brown por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização deste trabalho.

Aos amigos do INCA: Dr.^a Denise, Eliane, Roberto, Vanessa, Vivian, Mariana, Rodrigo, Kethelin, Paulo, Lucas, Lívia, pelas horas de descontração, pelas palavras de apoio, pelos ensinamentos transmitidos, enfim, por esses dois anos de amizade e companheirismo tão importantes pra mim.

Aos amigos do Laboratório de Radiações em Biologia: Willian, Gabriel, Amanda, Lia, por todas as horas boas, todas as dicas, as conversar, enfim, o compartilhamento desses dois anos.

Ao Dr. Luciano que imensamente me ajudou com as análises estatísticas, pela presteza e dedicação.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biofísica, com quem aprendi muito nesses dois anos de realização do curso de mestrado.

Aos órgãos financiadores, CAPES, CNPq e FAPERJ, que possibilitaram a realização desse trabalho.

E com amor,

A minha mãe Solange, minha base forte, amiga, companheira, conselheira, até por telefone faz milagre! Atribuo todas as minhas conquistas ao que sempre depositou em mim. Com certeza é parte fundamental de cada vitória minha... Te amo muito mãe!

Ao meu pai Adalberto, pelo apoio, pelo incentivo, pelo subsídio, pela torcida. Sem palavras para expressar tudo o que já fez por mim. Meu herói de todas as horas, muito mais que um amigo.

A minha irmã Ana Raquel, minha lindinha, minha parceira, minha fonte de inspiração, por toda a ajuda e compreensão. Só de saber que você está aqui, meu dia já é diferente, sei que posso sempre contar com você. Te amo minha pequena!

A minha prima Iara (*in memoriam*) e toda a sua família, pelo acolhimento na hora que mais precisei. Obrigada por compartilharem comigo de mais esse sonho!

A toda minha família, e amigos, uns mais perto outros distantes, mas que mesmo de longe, sempre torcem e mandam energias positivas. Sem o apoio de vocês a vida não teria metade do brilho. Com vocês tudo é mais bonito e significativo. Vocês fazem parte da minha história... Muito obrigada!

Ana Sheila Cypriano Pinto. Identificação de polimorfismos em genes de reparo de DNA como possíveis marcadores de suscetibilidade ao câncer de próstata. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2012.

Resumo

O câncer é consequência de uma mudança funcional da célula, que culmina no descompasso do seu ciclo replicativo. O principal desafio clínico hoje para o câncer de próstata é representado pela incapacidade de se distinguir facilmente tumores agressivos dos tumores indolentes entre os pacientes que apresentam nódulos com baixo grau de Gleason. Genes que exibem polimorfismos genéticos e são responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas no reparo de DNA, são capazes de alterar, reduzir ou inibir as funções de proteínas específicas e assim modificar a suscetibilidade individual ao câncer. Esse trabalho procurou identificar possíveis marcadores genéticos de susceptibilidade ao câncer de próstata através da análise de polimorfismos em genes de reparo de DNA em 110 homens diagnosticados com câncer de próstata e em 200 não afetados pela doença, provenientes do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em um estudo caso-controle. Os polimorfismos tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) Lys751Gln do gene *XPB*, G135C do gene *RAD51* e Asp148Glu do gene *APE1* foram determinados no DNA extraído de leucócitos de sangue periférico, e identificados pela técnica de PCR-RFLP com eletroforese em gel de agarose. As frequências alélicas e genotípicas foram calculadas e submetidas ao teste χ^2 para verificar se estavam de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A associação entre os polimorfismos genéticos e os dados clínicos e epidemiológicos foi verificada através do teste *odds ratio* (OR), com Intervalo de Confiança (IC) de 95% e $p=0,05$ como o limite de significância. Foram calculados os parâmetros de testes diagnósticos com base nos genes individuais e suas combinações e, com base na frequência alélica e genotípica dos polimorfismos analisados, comparou-se a população de estudo com diferentes populações. Nossos resultados mostraram que quanto à exposição a fatores de risco, o principal agente de agressão foi a exposição a agrotóxicos. Sobre as características particulares e de hábitos de vida, nenhum item isolado foi capaz de contribuir para o aumento da suscetibilidade a doença. O gene *XPB* foi o único que sozinho mostrou-se estatisticamente significativo capaz na contribuição para o aumento da suscetibilidade à doença, apresentando um valor de $P<0,001$ (OR 2,36 (1,46 – 3,84)). Na combinação entre alelos polimórficos *XPB+RAD51* apresentou relação positiva com a presença da doença, com valor de $P<0,005$ (OR 3,40 (1,32 – 9,20)). Os demais polimorfismos estudados não apresentaram relação com a suscetibilidade ao câncer de próstata. Em suma, nosso estudo sugere que o polimorfismo no gene *XPB* pode ser um marcador em potencial para o risco de câncer de próstata. Contudo, o estudo deve ser expandido a fim de se compreender qual o melhor painel genético capaz de influenciar na chance da doença em presença de reduzida capacidade de reparo de DNA.

Palavras-chave: Câncer de próstata, *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), *XPB*, *APE1* e *RAD51*.

Ana Sheila Cypriano Pinto. Identification of polymorphisms in DNA repair genes as potential markers of susceptibility to prostate cancer. Dissertation (Master in Science) - Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, 2012.

Abstract

Cancer is the result of a functional change in the cell. It's culminates in the mismatch of their replicative cycle. The main clinical challenge today for prostate cancer is represented by an inability to distinguish aggressive from indolent tumors among patients with nodules with low Gleason score. Genes that exhibit genetic polymorphism and are responsible for encoding enzymes involved in DNA repair, are capable of changing, to reduce or inhibit the functions of specific proteins and thus modify the individual's susceptibility to cancer. This study tried to identify possible genetic markers of susceptibility to prostate cancer through the analysis of polymorphisms in DNA repair genes in 110 men diagnosed with prostate cancer and 200 unaffected by the disease, from the State of Rio de Janeiro, Brazil, on a case-control study. The polymorphisms *SNPs* (single nucleotide polymorphism) of *XPD* Lys751Gln gene, *RAD51* G135C gene and *APE1* Asp148Glu gene were determined in DNA extracted from peripheral blood leukocytes, and identified by PCR-RFLP with agarose gel electrophoresis. The allelic and genotypic frequencies were calculated and submitted to the χ^2 test to see if they agreed with the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). The association between genetic polymorphisms and clinical and epidemiological data was verified by testing odds ratio (OR) with confidence interval (CI) 95% $p = 0.05$ as the limit of significance. We calculated the parameters of diagnostics tests based on individual gens and combinations thereof, based on allele frequency and genotype of the polymorphisms analyzed compared the study population with different populations. Our results showed that the exposure to risk factors, it was found that the main agent of injury was exposure to pesticides. On the particular characteristics and habits of life, no single item was able to contribute to the increased susceptibility to disease. The *XPD* gene was the one who alone was statistically significant be able to contribute to increased susceptibility to disease, with a P value of <0.001 (OR 2.36 (1.46 to 3.84)). In the polymorphic alleles combination of *XPD* + *RAD51* showed a positive association with the presence of disease, with a value of $P < 0.005$ (OR 3.40 (1.32 to 9.20)). The other polymorphisms did not correlate with susceptibility to prostate cancer. In summary, our study suggests that the polymorphism in the *XPD* gene may be a potential marker for risk of prostate cancer. However, the study should be expanded in order to understand what the best genetic panel able to influence the chance of disease in the presence of reduced DNA repair capacity.

Keywords: Prostate cancer, *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), *XPD*, *APE1* and *RAD51*.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACS	Sociedade Americana do Câncer
APE1	APE nuclease (enzima multifuncional de reparo de DNA)
AR	Receptor de Andrógeno
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
BER	Reparo por excisão de bases
BRCA1	Gene Supressor tumoral relacionado ao câncer de mama
C	Citosina
CI	Índice de confiança
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSBs	Quebra de cadeia dupla
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ERG	Gene relacionado a família ETS
EST	Fator de transcrição da família E vinte e seis
EZH2	Gene acentuador
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Guanina
GG NER	Via NER no genoma global
Glu	Ácido Glutâmico
Gln	Glutamina
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
HMK	Hospital Mário Kröeff
HRR	Reparo por Recombinação Homóloga
HPB	Hiperplasia prostática benigna
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
Lys	Lisina

mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMR	Reparo de mau emparelhamento
μL	Microlitro
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
NKX3.1	Fator de transcrição NK3 do homeodomínio 1
NHEJ	Reparo por junção de fitas não homólogas
OR	Odds ratio
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Braço curto do cromossomo
pb	Pares de base
PCA3	Gene do câncer de próstata antígeno 3
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomolar
PSA	Antígeno Prostático Específico
PTEN	Gene da fosfatase e T tensina homóloga do cromossomo dez
q	Braço longo do cromossomo
RAD51	Gene de reparo de quebra dupla de DNA
RecA	Gene homólogo de RAD51 em bactérias
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SBU	Sociedade Brasileira de Urologia
SSB	Quebra de cadeia simples
SPSS	Pacote estatístico para Ciências Sociais
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCNER	Via NER acoplado a transcrição
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido
TFIIH	Fator de Transcrição II
TEMED	Tetrametiletilenodiamino
TMN	Padrão de Classificação tumoral

TMPRSS2	Gene da transmembrana protease serina 2
TRIS-HCl	Hidroximetil aminometano cristalizado
5'UTR	Região não-traduzida 5'
VNTR	Repetições <i>in tandem</i> de número variável
χ^2	Qui-quadrado
<i>XPB</i>	Gene do Xeroderma pigmentosum complementar do grupo D
<i>XRCC3</i>	<i>X-ray repair cross complementing 3</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização da glândula prostática no organismo humano. Fonte: ACS, 2012.....	21
Figura 2: Representação histológica dos graus de diferenciação das células tumorais prostáticas. Graus de Gleason. (retirado de http://www.stjohnprovidence.org/prostateimplant/Evaluation/).....	25
Figura 3: Níveis de invasão tumoral segundo a classificação TNM.....	26
Figura 4: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia da próstata). Fonte: INCA, 2011.....	28
Figura 5: As duas subvias de reparo por excisão de nucleotídeos em mamíferos.....	35
Figura 6: Vias reparo por excisão de base e reparo de quebra de fita simples em mamíferos.....	37
Figura 7 : Mecanismo de reparação de DSBs na molécula de DNA através de recombinação homóloga (A) e por junção de extremidades não homólogas (B) (Goode E. <i>et al</i> , 2002)	39
Figura 8: Representação esquemática da proteína <i>XPD</i> e pontos dos principais polimorfismos (Benhamou e Sarasin, 2002).....	42
Figura 9: Estrutura do gene <i>APE1</i> e localização do polimorfismo do éxon 5.....	43
Figura 10: Foto da eletroforese em gel de agarose 1% para verificação de integridade do DNA extraído.....	53
Figura 11: Foto da eletroforese em gel de agarose 2% para verificação do produto de PCR dos genes <i>RAD51</i> (1 e 2), <i>XPD</i> (3 e 4) e <i>APE1</i> (5 e 6), respectivamente. Marcador de peso molecular (M) de 50bp.....	56

Figura 12: Foto da eletroforese em gel de agarose 4% para verificação do polimorfismo de <i>APE1</i>	58
Figura 13: Foto da eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para verificação do polimorfismo de <i>RAD51</i>	59
Figura 14: Foto da eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para verificação do polimorfismo de <i>XPD</i>	60
Figura 15: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação à origem geográfica	67
Figura 16: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao nível de escolaridade	68
Figura 17: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação à etnia.....	68
Figura 18: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em ao histórico de câncer na família	69
Figura 19: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao consumo de drogas	70
Figura 20: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao consumo de tabaco.....	70
Figura 21: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao consumo de álcool.....	71
Figura 22: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao levantamento de exposição aos fatores de risco.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2012.....	28
Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a PCR-RFLP.....	54
Tabela 3: Condições necessárias para a amplificação dos genes.....	55
Tabela 4: Descrição das condições utilizadas para as digestões dos fragmentos amplificados	57
Tabela 5: Distribuição dos grupos em suas respectivas características.....	66
Tabela 6: Distribuição dos grupos nas sub-categorias de fatores de risco.....	72
Tabela 7: Distribuição genotípica e alélica de <i>XPB</i> , <i>RAD51</i> e <i>APE1</i> na população total analisada.....	74
Tabela 8: Distribuição genotípica e alélica de <i>XPB</i> , <i>RAD51</i> e <i>APE1</i> no grupo controle.....	74
Tabela 9: Distribuição genotípica e alélica de <i>XPB</i> , <i>RAD51</i> e <i>APE1</i> no grupo caso.....	75
Tabela 10: Frequência genotípica dos genes <i>XPB</i> , <i>RAD51</i> e <i>APE1</i> em 110 casos de câncer de próstata e 200 controles.....	77
Tabela 11: Dados de desempenho de teste diagnóstico com base em cada gene e suas combinações.....	79
Tabela 12: Valor de PSA de 79 dos 110 pacientes amostrados.....	80
Tabela 13: Relação do perfil histológico de Gleason por polimorfismo estudado.....	81
Tabela 14: Relação do polimorfismo em <i>XPB</i> com as variáveis de exposição a risco.....	82
Tabela 15: Frequência alélica e genotípica do polimorfismo em <i>XPB</i> e comparação da população Brasileira com dados do <i>HapMap</i>	84

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1.Introdução.....	19
1. O Câncer.....	20
1.2. A Glândula Prostática	21
1.3. O PSA.....	22
1.4. O Escore de Gleason.....	24
1.5. Contexto epidemiológico.....	27
1.6. A Genética do Câncer de Próstata.....	29
1.7. Os Fatores de Risco.....	30
1.8. O Reparo de DNA.....	33
1.8.1.Via de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER).....	33
1.8.2.Via de Reparo por Excisão de Bases (BER).....	36
1.8.3.Via de Reparo pela Recombinação Homóloga (HR).....	38
1.9. Os Polimorfismos Genéticos.....	39
1.10. Os Genes de Estudo.....	41
1.10.1. O Gene <i>XPD</i>	41
1.10.2. O Gene <i>APE1</i>	43
1.10.3. O Gene <i>RAD51</i>	44
1.11. O Prognóstico em Câncer de Próstata.....	45
2. Justificativa do estudo/Caracterização do Problema.....	46
3. Objetivos.....	47
3.1.Objetivo Geral.....	48
3.2. Objetivos Específicos.....	48
4. Material e Métodos.....	49
4.1. População de estudo.....	50
4.2. Dados Clínicos e Epidemiológicos.....	51
4.3. Obtenção de Amostras.....	51
4.4. Extração de DNA Genômico.....	52
4.5. Eletroforese de DNA Genômico.....	53
4.6. Quantificação.....	53
4.7. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	53
4.8. Eletroforese em Gel de Agarose do DNA Amplificado.....	55
4.9. A Digestão dos Fragmentos e Eletroforese em Gel de Agarose.....	57
4.10. Análise estatística dos polimorfismos.....	60
4.11. Lista de Soluções e Tampões.....	62
5. Resultados.....	64
5.1.Caracterização da amostra populacional.....	65
5.2. Identificação dos Polimorfismos.....	73
5.2.1. Análises dos <i>SNPs</i> dos genes <i>XPD</i> , <i>RAD51</i> e <i>APE1</i>	73
5.2.2.Análises dos polimorfismos em relação aos critérios dos marcadores biológicos.....	78

5.2.3. Análise dos polimorfismos estudados em relação aos parâmetros de agressividade do tumor nos pacientes com câncer de próstata.....	80
5.2.4 Análise do polimorfismo para o gene <i>XPD</i> com relação as variáveis de exposição de risco.....	81
5.2.5. Contextualização da população brasileira no panorama Internacional.....	82
6. Discussão.....	85
7. Conclusão.....	94
8. Referências Bibliográficas.....	96
9. Anexos.....	108

1. Introdução

1.1 O Câncer

Câncer é um termo genérico utilizado para um grupo de doenças que pode afetar várias partes do corpo e caracteriza-se pela proliferação celular anormal que determina a formação de tumores. O câncer é consequência de uma mudança funcional da célula, que culmina no descompasso do seu ciclo replicativo. Ele se caracteriza pela perda do controle da divisão celular e pela capacidade de invadir outras estruturas orgânicas (ACS, 2012).

O câncer é a segunda doença que mais mata pessoas em todo o mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Em 2005 o número de vítimas chegou a 7,6 milhões, sendo que $\frac{3}{4}$ desses casos estavam espalhados nos países tropicais. Há uma estimativa que em 2015 esse número chegue aos 9 milhões de casos novos e que supere os 11,5 milhões em 2030 (WHO, 2007).

Todos os tipos de câncer envolvem o mau funcionamento de genes que controlam o crescimento e a divisão celular. De acordo com a “*American Cancer Society*”, de uma maneira geral, somente 5% de todos os tipos de câncer estão diretamente ligados à questão hereditária e nestes a alteração genética herdada confere ao seu portador um alto risco de desenvolver um ou mais tipos de câncer. Contudo, a maioria dos cânceres não resultam da genética herdada mas sim de danos acumulados ao longo de toda uma vida no conteúdo genético. Fatores externos ao organismo como: o consumo de tabaco, infecções, uso de agentes químicos tóxicos, exposição à radioatividade, juntamente com aspectos intrínsecos como: mutações herdadas, ciclo hormonal e condições imunológicas estão listados entre os agentes que juntos ou em sequência podem iniciar ou promover o desenvolvimento de um processo neoplásico (ACS, 2012).

O câncer e outras doenças crônicas não transmissíveis vêm se tornando cada vez mais comuns no mundo todo, causando mortes e com isso danos para as famílias. Observando-se os dados sobre saúde pública mundial é fácil perceber que o câncer é uma das doenças que mais acomete a população como um todo, embora os países em desenvolvimento ainda sejam os mais atingidos. Na luta contra esse problema fala-se em

prevenção, diagnóstico precoce e acompanhamento do prognóstico. Tendo em vista as dificuldades que circundam as questões ainda não respondidas sobre a etiologia e prevenção da doença, posta a sua origem multifatorial, busca-se entender também como características individuais podem colaborar para a evolução de cada quadro clínico. Nisso consiste o interesse de se investigar cada vez mais a presença dos marcadores genéticos e sua influência sobre cada indivíduo.

1.2 A Glândula Prostática

A próstata é uma glândula acessória do sistema reprodutor masculino que se situa no interior da pélvis (figura 1), encostada na base da bexiga, órgão muscular onde a urina é armazenada e da qual sai a uretra que passa pelo interior da próstata e do pênis até alcançar o meio exterior. A próstata é um órgão sólido, com massa de aproximadamente 20 gramas. Histologicamente, ela é constituída de músculo liso, tecido glandular e tecido conjuntivo, ela é composta de estroma fibromuscular e 30-50 glândulas que se abrem na uretra. A glândula normal apresenta variações de quantidade de estroma e epitélio nas diferentes zonas, sendo assim, subdividida em: próstata interna (zona de transição, glândulas periuretrais e estroma) e próstata externa (zona periférica e tecido epitelial) (Lee e Bushman, 1995). A principal função da próstata é a produção de líquido prostático. Esse fluido é constituinte do sêmen, e com isso ajuda no transporte dos espermatozoides, assim como na nutrição e proteção dos mesmos durante a ejaculação.

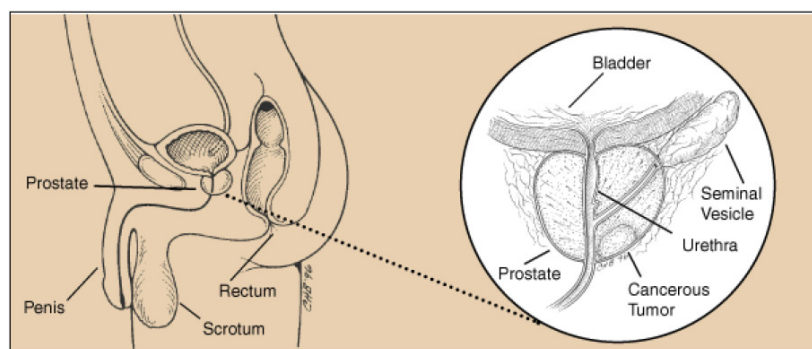


Figura 1: Localização da glândula prostática no organismo humano. Fonte: ACS, 2012.

Quando a próstata cresce e não invade os tecidos vizinhos, ocorre a hiperplasia prostática benigna, cujos sintomas são o aumento na frequência das micções e o esforço

para urinar. Nos casos de câncer, além do aumento do volume da próstata, surgem nódulos que podem ser sentidos no exame de toque retal. Diferentemente do crescimento benigno, o tumor pode não ficar restrito à glândula e invade os tecidos vizinhos.

A história natural do adenocarcinoma da próstata (tipo histológico mais comum) é muito heterogênea. Na maioria dos casos, o tumor apresenta um crescimento lento, de longo tempo de duplicação, levando cerca de 15 anos para atingir 1 cm³ e acometendo homens acima de 50 anos de idade. Por outro lado, alguns pacientes apresentam uma forma de crescimento rápida, extremamente agressiva. Após a descoberta do antígeno prostático específico (PSA) (Wang *et al.*, 1979), o diagnóstico de câncer prostático passou a envolver indivíduos em faixas etárias cada vez mais precoces, de modo que enquanto que nas décadas de 70 e 80 apenas 0,8 a 1,1% dos casos de câncer de próstata eram diagnosticados em pacientes com menos de 50 anos, atualmente este número chega aos 4% dos casos (Khan *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2000).

Os índices estritamente crescentes sobre a incidência do carcinoma da próstata têm se mostrado de certa forma consequência direta dos esforços investidos na detecção precoce da doença, visando sempre maior chance de sobrevivência posto que maiores serão as chances de cura e resposta ao tratamento. Nesse contexto destaca-se o PSA, a partir de então seu uso tem sido ampliado a cada dia.

1.3 O PSA

O antígeno prostático específico (*Prostate Specific Antigen / PSA*) é uma proteína, uma seroprotease de regulação andrógena, de 28,4 kDa e 237 aminoácidos (Belanger *et al.*, 1995) produzida pelo epitélio glandular prostático e liberado no lúmen dos ductos prostáticos, seja ele normal ou com sintomatologia alterada como nos casos benignos de hiperplasia da próstata (HPB), prostatite ou até mesmo nos casos de neoplasia prostática (Amadei, 2008). Geralmente está presente em grandes concentrações no líquido seminal (aproximadamente 2 ng/mL), embora com o aumento da idade haja proporcionalmente uma elevação também dos níveis séricos dessa proteína, entretanto, esse aumento precisa ser acompanhado uma vez que também pode servir de indicativo de que alguma alteração maligna possa estar ocorrendo no tecido normal.

O PSA foi aprovado como marcador de acompanhamento do câncer prostático em 1986 e, como teste de detecção, em 1994. Os valores de PSA total indicativos de recidiva tumoral variam desde 0,1 ng/mL até 0,4 ng/mL. Existem relatos de que 100% dos homens com níveis de PSA maiores a 0,4 ng/mL após a prostatectomia radical apresentam recidiva tumoral entre seis e quarenta e nove meses. Indica-se que este seja o valor mais apropriado para caracterização de recidiva bioquímica (SBU, 2006). Vários estudos têm sugerido a alteração do ponto de corte do PSA de 4,0 ng/mL para 2,5 ng/mL, indicando biópsia prostática nos pacientes que apresentem valores superiores. Isto porque uma parcela significativa dos homens que apresentam PSA sérico inicial entre 2,6 ng/mL e 4,0 ng/mL desenvolverá PSA superior a 4,0 ng/mL no exame de seguimento, durante os próximos quatro anos. Então, embora o ponto de corte consensual para a identificação de biópsia seja 4,0 ng/mL, estudos recentes sugerem que, em pacientes jovens, com próstata pequena e sem prostatite, a biópsia prostática seja considerada com valores de PSA acima de 2,5 ng/mL (Rosa *et al.*, 2005).

A sensibilidade (probabilidade da presença do marcador em caso positivo da doença) a especificidade (probabilidade da ausência do marcador em caso negativo da doença) do PSA a 4,0 ng/mL são de 20% e de 94%, respectivamente. Além da baixa sensibilidade, a utilização do ponto de corte de 4,0 ng/mL apresenta um valor preditivo positivo (probabilidade do teste dar positivo na presença da doença) de apenas 37% e um valor preditivo negativo (probabilidade do teste dar negativo na ausência da doença) de 91 %, o que se traduz na probabilidade de 25% de se ter câncer de próstata em pacientes com níveis de PSA entre 4,0 e 10,0 ng/mL (Salles, 2010).

Uma limitação do uso clínico do PSA como marcador tumoral do câncer de próstata é a de apresentar valores que muitas vezes não diferenciem os pacientes com câncer daqueles com hiperplasia glandular prostática (HPB). A interpretação dos valores em algumas situações é difícil devido à variabilidade na quantidade de tecido de hiperplasia presente na glândula e na relação epitélio/estroma no peso da HPB (Ferreira e Koff, 2005).

Na prática clínica, a utilização do PSA é otimizada quando combinada ao exame de toque retal. Em estudos que investigaram o uso combinado do PSA e do exame de

toque retal, observou-se que 18% dos tumores não teriam sido diagnosticados se o exame de toque retal não tivesse sido realizado, e que 45% dos tumores teriam passado despercebidos se o PSA não tivesse sido feito (Almeida *et al.*, 2007). Apesar de todo o avanço no conhecimento que o PSA trouxe, ele ainda não é suficiente para sozinho caracterizar a presença da doença, dada a sua baixa especificidade embora alta sensibilidade. Com isso, dados como o escore de Gleason são utilizados concomitantemente na hora do diagnóstico a fim de melhor entender o nível de evolução da patologia.

1.4 O Escore de Gleason

De todos os sistemas de classificação de diferenciação celular para o câncer de próstata, o sistema de Gleason é o mais utilizado e é recomendado pela Organização Mundial da Saúde desde 1993. Fundamenta-se em padrões arquiteturais no qual a atipia nuclear não é avaliada. A atipia nuclear é adotada em alguns sistemas, correlaciona-se com o prognóstico, mas não há evidência de que adicione informação prognóstica independente daquela obtida pela avaliação arquitetural (Salles, 2010). O sistema de Gleason define cinco padrões histológicos de graduação, com diferenciação decrescente. Ele é resultado do somatório das duas populações tumorais mais visualizadas na biópsia podendo esta graduação variar de 2 a 10 pontos. Assim, o padrão celular prevalente, denominado padrão primário, e o segundo, denominado padrão secundário, são somados para obter-se o escore de Gleason. Recomendando-se que todos os elementos dessa soma sejam mencionados (por exemplo, escore de Gleason 3+4=7). Os escores de Gleason eram agrupados de forma que variassem de 2 - 5 e 8 - 10, ou então, de 2 - 4, 5 - 6 e 7 - 10, ou ainda, de 2 - 4, 5 - 6, 7 e 8 - 10. Contudo, estes índices eram revestidos de incerteza, pois escores de 4 - 5 e 8 - 10 na prática apresentavam grande sobreposição. De uma maneira geral, o que melhor se aplica na clínica hoje, é a graduação histopatológica de 5 níveis, onde os tumores são classificados de acordo com a diferenciação celular de 1 a 5, sendo grau 1 o mais bem diferenciado e grau 5, o mais indiferenciado. O escore final de Gleason é dado pela soma dos graus do padrão primário (predominante) e secundário (segundo grau histológico mais comum). Dessa forma, as neoplasias mais bem

diferenciadas seriam escore 2 (1+1) e as mais indiferenciadas 10 (5+5). Os tumores com escores 2 a 4 são bem diferenciados, os de 5 a 7 são moderadamente diferenciados e os de 8 a 10 são tumores indiferenciados (figura 2) . Em termos práticos, raramente há neoplasias escore 2, 3, 4 e 10 no momento do diagnóstico.

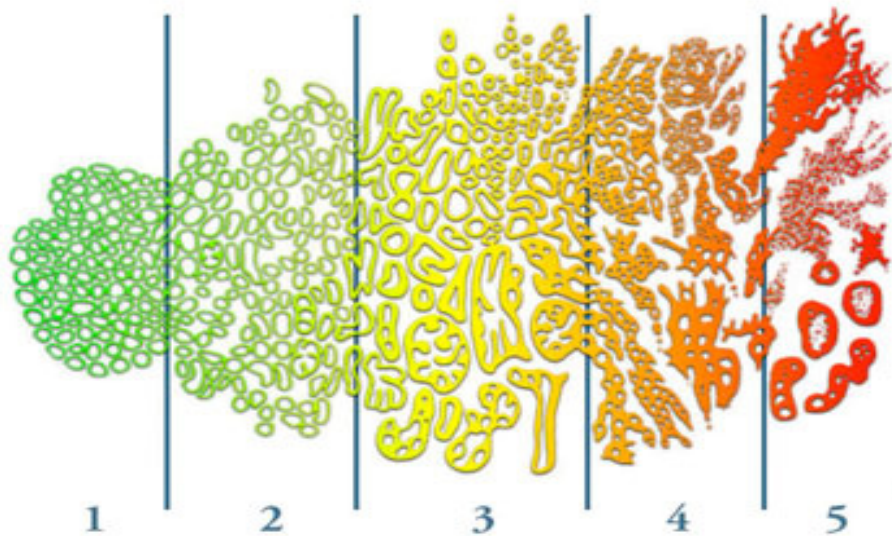


Figura 2: Representação histológica dos graus de diferenciação das células tumorais prostáticas. Graus de Gleason. (retirado de <http://www.stjohnprovidence.org/prostateimplant/Evaluation/>).

Dados patológicos da biópsia como o escore de Gleason, o volume tumoral e a presença de invasão peri-neural, são fatores reconhecidamente associados com o prognóstico em pacientes com diagnóstico de carcinoma da próstata (Beard *et al.*, 2004; D'amico *et al.*, 2000 e 2001; Eichelberger *et al.*, 2003; Epstein *et al.*, 1994; Grossfeld *et al.*, 2002) e devem ser considerados quando houver dúvida quanto ao exame de toque retal e PSA.

Quanto aos níveis de invasão tumoral, utiliza-se um sistema conhecido como TNM, sistema de classificação dos tumores malignos. Esse sistema foi criado por Pierre Denoix, na França, entre os anos de 1943 e 1952, (Denoix, 1952) e desde então ele tem sido utilizado na classificação do estágio clínico do tumor. O sistema TMN descreve a extensão anatômica da doença com base em três componentes: T – referente a extensão

do tumor primário, N – sobre a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais e M – referente a ausência ou presença de metástase à distância. Assim, a adição de números a estes componentes (T0, T1, T2, T3, T4, N0, N1, N2, N3, M0, M1) indicam a extensão clínica de um determinado tumor maligno (MS, 2006). Na figura 3 são mostradas características das fases clínicas do tumor de próstata, onde T1 representa o câncer ainda em fase microscópica e não palpável, em T2 o nódulo já é detectável por toque retal, em T3 o câncer já avançou para tecidos adjacentes à glândula e em T4, o câncer já se alastrou para os órgãos circundantes na pélvis.

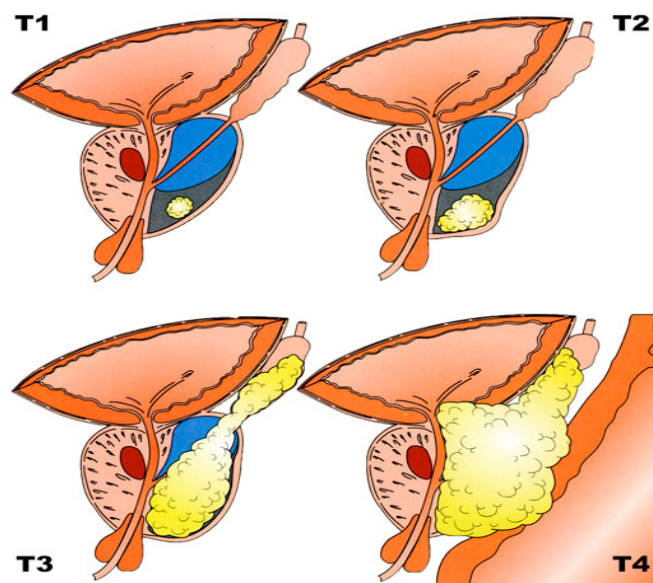


Figura 3: Níveis de invasão tumoral segundo a classificação TNM.

A determinação da agressividade do carcinoma da próstata é fundamental para a escolha do tratamento adequado. Uma vez feito o diagnóstico, para se estabelecer o prognóstico da evolução desta doença deve-se considerar diversas variáveis e analisá-las em conjunto, não isoladamente. Atualmente, a quantificação sérica do PSA, a determinação do grau histológico e a avaliação ou a estimativa do estágio clínico parecem, em conjunto, constituir o melhor critério para estabelecer a extensão do tumor.

Embora existam tratamentos efetivos através da prostatectomia radical e da radioterapia no carcinoma prostático localizado, os casos de pacientes com carcinoma metastático permanecem incuráveis. Um fator crítico na mortalidade relacionada ao

carcinoma prostático é o potencial metastático das células tumorais e a consequente disseminação para sítios secundários.

Contudo, existem algumas questões a serem avaliadas. Uma delas é a enorme falha existente quando se avalia a relação da incidência clínica da doença e a prevalência da mesma. Hoje muitos homens morrem com câncer de próstata, o que não quer dizer que venham a óbito como consequência da doença. Ainda é difícil para o médico urologista estratificar o nível de gravidade no qual se encaixa cada paciente e com isso saber se cada caso é apenas mais um dentro dos padrões tardios de crescimento ou então se consta de mais um caso de progressivo nível de malignidade.

1.5 Contexto epidemiológico


Em decorrência da melhoria nos mecanismos indicadores e de diagnósticos, a prevalência do câncer de próstata assim como a sua alta incidência no Brasil e no Mundo preocupa as autoridades de saúde pública.

Segundo o INCA, no Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino. É esperado um total de 257.870 casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino.

Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma (134 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil).

Especificamente para o câncer de próstata, somente para o ano de 2012 o INCA estima que no Brasil surjam 60.180 novos casos (Tabela 1). Esses valores correspondem a um risco estimado de 62 novos casos a cada 100 mil homens. (INCA, 2011).

Tabela 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2011.

Localização primária			Homens	Mulheres	Localização primária		
casos novos	percentual	casos novos			percentual		
Próstata	60.180	30,8%		Mama Feminina	52.680	27,9%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%		Colo do Útero	17.540	9,3%	
Cólon e Reto	14.180	7,3%		Cólon e Reto	15.960	8,4%	
Estômago	12.670	6,5%		Glândula Tireoide	10.590	5,6%	
Cavidade Oral	9.990	5,1%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%	
Esôfago	7.770	4,0%		Estômago	7.420	3,9%	
Bexiga	6.210	3,2%		Ovário	6.190	3,3%	
Laringe	6.110	3,1%		Corpo do Útero	4.520	2,4%	
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%		Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%	
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%	

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

No Brasil, as taxas de incidência crescentes ao longo dos anos podem ser explicadas pelo aumento da expectativa de vida, melhoria e evolução dos métodos de diagnóstico e, sobretudo da qualidade dos sistemas de informação do país. Na figura 4 é mostrado um panorama geral da distribuição da incidência do câncer de próstata no Brasil.

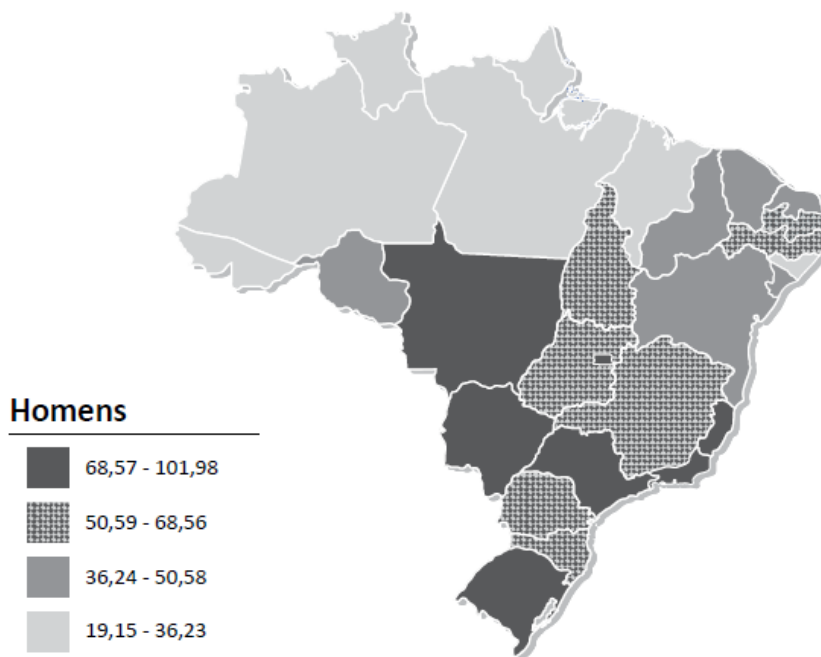


Figura 4: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia da próstata). Fonte: INCA, 2011.

1.6 A Genética do Câncer de Próstata

O principal desafio clínico hoje é representado pela incapacidade de se distinguir facilmente tumores agressivos dos tumores indolentes entre os pacientes que apresentam nódulos com baixo grau de Gleason (Sartor *et al.*, 2008). O desafio, então, estaria associado ao prognóstico e seria melhor resolvido com o entendimento dos processos moleculares da iniciação do câncer de próstata, o que em última instância levaria à identificação de biomarcadores moleculares que forneceriam respaldo para a distinção dos casos indolentes dos agressivos. Até o momento, entretanto, o painel de biomarcadores ainda é insuficiente e com menor resposta prognóstica que o índice de Gleason (True *et al.*, 2006).

Análises genômicas recentes têm mostrado um aumento das evidências que definem subtipos molecularmente. O estudo das vias que integram as análises de expressão gênica, alteração no número de cópias e sequenciamento de genes podem possibilitar uma abordagem mais unificada para real distinção dos subtipos do câncer e com isso a estratificação do perfil do paciente (Taylor *et al.*, 2010).

Essas análises tem identificado alteração no número de cópias e rearranjos cromossômicos associados à carcinogênese. Muitos genes chave são regulatórios e têm sido mapeados em regiões cromossômicas com número de cópias alterado; Isso inclui o gene *NKX3.1* (*NK3 homeobox 1*) na região cromossomal 8p21, *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome ten*) em 10q23, *AR* (*Receptor Androgen*) em Xq, a fusão gênica gerada pelo gene regulador de andrógeno *TMPRSS2* (*Transmembrane protease, serine*) com o fator *ERG* (*Ets Related Gene*), que é um membro da família dos fatores de transcrição *ETS* (*E-twenty six*), o gene *PCA3*, também conhecido como DD3, localizado na região cromossomal 9q21-q22, o gene *EZH2* (*Enhancer of Zeste homolog 2*), entre outras.

A correlação forte da incidência do câncer de próstata com o envelhecimento tem suscitado nos pesquisadores a forte tendência em avaliar alterações na expressão de genes ligados a este fator, o que incluem genes da inflamação, do estresse oxidativo e da senescência celular (Bethel *et al.*, 2009). As linhas de estudo tem evidenciado que uma das maiores influências para a carcinogênese da próstata é o estresse oxidativo

(justamente devido à associação da doença com o envelhecimento) e conseqüentemente o impacto cumulativo de danos sobre o DNA (Khandrika *et al.*, 2009). O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species - ROS*) e a detoxificação feita por enzimas que controlam os níveis celulares das ROS.

1.7 Os Fatores de Risco

O entendimento sobre os fatores de risco que envolvem uma determinada patologia são relevantes na prática da pesquisa em saúde pública, na educação nutricional e genética e na quimioprevenção (Bostwick *et al.*, 2004). Embora não se possa determinar o quanto exatamente desses tipos de câncer são resultantes de fatores constituintes sabe-se que ainda assim os fatores de risco desempenham um papel importante na etiologia do câncer de próstata, e dentre eles cabe-se avaliar principalmente a idade, a relação etnia/região geográfica e a composição genética do indivíduo e da família (Ferrís-i-Tortajada *et al.*, 2010).

A hipertensão arterial, o tabagismo, o consumo de álcool, a inatividade, a obesidade e a hipercolesterolemia são apontados pela OMS (WHO, 2002) no *The World Health Report 2002* como os principais fatores de risco para as doenças e agravos não-transmissíveis, dentre os quais está câncer de próstata. Entre outros fatores, destacam-se itens como:

- **Idade:** Existe uma relação diretamente proporcional entre o aumento da idade e o aumento da chance de vir a desenvolver câncer de próstata. De uma maneira geral, antes dos 45 anos de idade se diagnosticam menos de 0,6% dos casos, já a partir de 65 anos esse número aumenta para 62 a 85%. (Platz *et al.*, 2006).
- **Histórico Familiar:** O câncer de próstata está associado significativamente ao histórico familiar nos estudos epidemiológicos, mas pode ser influenciado pelas alterações do meio. De uma maneira geral, as características clínicas e patológicas de câncer hereditário são similares à forma não familiar (Bostwick *et al.*, 2004).

Agentes ambientais

- **Tabagismo:** O tabagismo é amplamente reconhecido hoje como doença crônica gerada pela dependência da nicotina, estando por isso inserido na Classificação Internacional de Doenças (CID10) da Organização Mundial da Saúde (OMS): o usuário de produtos de tabaco é exposto continuamente a mais de 4 mil substâncias tóxicas, muitas delas cancerígenas. Esta exposição faz do tabagismo o mais importante fator de risco isolado de doenças graves e fatais. Tendo em vista os diferentes níveis de uso de tabaco, consideram-se os seguintes conceitos, baseados em publicações do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (US CDCP, 2010):

- Ex-fumante: Aquele que fez uso de pelo menos 100 cigarros, mas que atualmente não fuma mais.
- Não-fumante: Pessoas que atualmente não fazem uso do tabaco; O conceito inclui ex-fumantes e nunca fumantes.
- Fumante: Pessoa que faz uso do cigarro seja esse uso diário ou não.

Na prática não existe consenso para a definição dos diferentes graus de consumo de tabaco. Vários conceitos incluem menos de uma cartela por dia, menos de 15 cigarros por dia, de 1 a 39 cigarros por semana, o que distinguiria um fumante intermitente de um fumante leve, contudo, todos esses índices de quantidade e tempo são muito relativos e dependem do contexto ao qual são aplicados (Schane *et al.*, 2010).

- **Etilismo:** Segundo a Organização Mundial de Saúde, o consumo de bebidas alcoólicas é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças neuropsicológicas e outras doenças não transmissíveis como as cardiovasculares, cirrose e vários tipos de câncer (WHO, 2011). O grau de risco do consumo nocivo de álcool varia com a idade, o sexo e outras características biológicas do consumidor, o que acaba por incluir até o contexto social no qual o mesmo está inserido. Segundo dados da OMS, assume-se como quantia de consumo padrão (dose) de álcool o equivalente a 12 g de álcool puro, conseqüentemente geram-se categorias que variam de 0,0 a 0,5 doses/dia, (ou 0,0 a 6 g/dia) para o não etilista,

até >5 doses/dia (ou >60 g/dia) para o etilista frequente (WHO, 2011).

- **Fatores alimentares:** A relação entre câncer e fatores alimentares é complexa. São relevantes características como tipos de alimento, componentes específicos de cada alimento (nutrientes, substâncias fitoquímicas), os métodos de preparo, o tamanho das porções, a variedade da alimentação, o equilíbrio calórico, a conservação, entre outras. A evidência científica tem mostrado que o consumo de frutas, legumes e verduras confere grande proteção contra o câncer. O consumo recomendado pela OMS é de pelo menos cinco porções diárias de frutas e vegetais – em torno de 400 g por dia.
- **Radiação:** A radiação pode causar no organismo humano desde queimaduras na pele até mutação do material genético. Pesquisas têm mostrado que a radiação UV danifica o DNA e o material genético, oxida os lipídios e produz perigosos radicais livres, causa inflamação, rompe a comunicação celular, modifica a expressão dos genes em resposta ao estresse e enfraquece a resposta imune da pele (Rangarajan e Zats, 2003). Alguns estudos recentes mostram que a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, aumenta o risco de desenvolver câncer de mama, particularmente durante a puberdade. Estudos feitos entre os sobreviventes da explosão das bombas atômicas e entre pacientes que se submeteram à radioterapia, mostraram que o risco de câncer aumenta em proporção direta à dose de radiação recebida e que os tecidos mais sensíveis às radiações ionizantes são o hematopoiético, o tireoideano, o mamário e o ósseo (INCA, 2011).

Posto isso, fica claro que o DNA é continuamente exposto a agentes que causam danos à sua estrutura. Logo, todos estes itens devem ser observados, pois podem vir a resultar na perda de informação genética vital. Na tentativa de responder aos efeitos potencialmente devastadores que tais agentes causam sobre o material genético, todos os organismos desenvolveram uma série de diferentes processos de reparo, através dos quais muitos tipos de agressão ao DNA podem ser corrigidos (Lehmann, 2001).

1.8 O Reparo de DNA

O reparo do material genético e conseqüentemente a manutenção da estabilidade genômica são cruciais para as funções celulares dos organismos. Defeitos nos processo de reparo podem interferir no envelhecimento e no desenvolvimento de doenças como o câncer. Até hoje existem aproximadamente 150 genes de reparo de DNA conhecidos em seres humanos, e esses atuam sobre o DNA alterado através de vias de regulação distintas (Pramanik *et al.*, 2011).

Existe forte especulação de que os genes de reparo de DNA podem ter atuação sobre o desenvolvimento da neoplasia da próstata, seja pela sua vulnerabilidade aos agentes agressores, seja pela ideia de que tumores que só surgem com a idade avançada acumulam grande quantidade de danos. Linhas de estudo tem evidenciado que uma das maiores influências para a carcinogênese da próstata é o estresse oxidativo (Khandrika *et al.*, 2009).

As quatro principais vias de reparo ao dano de DNA são: reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de bases (BER), reparo de mau emparelhamento (MMR) e reparo de quebra de dupla fita (DSBR). A via NER atua em lesões que geram distorção na hélice, BER repara danos a bases específicas em um único nucleotídeo e também em quebras na fita simples da cadeia (SSB, do inglês, *single-strand break*), MMR corrige mau emparelhamento em bases normais tentando manter o emparelhamento padrão proposto por Watson e Crick. Quebras na dupla fita da hélice também ocorrem e são reparados por dois mecanismos distintos: por junção de fitas não homólogas (NHEJ) e através de recombinação homóloga (HR). NHEJ junta diretamente pontas quebradas enquanto HR usa a cromatide irmã intacta como sequência base para reparar a que foi lesionada (Jeppesen *et al.*, 2011).

1.8.1 Via de Reparo por Excisão de Nucleotídeos (NER)

NER é um sistema de reparo multiproteico capaz de remover uma variedade de lesões que distorcem a hélice de DNA, como as fotolesões induzidas por UV e os adutos

de DNA induzidos por químicos como a aflatoxina B1 e N-acetoxi-2-acetilaminofluoreno (Fousteri e Mullenders, 2008). Esse sistema pode ser dividido em duas sub-vias: NER do genoma global (GG NER) e NER acoplado à transcrição (TC NER) as quais diferem no reconhecimento da lesão, mas posteriormente usam o mesmo mecanismo de excisão (figura 5).

Para que seja desencadeada a via NER são necessários dois pré-requisitos: a presença da lesão e a ruptura da dupla hélice causando uma distorção. Para fins de conveniência a via é normalmente descrita em cinco passos sequenciais. São eles: o reconhecimento da região atingida, desenrolamento do DNA nas proximidades da lesão, incisão na fita do lado 3' e 5' da base lesionada permitindo a excisão do fragmento de nucleotídeos contendo a lesão, síntese de um novo fragmento de DNA substituindo o espaço deixado pela região que foi retirada, e finalmente, a ligação das pontas restaurando a integridade covalente (Jeppesen *et al.*, 2011).

Em GG NER o reconhecimento da distorção da hélice é facilitado por XPC, que é sugerido em vários estudos de ser o primeiro fator proteico a chegar à lesão (Sugasawa, 2006). Já em TC NER, o reconhecimento é facilitado pelo complexo CSB, CSA e XAB2. Essas proteínas são recrutadas pela RNA polimerase II para estabilizar a fita e recrutar as outras proteínas de NER (Laine e Egly, 2006).

Após o reconhecimento das lesões outros componentes são recrutados: XPA, RPA, TFIIH e XPG formando, assim, o complexo pré-incisão. Algumas proteínas possuem atividade helicase, como XPD e XPB, sendo assim esse complexo também é requerido para abertura da dupla hélice de DNA ao redor da lesão (Shuck *et al.*, 2008). O terceiro passo é feito pela dupla incisão ao redor da lesão, na qual atuam as proteínas XPG e o complexo ERCC1-XPF. Para a síntese do novo DNA, estudos *in vitro* sugerem que participem os fatores RPA, RFC, PCNA e DNA pol δ e ϵ . E no último passo, que é a ligação da porção 5' da nova fita à sequência original, um forte candidato seria a DNA ligase I nas células que estão em replicação ativa e o complexo ligase III + XRCC2 nas células que não estão em divisão (Shivji *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2003).

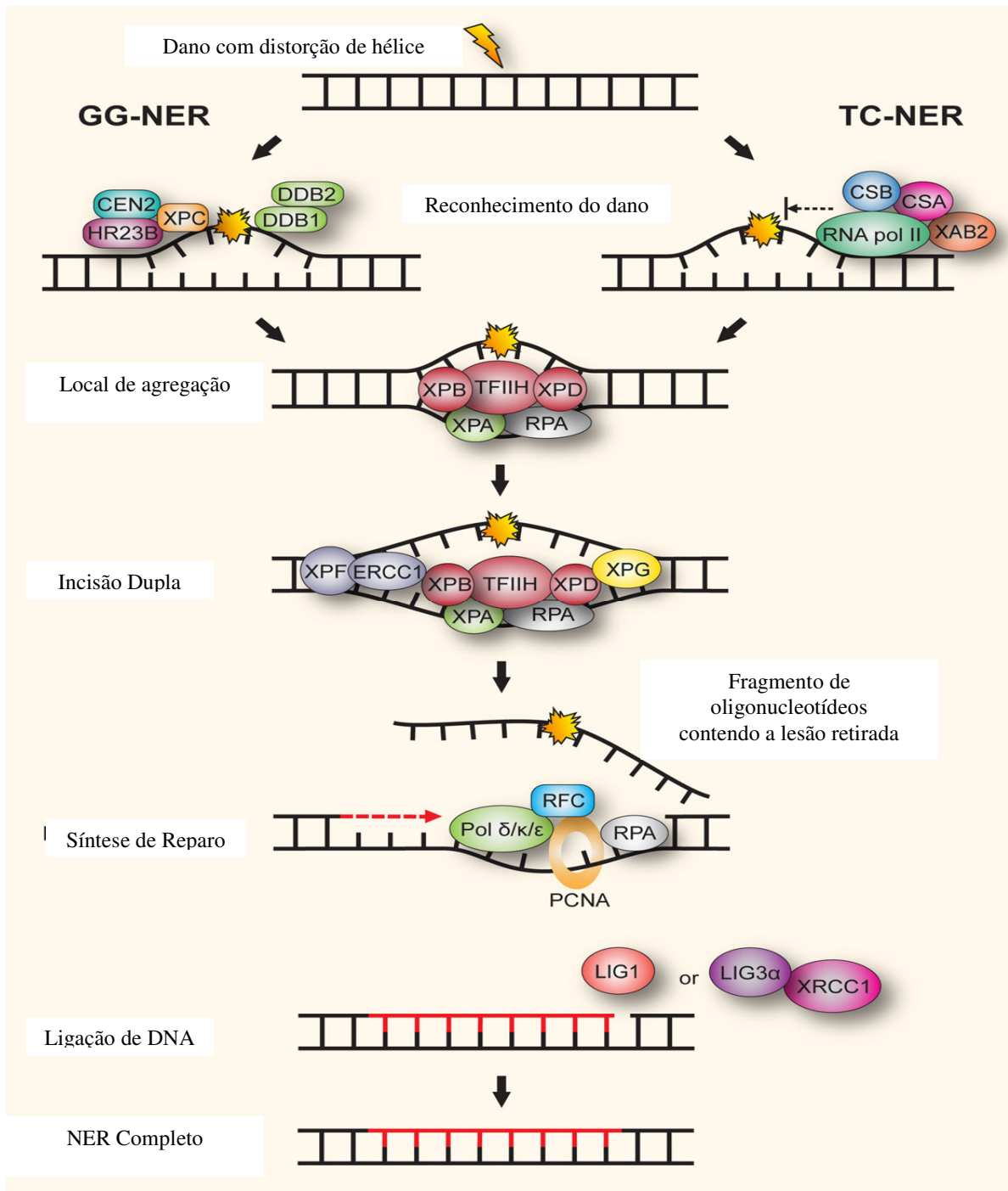


Figura 5: As duas subvias de reparo por excisão de nucleotídeos em mamíferos (Jeppesen *et al.*, 2011).

1.8.2 Via de Reparo por Excisão de Bases (BER)

A principal via de reparo da fita de DNA que teve uma de suas bases alteradas por efeito de alquilação ou dano oxidativo é a via BER. Danos oxidativos persistentes no material genético podem levar a condições mutagênicas e citotóxicas por impedirem fenômenos essenciais à célula como a replicação e a transcrição. Por isso, BER é tão importante na manutenção da integridade genômica.

O primeiro passo de BER é dado por glicosilases que reconhecem e retiram a base alterada por hidrólise da ligação N-glicosídica (Dizdaroglu, 2005), o que resulta na formação de um sítio abásico na ligação fosfodiéster. O próximo passo é justamente nesse ponto. Em mamíferos a proteína responsável pelo reconhecimento desse ponto é a APE1 a qual incide na ponta 5' mais próxima ao sítio abásico (Dempfle e Sung, 2005) a fim de gerar uma ponta 3'OH livre e uma ponta 5' com um fosfato terminal que servirá de substrato para a DNA polimerase β (pol β).

A maioria dos eventos de BER ocorre pela via curta (Almeida e Sobol, 2007), mas a escolha da via depende de vários fatores. Quando a desoxirribose 5' formada é eficientemente retirada pela pol β , a via curta é geralmente beneficiada, caso isso não aconteça a via longa acaba por ser privilegiada.

Na via curta de BER, pol β promove a síntese de reparo, a fim de preencher o intervalo deixado. Isso ocorre pela interação com XRCC1 e outras proteínas (Gryk *et al.*, 2002); Já na via longa a síntese é feita pela polimerase β e/ou pol δ/ϵ associadas ao PCNA em colaboração com o fator RFC (Fan e Wilson, 2005).

O passo final nessa via é a ligação entre a ponta 3' OH e o fosfato 5' terminal, sendo que na via curta a ligação é realizada pelo complexo ligase 3 α /XRCC1 e na via longa a ligação é feita pela ligase1 associada com PCNA. Na figura 6 está representada esquematicamente a via de reparo por excisão de bases e as principais proteínas envolvidas neste reparo.

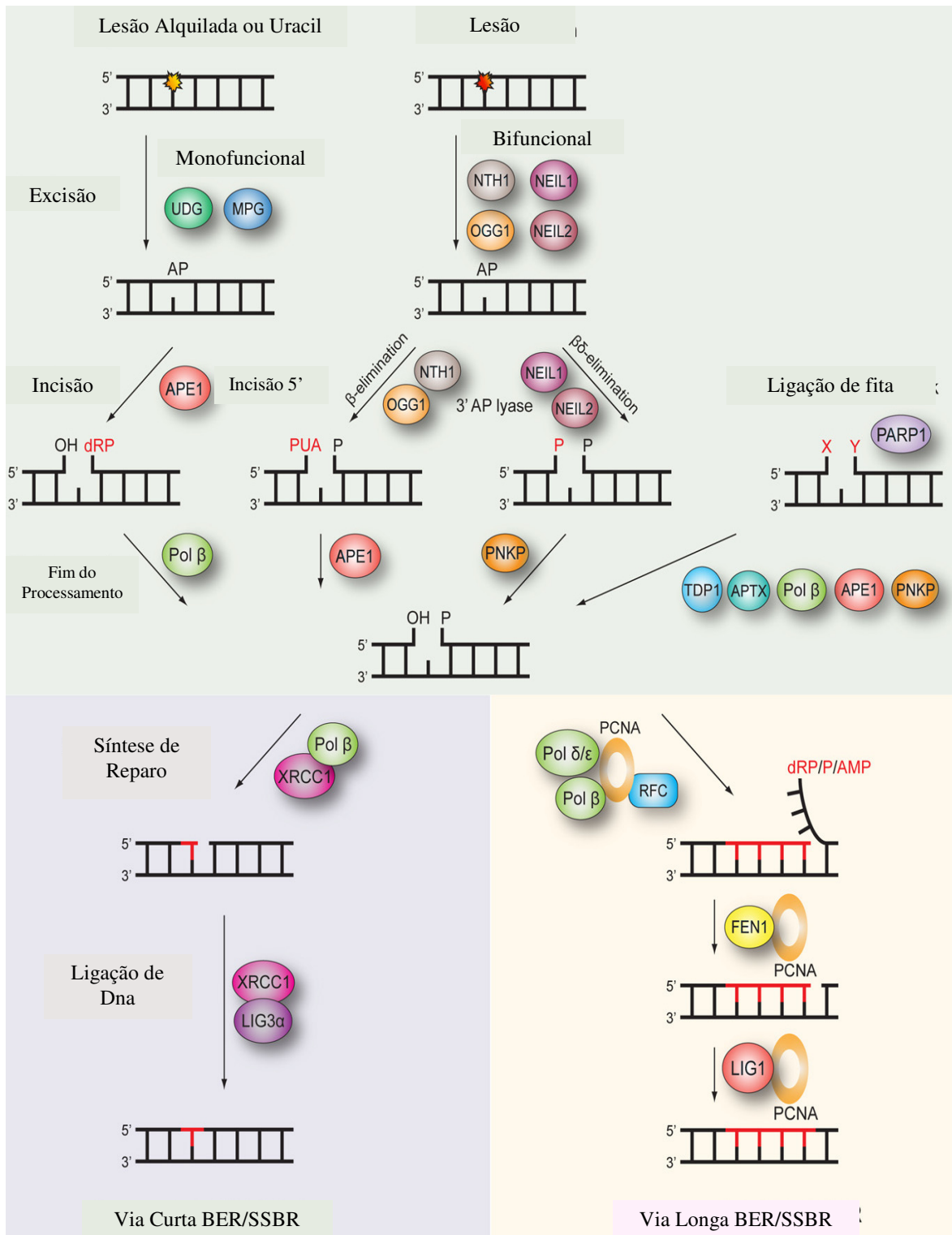


Figura 6: Vias reparo por excisão de base e reparo de quebra de fita simples em mamíferos (Jeppesen *et al.*, 2011).

1.8.3 Via de Reparo através de Recombinação Homóloga (HR)

A recombinação homóloga é um mecanismo que repara uma variedade de lesões no DNA, o que inclui quebras na dupla fita (DSBs), falhas em fita simples e ligações cruzadas intercadeias. Na recombinação homóloga a cromátide lesionada entra em contato com a não lesionada, e por homologia de sequência, é feita a recombinação entre as mesmas. Na recombinação homóloga, o processo segue um mecanismo básico que é composto de três etapas. Primeiro há ressecção da hélice na ponta 5' terminal por ação de nucleases; posteriormente ocorre a invasão da hélice simples criada a partir de uma hélice homóloga e troca de hélices, e por fim, a resolução dos intermediários de recombinação.

As quebras duplas podem ser produzidas por erros de replicação e por agentes exógenos como a radiação ionizante. Nessa via existem mais de 16 moléculas envolvidas, o que inclui o produto dos genes *XRCC3*, *RAD51*, e *BRCA1* e *2* os quais, uma vez alterados, passam a atuar na suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama (Khanna e Jackson, 2001). Além do reparo de DSBs, HR também está envolvida na manutenção da estabilidade genômica através da manutenção de telômeros na ausência da telomerase e pelo reparo de ligações cruzadas de DNA (Moynahan e Jasin, 2010).

O pareamento de DNA homólogo e a reação de troca de fitas são os passos chaves do processo de recombinação. Em eucariotos a recombinase responsável pelo processo é a enzima RAD51. A polimerização de RAD51 na ssDNA é um fator limitante, vulnerável a competição com outros fatores como RPA, mas é auxiliado pelos mediadores de recombinação como RAD52, os parálogos de RAD51 e BRCA2. Os nucleofilamentos de RAD51 medeiam o pareamento e a troca de fitas entre moléculas de DNA homólogas através da ligação de ATP (Forget e Kowalczykowski, 2010; Sung *et al.*, 2003).

Na figura 7 é representado um esquema da via de reparo de quebra dupla, mostrando tanto a atividade da via de HR quanto da via NHEJ a qual modifica e liga região terminal da cadeia de DNA que sofreu quebra dupla, permitindo assim o reparo do dano sem a necessidade de uma sequência não danificada como molde (Helleday *et al.*, 2007).

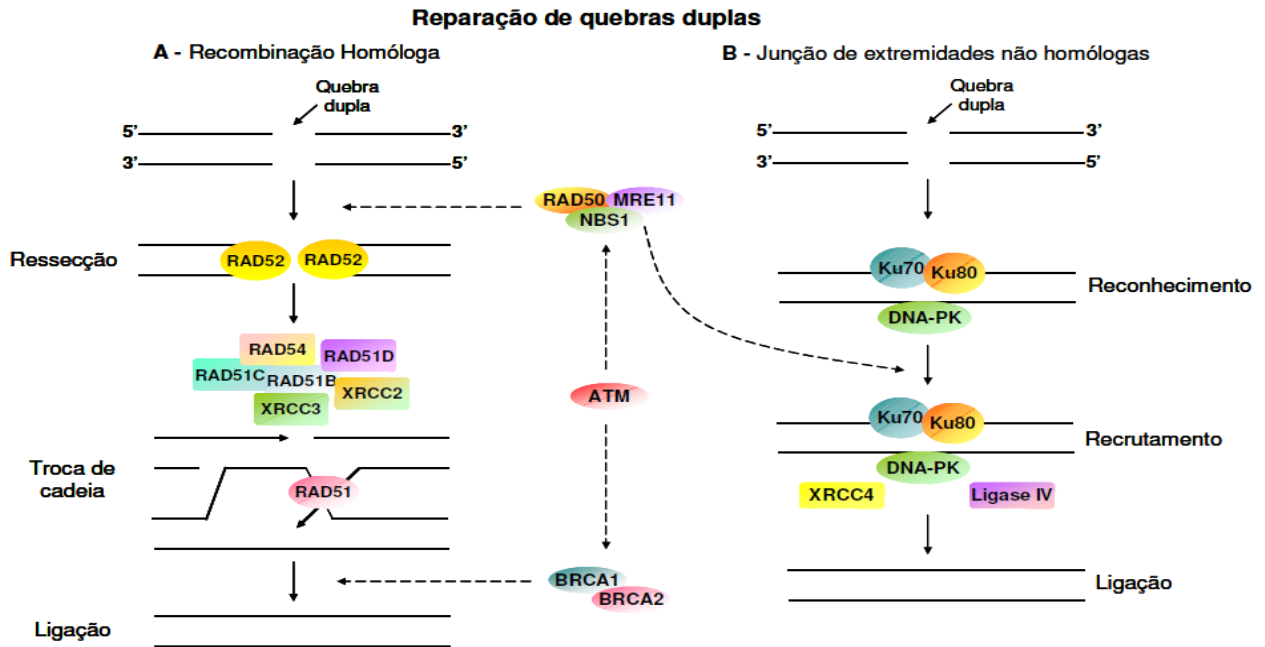


Figura 7: Mecanismo de reparação de DSBs na molécula de DNA, através de recombinação homóloga (A) e por junção de extremidades não homólogas (B) (Goode *et al.*, 2002)

1.9 Os Polimorfismos Genéticos

Dentro de uma espécie, os cromossomos homólogos são bastante similares entre si, mas em determinadas localizações do cromossomo (*loci*) pode haver variabilidade na sequência do DNA. Se a variação é encontrada em uma frequência igual ou superior a 1% na população ela é denominada polimorfismo (Balasubramanian *et al.*, 2004). Embora este termo seja aplicado a qualquer variação, na prática, geralmente o uso comum se refere às mudanças na sequência do DNA que não afetam ou tem efeito menor na função e produção de uma determinada proteína e que, conseqüentemente, são não-letais.

As formas mais comuns de polimorfismos genéticos são deleções, substituições de base única (*Single Nucleotide Polymorphisms / SNPs*), ou variações no número de sequências repetidas (*VNTR*), dos micro e minissatélites, mas de todas as variações do

genoma humano, os SNPs, representam 90%. Devido a essa densidade no genoma, eles podem ser usados como marcadores genéticos para identificar genes associados com doenças complexas (Pramanik *et al.*, 2011). O polimorfismo genético pode criar ou eliminar os sítios de enzimas de restrição. As enzimas de restrição têm sequências específicas de reconhecimento no DNA, onde as mesmas conseguem clivar o DNA. Estas sequências são chamadas de sítios de restrição.

As variações no DNA dos sítios de restrição (ou seja, existência ou não de determinado sítio em função da sequência de DNA) são chamadas de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs). As mudanças no DNA genômico levam à criação ou à eliminação de determinados sítios de clivagem, alterando, assim, o tamanho de um ou mais fragmentos de DNA. Os diferentes comprimentos de fragmentos de restrição constituem alelos co-dominantes em um *locus* de DNA. Algumas das alterações ocorrerão em sequências não codificadoras do gene, que na maioria dos casos não terão efeito em suas funções; outras ocorrerão em sequências codificadoras, levando à produção de proteínas defeituosas.

A existência de polimorfismos genéticos pode ajudar a explicar as diferenças na evolução clínica e na resposta terapêutica entre pacientes com a mesma enfermidade e que utilizam as mesmas medicações (Tardin *et al.*, 2009). O estudo de polimorfismos genéticos permite analisar o grau de diversidade genética em uma determinada população.

Uma das ambições do estudo dos polimorfismos é que os avanços no conhecimento da genética molecular, a redução dos custos e a simplificação dos métodos de tipagem genotípica possam permitir a incorporação dos polimorfismos genéticos como novos biomarcadores, auxiliando no diagnóstico e no tratamento de pacientes com doenças cardiovasculares, por exemplo, permitindo a prática da medicina personalizada, com o intuito de maximizar os benefícios e minimizar os riscos individuais (Monçores *et al.*, 2008).

Trabalhos com a população Brasileira tem mostrado a atuação de determinados genes na suscetibilidade a doenças, como por exemplo, polimorfismos genéticos em CYP2C9 foram relacionados à predisposição de complicações hemorrágicas em pacientes

em uso de anticoagulante oral (Lima *et al.*, 2008). O gene *GSTP1*, por exemplo, tem um sítio polimórfico no códon 105 do éxon 5, no qual uma transição de uma adenina para uma guanina causa a substituição de uma Isoleucina por uma Valina. A substituição resulta em alterações na atividade catalítica da enzima. A presença de um resíduo de Valina na proximidade de um sítio com ligação para um substrato eletrofílico tem sido associada com a diminuição da atividade enzimática e com isso a propensão para o desenvolvimento das mais diversas neoplasias (Garcia-Saez *et al.*, 1994). Assim como acontece com *GSTP1*, vários outros polimorfismos estão associados com a baixa capacidade enzimática e com isso com a maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças.

A identificação de marcadores de risco para o câncer de próstata que apresentem uma frequência alta em diferentes populações torna-se um grande atrativo e traz a possibilidade de um rastreamento populacional mais efetivo e do reconhecimento precoce de pacientes sob risco de desenvolver a neoplasia. Existem diversos genes responsáveis pela codificação de enzimas envolvidas no reparo de DNA que exibem polimorfismos genéticos, capazes de alterar, reduzir ou inibir as funções de proteínas específicas (Yamaguchi *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2006) e modificar a suscetibilidade individual ao câncer. Embora muitas variações de genes de reparo de DNA tenham sido identificadas o significado funcional dessas alterações está em alguns casos ainda sem esclarecimento direto.

1.10 Os Genes de Estudo

1.10.1 O Gene *XPD*

O gene *XPD* (*Xeroderma pigmentosum, complementation group D*), localizado na região cromossomal 19q13.3 é um dos genes que codificam proteínas envolvidas na via de reparo por excisão de nucleotídeos (O'Donovan e Wood, 1993). É um gene que possui 23 éxons e gera um cDNA de 2400 nucleotídeos.

Existem oito polimorfismos de base única descritos em regiões codificadoras de *XPD* e 138 SNPs em regiões intrônicas. No entanto, três variantes polimórficas vêm

sendo amplamente estudadas bem como suas possíveis associações com neoplasias: *XPD/Arg156Arg*, *XPD/Asp312Asn* e *XPD/Lys751Gln* (Manuguerra *et al.*, 2006). O polimorfismo G / A no códon 312 do éxon 10 resulta em uma substituição Asp / Asn de uma região evolutivamente conservada, outro é a substituição de uma base C por uma A no códon 751 do éxon 23, produzindo uma substituição *Lys / Gln* (Zhou *et al.*, 2002) e o outro é um polimorfismo sinônimo no códon 156. A posição 751 do éxon 2 faz parte da sequência responsável pela codificação do domínio C-terminal da cauda da proteína XPD e estudos sobre os efeitos conformacionais desse domínio (White, 2009) dão apoio à hipótese de que o polimorfismo na posição 751 de *XPD* pode influenciar na capacidade de reparo de DNA.

A figura 8 mostra uma representação linear da proteína XPD, onde os seis polimorfismos com maior frequência (principais) são esquematizados de acordo com Shen *et al.*, 1998.

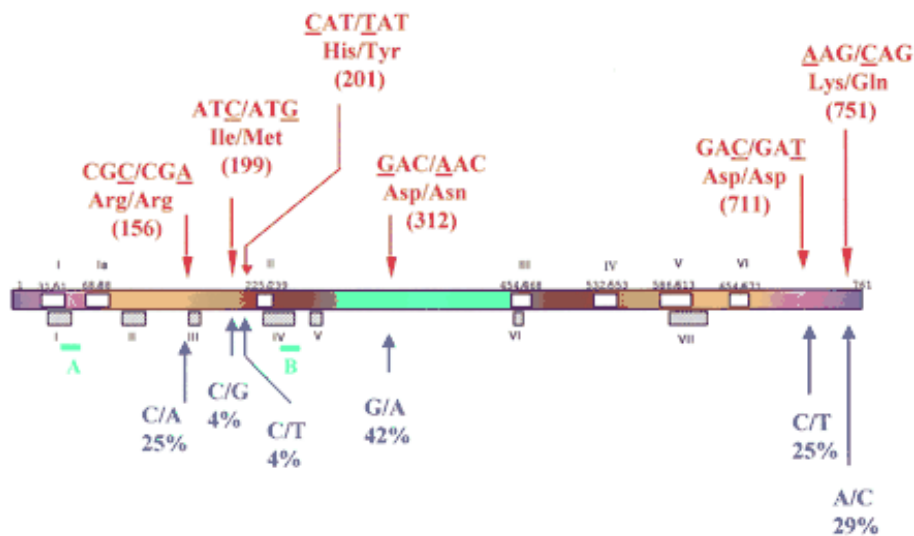


Figura 8: Representação esquemática da proteína XPD e pontos dos principais polimorfismos (Benhamou e Sarasin, 2002).

O domínio C-terminal de XPD é o sítio de interação com a proteína ativadora do complexo TFIID (Lehmann, 2008). É neste domínio onde ocorre um dos mais comuns SNPs, o qual resulta na substituição do aminoácido Lisina (Lys) pelo aminoácido Glutamina (Gln) no resíduo 751 (Benhamou e Sarasin, 2002).

Por ser um polimorfismo comum em muitas populações (Matullo, 2003), essas

alterações conformacionais e seus efeitos funcionais podem contribuir para uma quantidade significativa na variabilidade no reparo de DNA observada e, por isso, com o aumento do risco de câncer nessas populações (Monaco, 2009).

A proteína XPD é um polipeptídeo de 760 aminoácidos que pertence a subfamília *RAD3/XPD* e atua como helicase dependente de ATP. Na verdade essa proteína possui função dupla, atuando tanto na via NER - que repara de uma gama de lesões estruturalmente não relacionadas e também na formação de adutos gerados por dímeros de timidina - quanto como fator basal de transcrição, como parte do fator de transcrição IIIH (TFIIH) (Drapkin *et al.*, 1994).

1.10.2 O Gene *APE1*

O gene *APE1*, antigamente designado *HAP1* (*HAP* = *Human AP*) ou então *APE*, *APEX* ou *REF1*, é constituído por 5 exons e localiza-se no cromossomo 14q11.2-q12, como mostrado na figura 9.

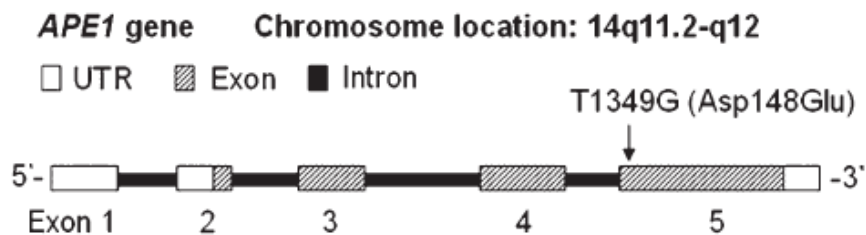


Figura 9 : Estrutura do gene *APE1* e localização do polimorfismo do éxon 5.

O polimorfismo no códon 148 de *APE1* é uma substituição de T por G no éxon 5, o que acarreta uma mudança de uma Asparagina (Asp) para um ácido Glutâmico (Glu). Em alguns estudos esse polimorfismo parece estar associado com alta sensibilidade a radiação ionizante (Hu *et al.*, 2001) e também há registros que o alelo G esteja ligado com o desenvolvimento do câncer de próstata (Chen *et al.*, 2006). Embora a presença desse polimorfismo possa estar associada a essas suscetibilidades cabe falar que ele está localizado em um importante domínio proteico (Walker *et al.*, 1993), mas isso não reduz a sua atividade endonucleásica (Hadi *et al.*, 2000).

O gene *APE1* possui 18 polimorfismos identificados até o momento (Xi *et al.*, 2004), mas são 4 os mais frequentes: um na região promotora (-656 T>G, rs1760944), dois com substituição de aminoácidos (400 A>G, rs2307486, Ile64Val no éxon 3; 1350 T>G, rs1130409, Asp148Glu, no éxon 5) e outro em um íntron (630 T>C, rs3136817), sendo que este último é o mais estudado.

A proteína endonuclease apurínica/apirimidínica (APE1) atua em sítios abásicos de DNA sendo uma enzima chave no reparo por excisão de bases. Processos oriundos do próprio metabolismo celular, como a depurinação, a oxidação do DNA e a ação de glicosilases podem espontaneamente permitir a perda de uma base na dupla fita de DNA. Contudo, tais processos podem ser extremamente danosos às células, pois sítios abásicos podem se transformar em pontos propícios a mutagenicidade uma vez que inibem a ação das topoisomerasas e conseqüentemente processos como a transcrição e replicação. Todavia, normalmente tais pontos são rapidamente corrigidos e/ou prevenidos pelo sistema de reparo celular.

APE1 tem função múltipla pois atua na hidrólise da ligação fosfodiéster na ponta 5' permitindo a geração de uma hidroxila 3' livre para a extensão pela polimerase; Conseqüentemente, o resíduo de fosfato desoxirribose da outra ponta 5' pode ser removido, substituído e com isso as duas cadeias podem ser finalmente unidas para se concluir o reparo (Wang *et al.*, 2006). A AP endonuclease humana APE1, produto do gene *APE1*, é um monômero de 36 kDa, com um alto grau de identidade com a exonuclease III de *E. coli* e em adição à atividade 5'AP endonuclease ela também tem uma atividade 3'→5' exonuclease específica para DNA em hélice dupla.

1.10.3 O Gene *RAD51*

O gene *RAD51* está localizado na posição cromossômica 15q15.1 (Takahashi *et al.*, 1994). A região na qual se localiza esse gene sabidamente exhibe perda de heterozigotidade em um amplo número de cânceres, incluindo nesses o câncer de pulmão, de reto e de mama (Wick *et al.*, 1996). O polimorfismo no promotor do gene *RAD51* na região 5' UTR é uma substituição de G para C a -135 pb do início da transcrição.

O gene *RAD51* é um homólogo de RecA de bactéria e desempenha um papel importante no processo de recombinação homóloga. Ele tem 10 éxons que codificam uma proteína de 339 aminoácidos a qual forma uma nucleoproteína helicoidal sobre o DNA (Galkin *et al.*, 2006). Estudos experimentais têm mostrado que a perda de *RAD51* pode levar a instabilidade genética, aberrações cromossômicas e carcinogênese devido ao acúmulo de mudanças genéticas (Richardson, 2005). Embora as consequências funcionais do polimorfismo 135 G>C ainda sejam desconhecidas é especulado que por alterar a ilha CpG no promotor, o polimorfismo poderia regular a expressão gênica e afetar os níveis de mRNA (Antoniou *et al.*, 2007).

Esse polimorfismo tem mostrado importante associação com a suscetibilidade ao câncer de mama e de ovário devido à sua interação com o produto dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, principalmente em portadores de mutação em *BRCA2* (Levy-Lahad *et al.*, 2001; Goode *et al.*, 2002).

A proteína central envolvida na via de reparo através de recombinação homóloga é RAD51, uma proteína de transferência de cadeia e também fator limitante para que esta via ocorra em células de mamíferos (Lambert e Lopez, 2000). Vários estudos têm demonstrado a importância da proteína RAD51 na estabilidade genômica em eucariotos, através do reparo de quebra dupla de DNA (Symington *et al.*, 2002).

1.11 O Prognóstico em Câncer de Próstata

É razoável considerar que variantes genéticas podem influenciar na ocorrência de câncer de próstata, pois pessoas com reduzida habilidade em reparar o material danificado oxidativamente estariam mais susceptíveis a desenvolver esse tipo de doença (Zhang *et al.*, 2009)

A problemática que envolve a ausência de um prognóstico pouco eficaz está no fato de pacientes com um tipo de câncer de pouca significância clínica serem tratados de forma incisiva e desnecessária (Andrén *et al.*, 2006). Em contrapartida existem tumores que são clinicamente classificados como localizados e não o são, o que leva a indicações terapêuticas curativas não conclusivas (Haese, 2000). Do ponto de vista da saúde pública

a imprecisão do prognóstico é um grave problema, pois está diretamente ligada a altos índices de morbidade associados ao tratamento utilizado.

Já está bem definido na literatura científica a utilidade clínica de alguns fatores prognósticos (Bostwick *et al.*, 2000). Os mais importantes marcadores prognósticos clínicos disponíveis atualmente são os níveis de PSA pré-tratamento e o grau de diferenciação histológica dos fragmentos tumorais biopsiados, conforme classificação de Gleason.

2. Justificativa do estudo/ Caracterização do Problema

Assim, desde que cada vez mais pacientes em idades mais precoces estão sendo diagnosticados, torna-se importante o conhecimento das diferentes características destes tumores neste grupo de pacientes. Por este motivo, o processo molecular que contribui para o carcinoma prostático está sob intensa investigação. Estudos moleculares para identificar possíveis novos marcadores de agressividade tumoral e estudos de genes de susceptibilidade podem determinar como várias vias influenciam no processo de carcinogênese. Estes estudos têm potencial de caracterizar os processos envolvidos na neoplasia e, portanto, fornecer potenciais-alvo para novas abordagens terapêuticas para o carcinoma prostático, assim como possibilitar a descoberta de novos marcadores moleculares para esta neoplasia.

3. Objetivos

3. Objetivos do trabalho

Esse trabalho procurou identificar possíveis marcadores genéticos de susceptibilidade ao câncer de próstata através da análise de polimorfismos em genes de reparo de DNA em 110 homens diagnosticados com câncer de próstata e em 200 homens não afetados pela doença e sem histórico familiar da mesma, provenientes do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, em um estudo caso-controle.

O presente estudo se propõe a oferecer uma base de avaliação de risco de câncer associado a estes polimorfismos através de estudos genéticos e epidemiológicos em amostra da população Brasileira (amostra Fluminense).

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de polimorfismos nos genes *XPB*, *RAD51* e *APE1* no risco de desenvolver câncer de próstata.

3.2 Objetivos Específicos

1. Descrever as populações caso e controle de acordo com características epidemiológicas.
2. Descrever as frequências genotípicas dos polimorfismos genéticos *XPB*, *RAD51* e *APE1*, em uma amostra caso-controle para câncer de próstata.
3. Avaliar a influência dos polimorfismos genéticos *XPB*, *RAD51* e *APE1* na susceptibilidade ao câncer de próstata.
4. Comparar a distribuição das frequências alélica e fenotípica dos polimorfismos *XPB*, *RAD51* e *APE1* observada na população do presente estudo com dados da literatura.

4. Material e Métodos

4.1 População de estudo

Para este estudo foram investigados 110 pacientes do sexo masculino, recrutados entre os anos de 2006 e 2008, e que tinham sido submetidos à prostatectomia radical e subsequente tratamento medicamentoso e/ou radioterápico. Esse grupo consistia do nosso grupo caso. Para o confronto dos dados, foram coletadas 200 amostras, mas agora de indivíduos clinicamente sem suspeita de câncer de próstata até o momento da coleta. Para a execução deste trabalho, houve a necessidade de se coletar novas amostras que compusessem o grupo controle. Isso foi feito para que se pudesse comparar etariamente os dois grupos estudados, o que não seria possível com as amostras disponíveis até então. Por isso, a maioria das amostras controles foi coletada em 2011, preenchendo assim o nosso conjunto a ser analisado.

O trabalho inicial foi lançado no âmbito do convênio INCA/FIOCRUZ e foi aprovado para o estudo com genes de metabolização. Posteriormente, foi incrementado para a análise quanto aos polimorfismos genéticos em genes de reparo de DNA.

Os pacientes são provenientes do Instituto Nacional de Câncer, unidade I (HCI/INCA) e do Hospital Mário Kröeff (HMK), ambos localizados no município do Rio de Janeiro. Já os pacientes que formaram o nosso grupo controle são oriundos do Hospital da Universidade Federal Fluminense, Antônio Pedro (HUAP), localizado no município de Niterói.

Previamente à realização da obtenção das amostras, os pacientes selecionados foram informados sobre os objetivos do projeto e os atributos de sua participação através de entrevista pessoal. Após a garantia do caráter voluntário da participação obteve-se o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foi respondido um questionário pessoal (Anexo 1). O projeto seguiu as diretrizes da Lei 196/96 para pesquisa com seres humanos, a Declaração Helsinque, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Questionário que foram utilizados no projeto inicial intitulado “Polimorfismos Genéticos e Suscetibilidade ao Câncer de Próstata”, coordenado pela Dr^a. Ana Hatagima e Dr^a. Gilda Brown. O projeto também foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos Hospitais HCI/INCA (nº Registro 091/05) e HUAP (nº Registro 048/09).

Os critérios de inclusão e exclusão de pacientes foram:

Critérios de Inclusão: Pacientes adultos (a partir de 18 anos) com tumores de próstata T1, T2 e eventualmente T3, cujo diagnóstico e tratamento foram realizados no INCA e HMK; Pacientes que aceitaram participar deste estudo assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Critérios de Exclusão: Pacientes menores de 18 anos; Pacientes com tumor T4 que não se beneficiam da cirurgia; Pacientes que tenham inicialmente passado por qualquer tipo de tratamento ou cirurgia para câncer de próstata em outras instituições não associadas; Pacientes portadores de síndromes genéticas e do vírus HIV; Pacientes que não aceitaram participar desta pesquisa.

4.2 Dados Clínicos e Epidemiológicos

Os dados clínicos e epidemiológicos foram provenientes dos questionários sobre estilo de vida respondidos pelos próprios pacientes casos e controles selecionados para análise. Os tópicos abordados variavam entre questões de hábitos de vida até descrição das características de cada um. A informação sobre o consumo de bebida alcoólica e tabaco ao longo dos anos foi combinada a fim de se gerar grupos bem definidos. Devido à falta de consenso existente para a categorização dos grupos e tendo em vista que o fato que se pretende avaliar é resposta genética relacionada a este fator de exposição, usou-se apenas separar os grupos entre os que já fizeram uso do agente de exposição e os que não. Não se considerando o tempo de exposição nem as doses, apenas a presença ou não do consumo.

As perguntas também abordaram os hábitos alimentares, os agentes de exposição (geralmente relacionados ao fator ocupacional), os registros de casos de câncer na família, o consumo de drogas, o nível de escolaridade, a etnia (onde o paciente se autodeclarava negro, pardo/mulato ou branco), e também à naturalidade.

4.3 Obtenção de Amostras

As amostras de sangue (4 mL) foram coletadas em tubo *vacutainer* com EDTA e armazenadas em temperatura ambiente, até a extração do DNA.

A obtenção das amostras biológicas obedeceu a todos os requisitos estipulados pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

4.4 Extração de DNA Genômico

Uma amostra de 4mL de sangue (armazenados em tubo com anti-coagulante EDTA) foi transferida para um tubo de 15 mL e centrifugada à temperatura ambiente por 10 minutos a 2.000 x g. A extração foi realizada conforme o método conhecido como Fenol-Clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). O sobrenadante (plasma) foi desprezado e ao restante foram adicionados 10 mL de solução de lise de hemácias (NH₄Cl 155 mM pH 7,4; KHCO₃ 10 mM; EDTA 1 mM) gelada. O tubo foi agitado vigorosamente e mantido em gelo durante 30 minutos. Depois, a mistura foi centrifugada a 2.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado e as etapas descritas anteriormente, de adição da solução de lise de hemácias até a última centrifugação, foram repetidas até que o precipitado estivesse totalmente branco.

Assim que o concentrado estava adequado, ele foi ressuspenso em 600 µL de solução de lise de núcleos (TRIS-Cl 10 mM; EDTA 2 mM; NaCl 400 mM pH 8,2), 15µL de SDS 20% e 1,5 µL de proteinase K (25 mg/mL). A mistura foi mantida a 37°C por 16 horas.

No dia seguinte, foi adicionado o mesmo volume da amostra em mistura de fenol (SIGMA®) (Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamil na proporção 25:24:1, saturado com TRIS-Cl 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) e centrifugado à temperatura ambiente por 10 minutos a 2.000 x g. A fração superior, que contém o DNA, foi transferida para um novo microtubo *ependorf* de 1,5 mL. O DNA foi precipitado adicionando 0,1 X o volume com acetato de amônio 8M, 2X o volume com etanol 100% e incubado a -20 °C durante a noite. Depois o tubo foi centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 50 µL de água ultra pura.

4.5 Eletroforese de DNA Genômico

Após a extração, a presença e a integridade do DNA foram confirmadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo (10 mg/mL). A corrida eletroforética foi realizada com o tampão TAE 1X (Tris-base 0,04 M; ácido acético glacial 1 M; EDTA 50 mM, pH 8,0) a 100 V durante 60 minutos. Foi aplicada no gel uma mistura de 1 µL de DNA e 5 µL de tampão de carregamento 6X (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; azul de bromofenol 0,1%; azul de cianol 0,1%). Após a corrida, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta. Um exemplo da imagem realizada em gel de agarose 1% para verificação da integridade do DNA extraído é mostrada na figura 10. As amostras foram armazenadas a -20 °C para as futuras análises moleculares.

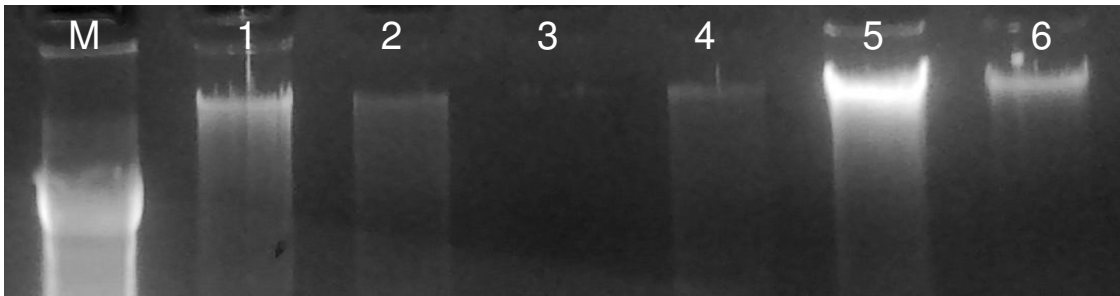


Figura 10: Foto da eletroforese em gel de agarose 1% para verificação de integridade do DNA extraído. M=marcador de peso molecular. 1-6 amostras recém-extraídas pelo método Fenol-Clorofórmio.

4.6 Quantificação

A quantificação do material genômico de cada amostra foi feita antes de qualquer reação de PCR. A quantificação foi feita à absorvância de 260 nm (para detectar ácidos nucléicos) e 280 nm (para detectar proteínas). A razão entre as duas absorvâncias, A260 e A280, deveria ser igual ou maior a 1,8 para que o material fosse considerado puro (Sambrook *et al.*, 1989). As amostras de DNA foram quantificadas em um espectrofotômetro Beckman Nanodrop (DU 640).

4.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foi realizada amplificação de sequências-alvo específicas dos genes pela técnica de PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando oligonucleotídeos iniciadores

que flanqueiam as regiões gênicas de interesse, como mostrado na tabela 2.

Tabela 2: Sequencia de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a PCR-RFLP

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	Referencia
<i>XPB</i> (Lys751Gln)	F: 5'-ATC CTG TCC CTA CTG GCC ATT C-3' R: 5'-TGT GGA CGT GAC AGT GAG AAA T-3'	Baccarelli <i>et al.</i> , 2004
<i>RAD51</i> (RAD51-135C)	F: 5'-TGG GAA CTG CAA CTC ATC TGG-3' R: 5'-GCG CTC CTC TCT CCA GCA G-3'	Wang <i>et al.</i> , 2001
<i>APE1</i> (Asp148Glu)	F: 5'-CTGTTTCATTTCTATAGGCTA-3' R: 5'AGGAACTTGCGAAAGGCTTC-3'	Hu <i>et al.</i> , 2001.

Para amplificar as sequências de *XPB*, *RAD51* e *APE1* foram utilizadas na solução base 70 µL de água ultra-pura e estéril e 30 µL da mistura da reação total contendo os reagentes padrões mais a amostra de DNA a ser amplificada, gerando um volume final de 100 µL de reação.

O fragmento do gene *XPB* foi amplificado usando aproximadamente 100 ng de DNA, 0,2 mM de cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos (Invitrogen®), 3 mM de MgCl₂ (Invitrogen®); 2 µL de cada iniciador concentrados a 10 pmol/µL e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen®) em um tampão de reação 1X [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0,1% Triton X-100] (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). Os fragmentos de *RAD51* e *APE1* foram amplificados nas mesmas condições, exceto pela concentração de MgCl₂ que para estes genes foi de 2 mM.

No termociclador (Applied Biosystems®), a amplificação dos fragmentos de *XPB* foi iniciada com uma pré-desnaturação com duração de 10 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 61°C por 30 segundos e extensão do fragmento com 72°C por 1 minuto; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. Para o gene *RAD51* a reação seguiu o ciclo de pré-desnaturação com duração de 10 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 59°C por 1 minuto, e extensão do fragmento com 72°C por 1 minuto; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

Enquanto que para *APE1* a reação seguiu o ciclo de pré-desnaturação com duração de 5 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento dos iniciadores (temperatura de anelamento) a 55°C por 1 minuto, e extensão do fragmento com 72°C por 1 minuto; e finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

A tabela a seguir resume as condições aplicadas a cada reação de amplificação.

Tabela 3: Condições necessárias para a amplificação dos genes

Polimorfismos		<i>XPD</i>	<i>RAD51</i>	<i>APE1</i>
Técnica		PCR- RFLP	PCR- RFLP	PCR- RFLP
Preparo da Reação	Tampão de reação (1X)	1X	1X	1X
	MgCl ₂	3 mM	2 mM	2 mM
	Oligonucleotídeos	0,2 mM de cada	0,2 mM de cada	0,2 mM de cada
	Iniciadores	20 pmol de cada	20 pmol de cada	20 pmol de cada
	Taq polimerase	1U	1U	1U
	Volume final	100µL	100µL	100µL
Tamanho do produto amplificado		324pb	157pb	164pb
Ciclagem	Início	95 °C – 10 min.	95 °C – 10 min.	95 °C – 5 min.
	Desnaturação	95 °C – 45 seg.	95 °C – 45 seg.	94 °C – 1 min.
	Anelamento	61 °C – 30 seg.	59 °C – 1 min.	55 °C – 1 min.
	Extensão	72 °C – 10 min.	72 °C – 10 min.	72 °C – 10 min.
	Término	15 °C – 10 min.	4 °C – 10 min.	15 °C – 5 min.
	Número de ciclos	35	35	35

4.8 Eletroforese em Gel de Agarose do DNA Amplificado

Para a verificação da eficiência da reação da PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TAE 1X (Tris-base 0,04 M; ácido acético glacial 1 M; EDTA 50 mM, pH 8,0) e contendo brometo de etídeo (10 mg/ml). Foram aplicados 5 µL do material amplificado juntamente com 5 µL de tampão de carregamento 6X (Tris-Cl 10 mM, pH 8,0; azul de bromofenol 0,1%; azul de cianol 0,1%). Utilizou-se, como referência de tamanho, o marcador de peso molecular composto por múltiplos de 100 ou 50 pares de base (Gene Ruler™ – Fermentas). A eletroforese foi realizada a 100 V por 1 hora e o gel foi sob luz ultravioleta.

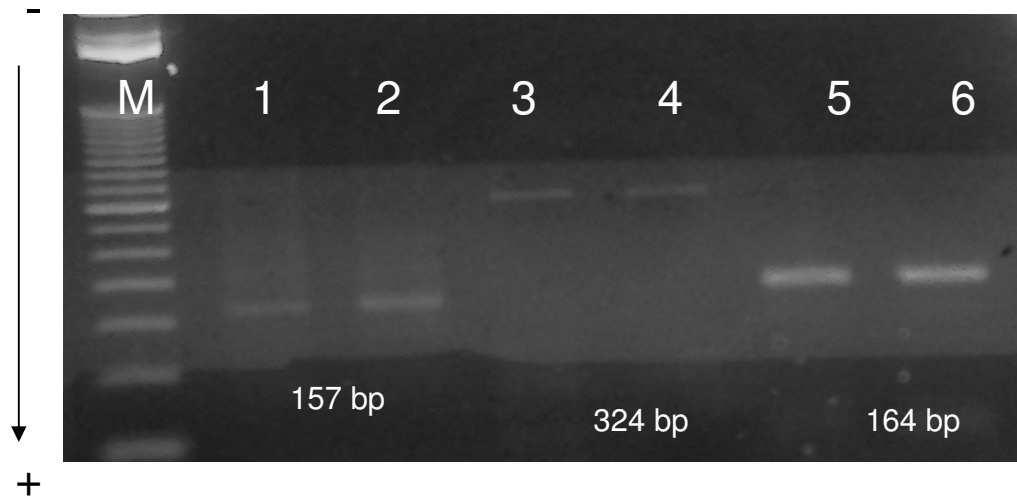


Figura 11: Foto da eletroforese em gel de agarose 2% para verificação do produto de PCR dos genes *RAD51* (1 e 2), *XPD* (3 e 4) e *APE1* (5 e 6), respectivamente. Marcador de peso molecular (M) de 50bp.

4.9 A Digestão dos Fragmentos e Eletroforese em Gel de Agarose

De posse do material amplificado foi realizada a técnica de PCR-RFLP (do inglês *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). Nessa técnica, os polimorfismos de sítios de restrição (R SPs, do inglês *Restriction Site Polymorphism*) resultam em alelos que possuem ou não um sítio de restrição específico e podem ser analisados pela digestão com a endonuclease de restrição específica. Os RFLPs resultantes possuem dois alelos correspondendo à presença ou à ausência desse sítio de restrição, gerando fragmentos de restrição cujos tamanhos são característicos dos dois alelos, podendo assim serem identificados (Strachan e Read, 2002).

Os produtos da reação de clivagem por enzima de restrição foram analisados em gel de agarose ou de poliacrilamida. Para a análise em gel de agarose foram utilizados 5 µL de produto da reação misturados a 5 µL de tampão de amostra; o gel foi então submetido à corrida eletroforética. O gel de poliacrilamida foi preparado com solução estoque 29:1 (acrilamida:bisacrilamida), tampão TBE 10X (90 g de Tris base; 18g de Tris-HCl; 55g de ácido bórico; 40ml de EDTA 0,5M; volume em água para 1L; pH 8,0), água destilada, persulfato de amônio e TEMED (tetrametiletenodiamina); foi realizada pré-corrída eletroforética a 200 V por 1,5 horas.

Os padrões de restrição das endonucleases para cada *SNP* que foram analisados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Descrição das condições utilizadas para as digestões dos fragmentos amplificados

Variáveis	Genes	<i>XPD</i> Lys751Gln	<i>RAD51</i> G135C	<i>APE1</i> (Asp148Glu)
Enzima de restrição		PstI	BstNI	BfaI
SNP		A → C	G → C	T → G
Sítio de Restrição		5'-C-T-G-C-A▼G- -G▲A-C-T-C-5'	5' -C-C▼G-G-C- -C-G-G▲C-5'	5' -C▼T-A-G- -G-A-T▲C-5'
Tempo de Digestão		6h	1h	6h
Temperatura		37°C	60°C	37°C
Concentração do Gel		Agarose 4%	Agarose 4%	Agarose 4%
Corrida Eletroforética		100V por 1h	100V por 1h	100V por 1h
Fragmentos de restrição		Lys/Lys: 100pb e 224pb Lys/Gln: 66pb, 100pb, 158pb e 224pb Gln/Gln: 66pb, 100pb e 158pb	G/G: 71pb e 86pb G/C: 71pb, 86pb e 157pb C/C: 157pb	Asp/Asp: 164pb Asp/Glu: 164pb, 144pb e 20pb Glu/Glu: 144pb e 20pb

Quando era feita a leitura dos fragmentos em gel de poliacrilamida, eram utilizados 5 µL de produto da reação misturados a 5 µL de tampão de aplicação; Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida era corado em solução de nitrato de prata, diferente do gel de agarose que era corado com brometo de etídeo. Posteriormente o gel foi fotografado e analisado.

As Figuras 12, 13 e 14 ilustram como foram analisados os perfis eletroforéticos para cada um dos genes estudados.

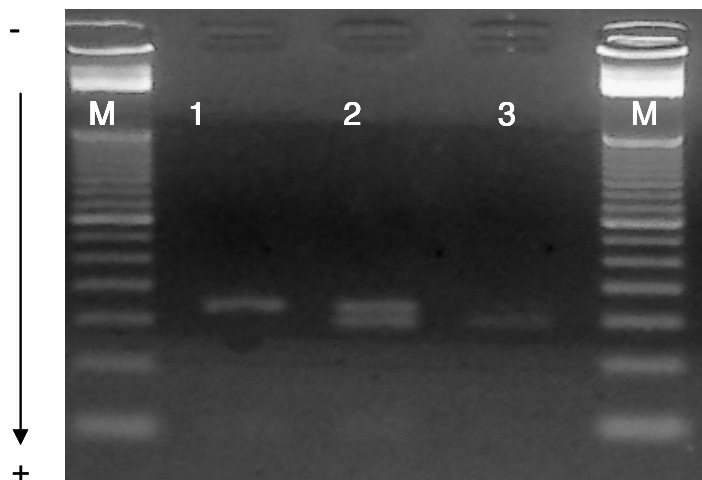


Figura 12: Foto da eletroforese em gel de agarose 4% para verificação do polimorfismo de *APE1*. Análise do polimorfismo de *APE1* (Asp 148 Gln) através de digestão pela enzima de restrição BfaI e visualização em gel. A primeira e última colunas representam os padrões de peso molecular de 50 pb. 1- representa o genótipo selvagem (TT) com uma banda de 164 pb, 2- representa os indivíduo heterozigoto (TG) com uma banda de 164 pb, uma de 144 pb e uma de 20 pb (a última não visível em gel de agarose) e 3- representa o indivíduo homozigoto recessivo (GG) com uma banda de 144 pb e uma de 20 pb (também não visível).

Vale a pena salientar que as bandas muito pequenas geradas como produto da digestão do fragmento amplificado de *APE1* (banda de 20 pb) não são visualizadas em gel de agarose 4%, no entanto, isso não compromete a interpretação dos resultados, haja vista que ela não é essencial para a caracterização genotípica (figura 12).

A leitura dos fragmentos digeridos do gene *RAD51* também foi feita em gel de agarose 4%. Embora este também gerasse fragmentos pequenos de 87 pb e 71 pb, estes eram visualizados em gel de agarose sem maiores problemas, não gerando confusão na interpretação dos dados (figura 13).

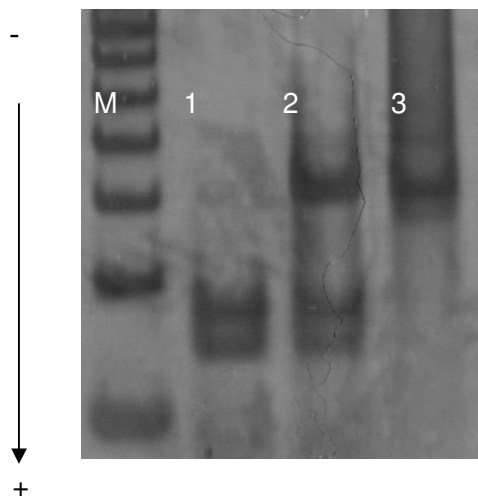


Figura 13: Foto da eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para verificação do polimorfismo de *RAD51*. Análise do polimorfismo de *RAD51* G135C através de digestão pela endonuclease de restrição BstNI e visualização em gel. M=marcador de peso molecular de 50 pb. 1- indivíduo com genótipo selvagem (GG) com dois fragmentos, um de 71 pb e outro de 87 pb; 2- indivíduo com genótipo heterozigoto (GC) com três fragmentos, um de 71 pb, um de 87 pb e outro de 157 pb; 3- indivíduo homozigoto recessivo (CC) com apenas um fragmento de 157 pb.

Os fragmentos oriundos da digestão da região polimórfica de *XPD* também foram fotografados e eram visualizados na maior parte das vezes em gel de agarose 4%. Os fragmentos de 224 pb, 158 pb, 100 pb e 66 pb eram utilizados como referência para a identificação genotípica (figura 14).

Nota-se que nem sempre a presença da banda de 66 pb era detectável devido ao seu pequeno tamanho, contudo, isso também não interferia na leitura já que a distinção entre as bandas de 224 pb e 158 pb permitia a correta genotipagem.

Após a padronização e aplicação das técnicas de PCR, as análises genotípicas foram repetidas em aproximadamente 10% das amostras para garantir a reprodutibilidade dos resultados. Todas as amostras apresentaram o mesmo perfil genotípico confirmando os resultados encontrados (dados não mostrados).

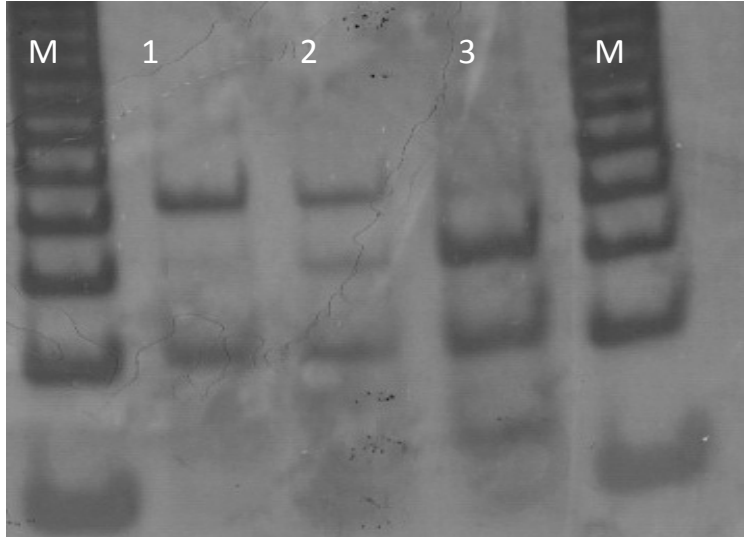


Figura 14: Foto da eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para verificação do polimorfismo de *XPD*. Análise do polimorfismo de *XPD* Lys/Gln através de digestão pela endonuclease de restrição PstI e visualização em gel. M=marcador de peso molecular de 50 pb. 1- indivíduo com genótipo selvagem (Lys/Lys) com dois fragmentos, um de 100 pb e outro de 224 pb; 2- indivíduo com genótipo heterozigoto (Lys/Gln) com quatro fragmentos, um de 66 pb, um de 100 pb, um de 158 pb e outro de 224 pb; 3- indivíduo homozigoto recessivo (Gln/Gln) com três fragmentos, um de 66 pb, um de 100 pb e um de 158 pb.

4.10 Análise estatística dos polimorfismos

As diferenças das frequências genótípicas entre o grupo dos pacientes e dos controles foram analisadas pelo teste de Fisher sendo que se considerou um OR (*Odds Ratios*) de 95% de confiança. Nesse mesmo índice de confiança, foram também calculados os níveis de sensibilidade, especificidade, os valores preditivos positivos e negativos e a acurácia do teste. Julgou-se importante o cálculo desses índices, por serem estas as cinco principais características de *performance* dos testes diagnósticos com resultados numéricos, partindo do princípio que, por definição:

Sensibilidade: é a probabilidade de resultado positivo nos doentes (verdadeiro positivo).

Especificidade: é a probabilidade de resultado negativo nos não-doentes (verdadeiro

negativo).

Valor preditivo positivo: é a probabilidade da presença da doença quando o teste é positivo.

Valor preditivo negativo: é a probabilidade da ausência de doença quando o teste é negativo.

Acurácia: é a probabilidade do teste fornecer resultados corretos, ou seja, ser positivo nos doentes e negativo nos não doentes. Expresso de outra forma é a probabilidade dos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos como uma proporção de todos os resultados.

Foram utilizadas tabelas de contingência para associar o grupo (casos e controle) com as variáveis clínicas (origem geográfica, escolaridade, tabagismo, etilismo, etnia, histórico de câncer familiar, fatores de risco e consumo de drogas). O teste *qui-quadrado de Fisher* ou o teste qui-quadrado de Pearson foi adotado para testar a significância estatística da associação entre tais variáveis.

Os dados da pesquisa foram tratados na versão 17.0 do *Statistic Package for the Social Sciences* (SPSS). Em todas as medidas estatísticas utilizadas foram considerados níveis de significância de $p < 0,01$ e $p < 0,05$, representando percentuais de confiança de 99,0% e 95,0%, respectivamente.

O teste de Fisher foi usado para avaliação dos grupos casos e controles em relação a cada genótipo analisado e suas combinações, sendo assim, avaliou-se o grupo *XPD*, *RAD51*, *APE1*, *XPD+RAD51*, *XPD+APE1*, *RAD51+APE1* e *XPD+APE1+RAD51*. As análises foram obtidas com o uso do programa R, versão 2.13.0 (R Development Core Team, 2011).

As frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos analisados na população brasileira (RB) foram comparados com o de outras populações no banco dados *HapMap* (www.hapmap.org), como por exemplo, os residentes de Utah com ancestralidade no Norte e Leste Europeu (CEU), população Chinesa Han em Pequim, China (CHB), Indianos *Gujarati* de Houston, Texas (GIH), Japonesa de Tóquio e algumas outras populações Indianas selecionadas pela literatura: população do Sul da Índia (SInd) (*South Indian ethnicity from Chennai, Tamil Nadu state*) (Vettriselvi *et al.*, 2007; Wang

et al., 2010), população do Norte da Índia (NInd) (*North Indian ethnicity from Lucknow, Uttar Pradesh state*) (Gangwar *et al.*, 2009; Srivastava *et al.*, 2009) e população do Leste da Índia (EInd) (*Eastern Indian ethnicity from Calcutta, West Bengal state*) (Majumder *et al.*, 2007).

O teste qui-quadrado de Pearson foi feito entre a população Brasileira (BR) e essas outras populações usando a frequência genotípica de *XPB* numa tabela de contingência 3X2.

4.11 Lista de Soluções e Tampões

- Solução de Brometo de Etídeo (10 mg/ml): 200 mg de brometo de etídeo e água destilada até completar o volume de 20 mL.
- Solução de dNTP's (0,2 mM): 0,05 mM de dATP; 0,05 mM de dTTP; 0,05 mM de dCTP e 0,05 mM de dGTP.
- Solução de Gel de poliacrilamida 10%: 2,5 mM de TBE 10X, 8,3 mL de poliacrilamida 30%; 250 µL APS ; 25 µL de TEMED e 14,2 ml de H₂O destilada
- Solução de Gel de Agarose 2,5%: 2,5g de Agarose, 100ml de tampão TAE 1X.
- Solução de lise de hemácia: 10mM de TRIS HCL, 5 mM de MgCl₂ e 10 mM de NaCl.
- Solução de lise de núcleos: 10 mM de TRIS, 2 mM de EDTA e 400 mM de NaCl.
- Mistura Fenol:clorofórmio:álcool isoamil SIGMA® na proporção 25:24:1 saturado com 10 mM de TRIS e 1 mM de EDTA pH 8,0.
- Tampão de corrida: azul de bromofenol 0,025%, xileno-cianol 0,025%, glicerol 30%.
- Tampão TBE 1X: 89 mM tris-borato, 2 mM de EDTA pH 8,0.

- Tampão TAE 1X: 20 ml de TAE 50X; Completar para 1000 mL de H₂O destilada.
- Tampão TE: 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 ; 50 mM de EDTA pH 8

5. Resultados

5.1 Caracterização da amostra populacional

A média de idade no grupo caso foi de 62,09 anos ($\pm 6,485$) e no grupo controle, de 61,60 anos ($\pm 10,337$). Com relação à idade, não existiu diferença estatística significativa entre o grupo de pacientes caso ($n=110$) e o grupo controle ($n=200$), como era esperado, já que a intenção era poder eliminar as discrepâncias etárias a fim de se ter uma comparação bem equilibrada entre as duas subpopulações.

Observa-se que para nenhum dos itens abaixo ilustrados (tabagismo, alcoolismo, origem geográfica, nível de escolaridade, etnia, histórico de câncer na família e consumo de drogas) foi encontrada diferença estatística significativa entre as subpopulações caso e controle. A fim de se avaliar as variáveis epidemiológicas entre os grupos foram utilizadas tabelas de contingência para associar os casos e os controles.

O teste *qui-quadrado de Fisher* ou o teste *qui-quadrado de Pearson* foi adotado para testar a significância estatística da associação entre tais variáveis. Os dados da pesquisa foram tratados na versão 17.0 do *Statistic Package for the Social Sciences* (SPSS). Em todas as medidas estatísticas utilizadas foram considerados níveis de significância de $p < 0,01$ e $p < 0,05$, representando percentuais de confiança de 99,0% e 95,0%, respectivamente.

A tabela 5 resume todos os aspectos sobre as características dos pacientes amostrados quanto às suas características particulares e também aos hábitos de vida. Pelo cálculo de comparação entre os grupos observou-se que nenhum desses itens sozinhos foi de fato capaz de conferir maior nível de suscetibilidade do indivíduo com relação a doença avaliada, não sendo nenhuma das análises, estatisticamente significativa.

Observa-se que mesmo itens sabidamente agressivos como o uso do álcool, de tabaco e de drogas mostraram-se não significativos para a nossa amostra.

Nota-se também que para o item histórico de câncer na família, a relação foi totalmente indiferente para os grupos comparados.

Tabela 5: Distribuição dos grupos em suas respectivas características

Variável	Grupos				Valor de P
	Controles		Casos		
	N	%	N	%	
Tabagismo					
Não	76	38.0%	32	29.1%	0.135
Sim	124	62.0%	78	70.9%	
Etilismo					
Não	38	19.0%	18	16.4%	0.644
Sim	162	81.0%	92	83.6%	
Origem Geográfica					
Norte	2	1.0%	6	5.5%	0.094
Nordeste	27	13.5%	17	15.5%	
Sudeste	166	83.0%	85	77.3%	
Centro-Oeste	0	0.0%	1	0.9%	
Sul	2	1.0%	1	0.9%	
Outros	3	1.5%	0	0.0%	
Nível de Escolaridade					
Analfabeto	1	0.5%	0	0.0%	0.204
1º grau incompleto	65	32.5%	45	40.9%	
1º grau completo	59	29.5%	19	17.3%	
2º grau incompleto	12	6.0%	4	3.6%	
2º grau completo	33	16.5%	19	17.3%	
Técnico	10	5.0%	10	9.1%	
Superior	19	9.5%	13	11.8%	
Superior incompleto	1	0.5%	0	0.0%	
Etnia					
Branca	101	50.5%	66	60.0%	0.264
Parda/Mulata	65	32.5%	30	27.3%	
Negra	34	23.5%	14	12.7%	
Histórico de câncer					
Não	108	54.0%	60	54.5%	1.000
Sim	92	46.0%	50	45.5%	
Consumo de Drogas					
Não	192	96.0%	105	95.5%	0.776
Sim	8	4.0%	5	4.5%	
Total	200	100.0%	110	100.0%	

Os gráficos a seguir expressam as características da população por item avaliado. Com base nesses valores pode-se dizer que a nossa população amostrada era basicamente nativa da região Sudeste do Brasil (figura 15), principalmente do Rio de Janeiro e região metropolitana, seguida dos que nasceram na região Nordeste, sendo que isso foi uma constante tanto entre casos como para os controles. Três dos controles eram nascidos em países da Europa, mas vieram para o Brasil e moravam na região Sudeste há no mínimo quinze anos.

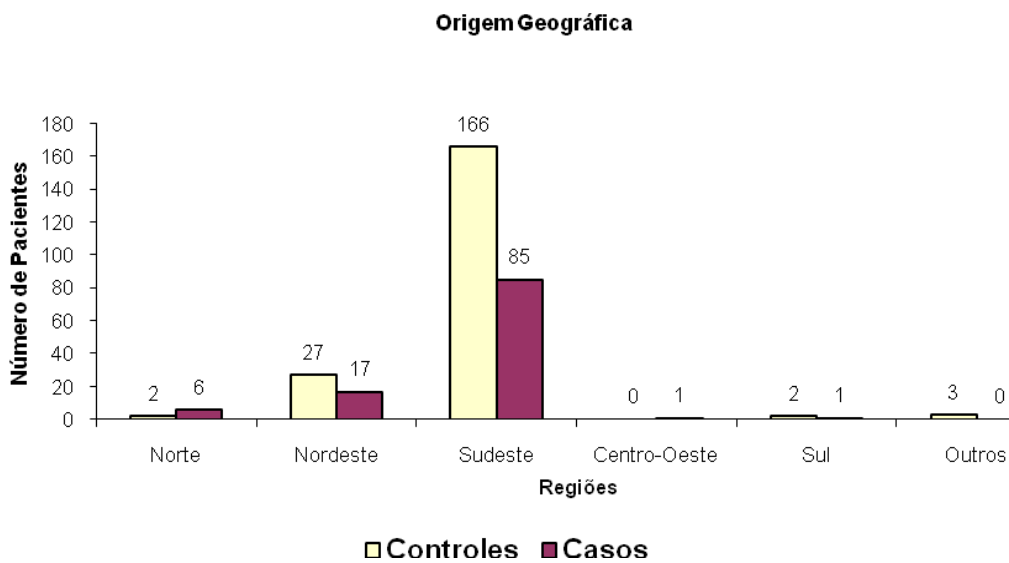


Figura 15: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação a origem geográfica.

A população amostrada de uma maneira geral apresentou um nível de escolaridade intermediário. A maioria dos casos e controles estudou somente até o primeiro grau, embora o número dos que concluíram o ensino médio e o superior também tenha sido representativo. Todas as categorias observadas apresentaram pelo menos um paciente incluído (figura 16).

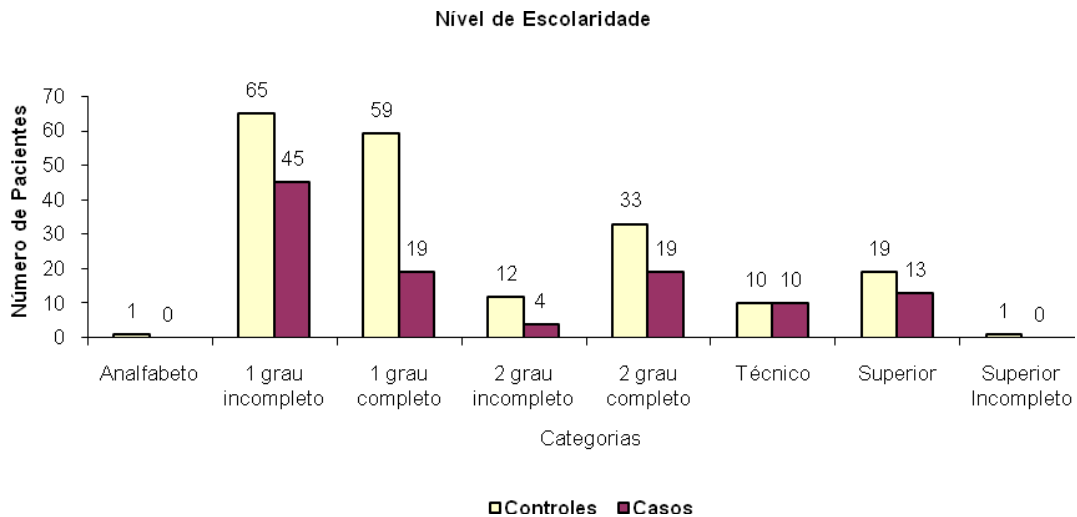


Figura 16: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao nível de escolaridade.

Quanto às características étnicas (figura 17), a maior parte da população amostrada se autodeclarou branca, tanto caso quanto controles, seguida das denominações pardo/mulato e negro. Não foi amostrado nenhum paciente de origem indígena ou que tivesse alguma ascendência oriental.

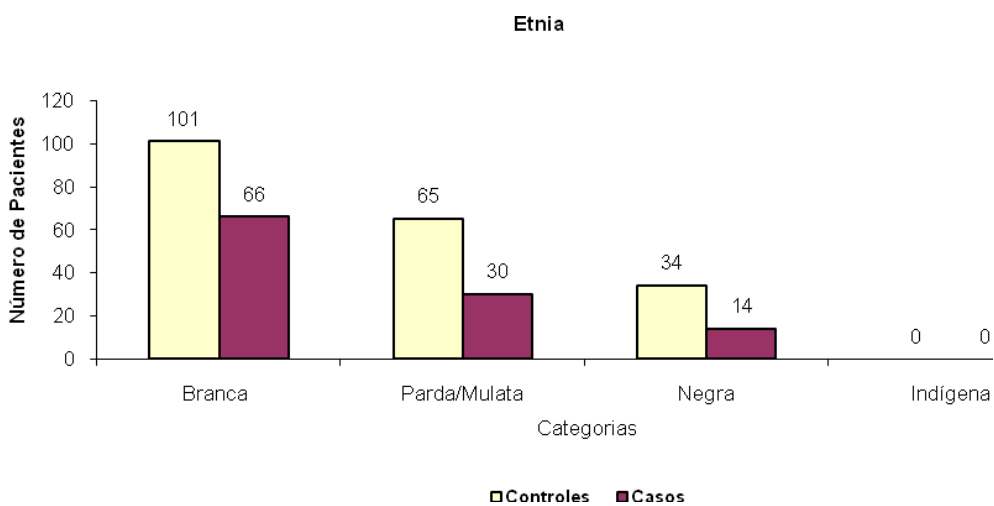


Figura 17: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação a etnia.

Outra característica intrínseca amostrada foi o histórico de câncer na família (figura 18), para o qual, nenhuma diferença estatística entre as populações caso e controle foi observada. Nota-se que os valores são bem próximos para ambas as categorias.

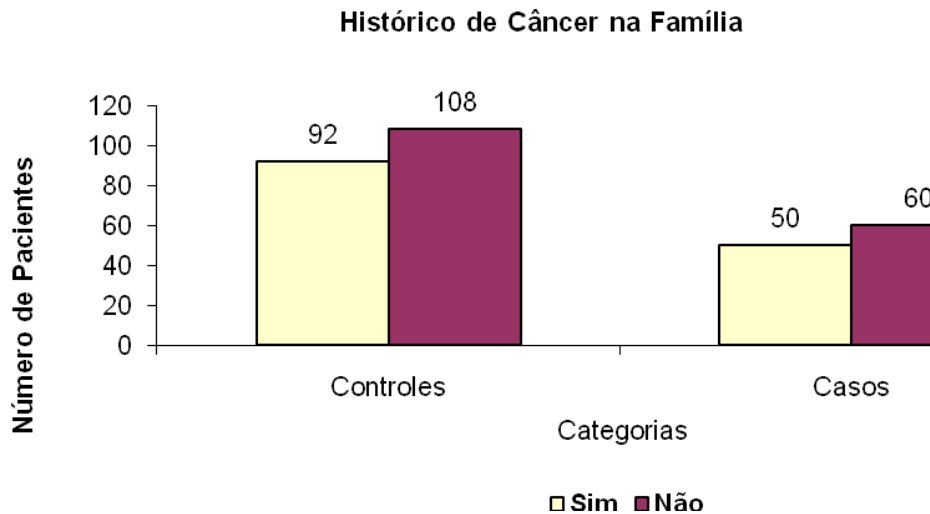


Figura 18: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em ao histórico de câncer na família.

Juntamente com os caracteres intrínsecos buscou-se analisar também o nível de relevância dos fatores de exposição a agentes agressores para o risco de desenvolvimento da doença, com isso caracterizou-se o perfil da amostra em questão. Para o fator consumo de drogas (figura 19), não se obteve relação significativa, haja vista o baixo número de casos positivos entre a amostra total. Para ambos os casos, a grande parte do grupo não se podia avaliar quanto a este item.

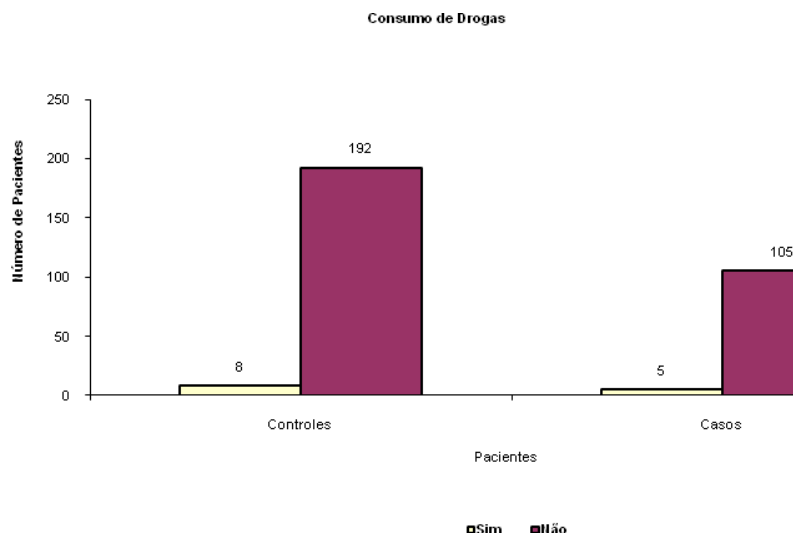


Figura 19: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao consumo de drogas.

Outros fatores de exposição com consumo de tabaco e álcool não apresentaram diferenças entre os grupos, sendo que a maioria da população amostrada fazia uso tanto do tabaco quanto do álcool (figuras 20 e 21).

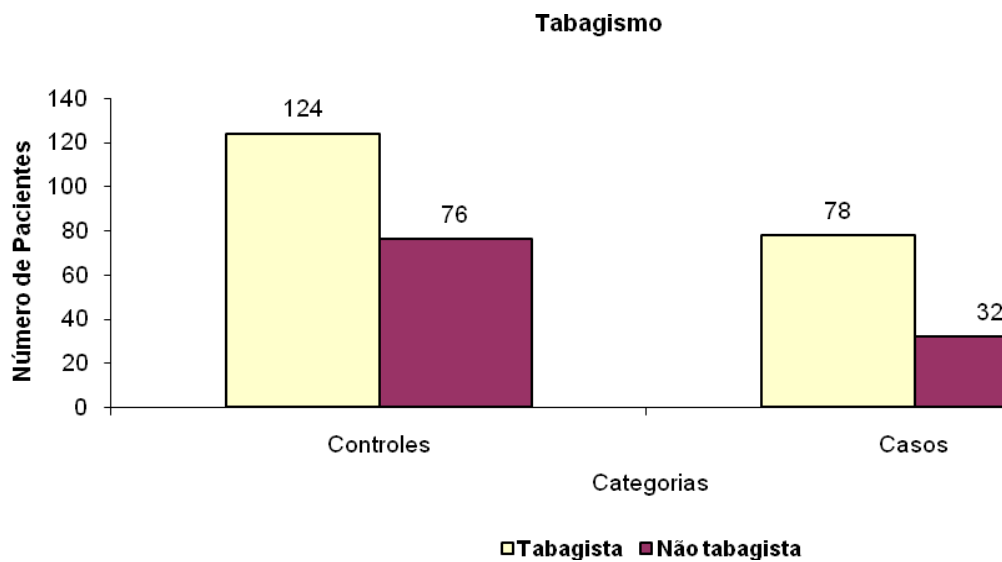


Figura 20: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao consumo de tabaco.

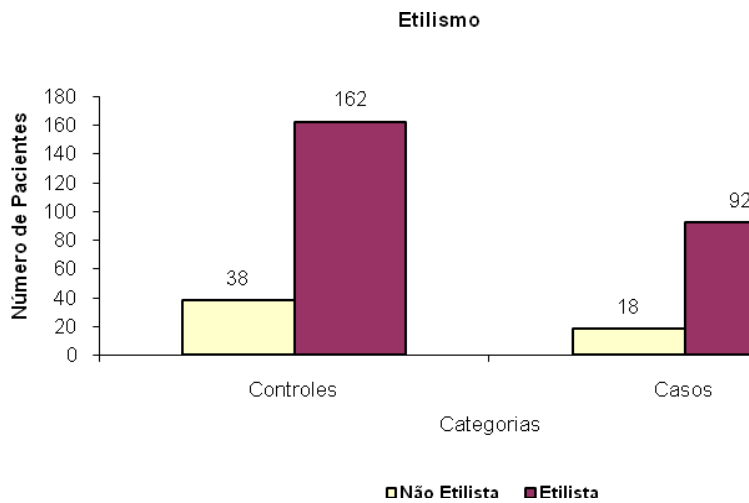


Figura 21: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao consumo de álcool.

Quanto ao levantamento de fatores de risco, os mesmos foram subdivididos em 7 categorias como mostrado na figura 22.

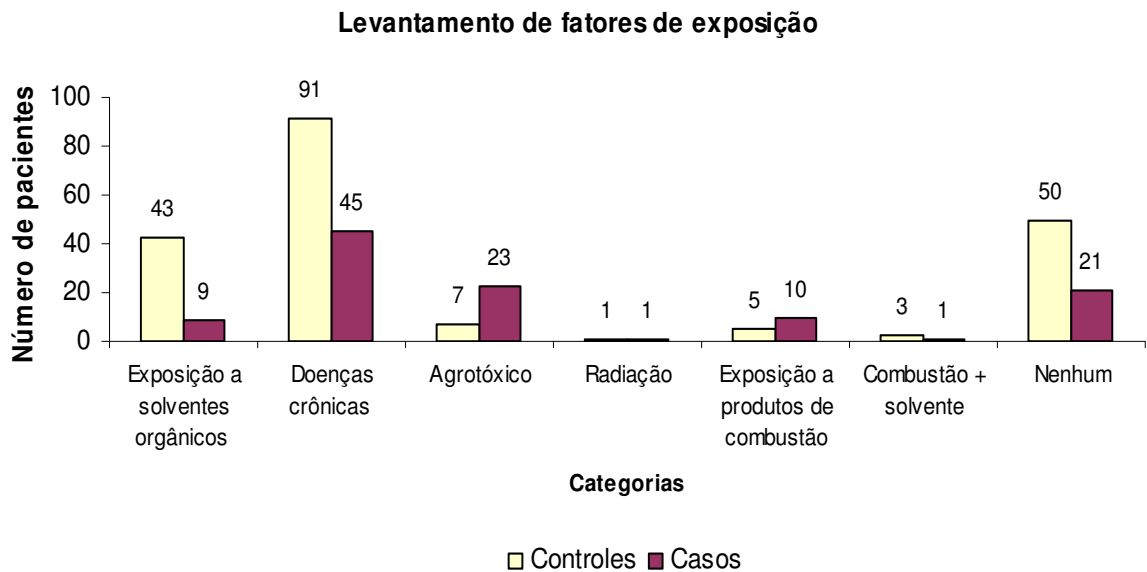


Figura 22: Classificação e distribuição dos casos e dos controles, em relação ao levantamento de exposição aos fatores de risco.

Nota-se que embora grupos como as doenças crônicas e radiação não

apresentaram nenhuma diferença, os itens agrotóxicos e exposição a produtos de combustão tiveram um peso relevante na caracterização amostral. Na tabela 6 apresentada mais adiante, é mostrada a análise estatística feita sobre a compilação dessa informação.

Embora cada item avaliado não sugira muita diferença entre os grupos, a análise estatística dos dados demonstrou que os fatores de risco em relação aos grupos (casos controle) são distintos, pois o p-valor é menor que 0,05. Vale observar que os percentuais são próximos em várias categorias, com exceção dos agrotóxicos, em que 21,1% do grupo caso está neste grupo, enquanto que 3,5% dos controles estão nesta categoria.

Na análise estatística o valor de P é em relação ao fator de risco e considera todas as categorias juntas, não avaliando os dados isoladamente. A lógica do teste é avaliar a suposição de que as proporções são iguais em todas as categorias, ou pelo menos uma é diferente, e nesse caso, foi o que aconteceu; A proporção da variável agrotóxico é a diferente, tendo valor significativamente maior sobre as outras de formas de exposição (solventes, doenças crônicas, exposição a produtos de combustão), e atribuindo a categoria fator de risco um peso estatístico na comparação entre as populações caso e controle.

Tabela 6: Distribuição dos grupos nas sub-categorias de fatores de risco

Variável	Grupos				p-valor
	Controles		Casos		
	N	%	N	%	
Fatores de Risco					
Exposição a solventes orgânicos	43	21.3%	9	8.3%	
Doenças crônicas	91	45.7%	45	41.3%	
Agrotóxicos	7	3.5%	23	21.1%	P<0.001
Exposição a produtos de combustão	5	2.5%	10	9.2%	
Combustão + solvente	3	1.5%	1	0.9%	
Nenhum	50	25.2%	21	19.2%	
Total	199	100.0%	109	100.0%	

Nota: p-valor: nível descritivo do teste qui-quadrado (Pearson)

Os dois pacientes que não estão incluídos são referentes aos dados de radiação, no qual um foi do grupo caso e outro do grupo controle. Contudo, esta amostragem não foi

compilada estatisticamente por não ser representativa nem tão pouco diferencial.

5.2 Identificação dos Polimorfismos

5.2.1 Análises dos SNPs dos genes *XPD*, *RAD51* e *APE1*

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos em *XPD*, *RAD51* e *APE1* na nossa amostra de estudo são resumidas na tabela 7. As frequências genotípicas observadas para a população total mostraram ser consistentes com o que era esperado para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg para os três loci polimórficos estudados.

É observado um valor de P de diferença estatisticamente não significativa para os três genes estudados, o que indica que não houve diferença estatística entre o que era esperado e o que foi observado nas três comparações, o que nos leva a dizer que a população está em teoria de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, logo, é apropriada para o estudo por não apresentar nenhum viés tendencioso. Contudo, quando os casos e os controles são avaliados isoladamente, como duas sub-populações, observa-se que há um desvio de desequilíbrio para o gene *APE1* nas duas situações, mostrando que apesar de na população total os três genes estarem em equilíbrio, *APE1* não apresenta ter uma boa amostragem, pois como não segue a teoria do equilíbrio proposto por Hardy-Weinberg, não representa de forma fidedigna a distribuição o polimorfismo na população.

Tabela 7: Distribuição genotípica e alélica de *XPD*, *RAD51* e *APE1* na população total analisada

Genótipo	Total (%)	Frequência alélica		Teste de HWE
		selvagem	variante	
<i>XPD</i>	n=310 (%)	(A)	(C)	
A/A	155 (50,0)			
A/C	123 (39,6)	0,7	0,3	P=0,345
C/C	32 (10,3)			
<i>RAD51</i>		(G)	(C)	
G/G	241 (77,7)			
G/C	64 (20,6)	0,88	0,12	P=0,788
C/C	5 (1,6)			
<i>APE1</i>		(T)	(G)	
T/T	180 (58,0)			
T/G	117 (37,7)	0,77	0,23	P=0,337
G/G	13 (4,19)			

Tabela 8: Distribuição genotípica e alélica de *XPD*, *RAD51* e *APE1* no grupo controle

Genótipo	Total (%)	Frequência alélica		Teste de HWE
		selvagem	variante	
<i>XPD</i>	n=200 (%)	(A)	(C)	
A/A	115 (57,5)			
A/C	68 (34,0)	0.745	0.255	P=0,138
C/C	17 (8,5)			
<i>RAD51</i>		(G)	(C)	
G/G	157 (78,5)			
G/C	40 (0,2)	0.885	0.115	P=0,729
C/C	3 (1,5)			
<i>APE1</i>		(T)	(G)	
T/T	114 (57,0)			
T/G	84 (42,0)	0.78	0.22	P=0,0008
G/G	2 (1,0)			

Tabela 9: Distribuição genotípica e alélica de *XPB*, *RAD51* e *APE1* nos casos

Genótipo	Total (%)	Frequência alélica		Teste de HWE
		selvagem	variante	
<i>XPB</i>	n=110 (%)	(A)	(C)	
A/A	40 (36,4)			
A/C	55 (0,5)	0.614	0.386	P=0,688
C/C	15 (13,6)			
<i>RAD51</i>		(G)	(C)	
G/G	84 (76,4)			
G/C	24 (21,8)	0.873	0.127	P=0,683
C/C	2 (1,8)			
<i>APE1</i>		(T)	(G)	
T/T	66 (60,0)			
T/G	33 (0,3)	0.75	0.25	P=0,041
G/G	11 (10,0)			

Desta forma, quando avaliamos a população total, as frequências para o gene *XPB* nos genótipos A/A, A/C e C/C foram 0,5, 0,396 e 0,103, respectivamente. Para o alelo selvagem (A) e o alelo variante (C) as frequências foram 0,70 e 0,30, respectivamente. Para o gene *RAD51* as frequências genotípicas de G/G, G/C e C/C foram 0,777, 0,206 e 0,016, respectivamente. As frequências para o alelo G (selvagem) e o alelo C (variante) foram 0,88 e 0,12, respectivamente.

Finalmente, para o gene *APE1*, a frequência para os genótipos T/T, T/G, e G/G foram 0,580, 0,377 e 0,0419, respectivamente. As frequências para o alelo T (selvagem) e o alelo G (variante) foram 0,77 e 0,23, respectivamente. E assim sucessivamente, para casos e controles.

A distribuição da quantidade de pacientes casos e controles por genótipo é representada na tabela 10. Observa-se que para os genes *RAD51*, *APE1*, *XPB+APE1*, *RAD51+APE1* e *XPB+RAD51+APE1* não foi encontrada nenhuma associação positiva entre a presença desses polimorfismos que conferem e o risco de se desenvolver a

neoplasia em questão.

Já para os genes *XPD*, e *XPD+RAD51* foi encontrada correlação positiva entre a presença do polimorfismo e o risco para a doença. Sendo que, para *XPD* (OR = 2.36 CI 95% 1.46–3.84) o valor de $P < 0.001$ e para *XPD+RAD51* o valor de $P < 0.05$ (OR = 3.40 CI 95% 1.32 – 9.20).

Essa relação estatisticamente significativa entre genes de vias distintas nos remete à compensação das mesmas, onde as proteínas codificadas podem atuar em mais de uma via de reparo. Em contrapartida, quando analisamos os pacientes polimórficos para os três genes de estudo, observa-se não relação ao risco, com um valor de $P = 0,831$ 1.43 (0.34 – 5.07). Os valores matemáticos da combinação entre os genes nos levam a pensar no fato de que embora o aumento das disfunções e/ou mutações nas células comprometam seu desempenho final podendo culminar no aumento da taxa de risco para o desenvolvimento de uma doença, por exemplo, observa-se também que o aumento exagerado dessas alterações não induz a mesma resposta, uma vez que as células tendem a sofrer apoptose.

Quanto à combinação de alelos variantes nos genes *XPD*, *RAD51* e *APE1*, observou-se que nenhum dos pacientes amostrados acumulou mais de um alelo variante. Havia sim casos de pacientes com baixa capacidade de reparo por possuir alelos heterozigotos para mais de um gene, mas em pacientes com genótipo variante isso não aconteceu. A tabela 10 ilustra bem os valores encontrados para cada uma dessas análises.

Tabela 10: Frequência genotípica dos genes *XPD*, *RAD51* e *APE1* em 110 casos de câncer de próstata e 200 controles

Genótipo		Pacientes		Controles		OR (95% CI)
		N	%	N	%	
<i>XPD</i>	A/A (Lys/Lys)	40	36,36	115	57,50	2.36 (1.46 – 3.84) P<0.001
	A/C (Lys/Gln)	55	50	68	34,00	
	C/C (Gln/Gln)	15	13,63	17	8,50	
	C/C e A/C	70	63,64	85	42,50	
<i>RAD51</i>	G/G	84	76,36	157	78,50	1.13 (0.64 – 1.96) P=0.766
	G/C	24	21,81	40	20,00	
	C/C	2	1,8	3	1,50	
	C/C e G/C	26	23,64	43	21,50	
<i>APE1</i>	T/T (Asp/Asp)	66	60	114	57,00	0.88 (0.55 – 1.42) P=0.696
	T/G (Asp/Glu)	33	30	84	42,00	
	G/G (Glu/Glu)	11	10	2	1,00	
	G/G e T/G	44	40	86	43,00	
<i>XPD e RAD51</i>	Genótipo sem risco <i>XPD</i> : A/A e <i>RAD51</i> : G/G	11	37.93	34	68.00	3.40 (1.32 – 9.20) P<0.05
	Genótipo com risco <i>XPD</i> : C/C ou A/C e <i>RAD51</i> : C/C ou G/C	18	62.07	16	32.00	
<i>RAD51 e APE1</i>	Genótipo sem risco <i>RAD51</i> : G/G e <i>APE1</i> : T/T	30	78.95	29	76.32	0.86 (0.28 - 2.60) P=1.000
	Genótipo com risco <i>RAD51</i> : C/C ou G/C e <i>APE1</i> : G/G ou T/G	8	21.05	9	23.68	
<i>XPD e APE1</i>	Genótipo sem risco <i>XPD</i> : A/A e <i>APE1</i> : T/T	5	15.63	14	30.43	2.30 (0.76 – 8.08) P=0.216
	Genótipo com risco <i>XPD</i> : C/C ou A/C e <i>RAD51</i> : C/C ou G/C	27	84.38	32	69.57	
<i>XPD, RAD51 e APE1</i>	Genótipo sem risco <i>XPD</i> : A/A e <i>RAD51</i> : G/G e <i>APE1</i> : T/T	18	81.82	57	86.36	1.43 (0.34 – 5.07) P=0.831
	Genótipo com risco <i>XPD</i> : C/C ou A/C e <i>RAD51</i> : C/C ou G/C e <i>APE1</i> : G/G ou T/G	4	18.18	9	13.64	

5.2.2 Análises dos polimorfismos em relação aos critérios dos marcadores biológicos

Com relação às medidas padrões usadas para diagnóstico foram analisados tanto os genes individualmente como suas combinações. Os valores encontrados são descritos na tabela 11. As probabilidades de ocorrência de resultados falso-positivos (FP) também foram calculadas e podem ser expressas com relação a especificidade como $FP = 1 - \text{especificidade}$. Dado isto, tem-se que os valores para os genótipos foram: para *XPD*, de 42,5% (35,85% – 49,43%); para o genótipo *RAD51*, de 21,5% (16,37% - 27,7%); para o genótipo *APE1*, de 43% (36,33% - 49,93%); para o genótipo *XPD+RAD51*, de 32% (20,76% - 45,81%); para o genótipo *XPD+APE1*, de 69,57% (55,19% - 80,92%); para o genótipo *RAD51+APE1*, de 23,68% (12,99% - 39,21%) e para o genótipo *XPD+RAD51+APE1*, de 13,64% (7,34% - 23,93%).

Tabela 11: Dados de desempenho de teste diagnóstico com base em cada gene e suas combinações

Medidas de Diagnóstico	Índices de probabilidade						
	<i>XPD</i>	<i>RAD51</i>	<i>APE1</i>	<i>XPD+RAD51</i>	<i>XPD+APE1</i>	<i>RAD51+APE1</i>	<i>XPD+RAD51+APE1</i>
Sensibilidade	63.64 [54.33-72.02]	23.64 [16.67-32.38]	40.00 [31.33-49.34]	62.07 [44.00-77.31]	84.38 [68.25-93.14]	21.05 [11.07-6.35]	18.18 [7.31-38.52]
Especificidade	57.50 [50.57-64.15]	78.50 [72.30-83.63]	57.00 [50.07-63.67]	68.00 [54.19 -79.24]	30.43 [19.08-44.81]	76.32 [60.79-87.01]	86.36 [76.07-92.66]
Valor Preditivo Positivo (%)	45.16 [37.54-53.02]	37.68 [27.18-49.48]	33.85 [26.28-42.34]	52.94 [36.74-68.55]	45.76 [33.70-58.34]	47.06 [26.17-69.04]	30.77 [12.68-57.63]
Valor Preditivo Negativo (%)	74.19 [66.78-80.44]	65.15 [58.93-70.88]	63.33 [56.08-70.03]	75.56 [61.33-85.76]	73.68 [51.21-88.19]	49.15 [36.84-61.56]	76.00 [65.22-84.25]
Acurácia do teste	59.68 [54.13-64.99]	59.03 [53.48-64.36]	50.97 [45.43-56.49]	65.82 [54.85 -75.33]	52.56 [41.62-63.26]	48.68 [37.78-59.71]	69.32 [59.04-77.98]

5.2.3 Análise dos polimorfismos estudados em relação aos parâmetros de agressividade do tumor nos pacientes com câncer de próstata

Em nossa análise o valor do PSA foi obtido para 79 pacientes e variou de 0,78 ng/mL a 38,0 ng/mL (mediana: $7,2 \pm 5,43$ ng/mL). Na tabela 12 são mostrados os valores categorizados de PSA.

Tabela 12: Valor de PSA de 79 dos 110 pacientes amostrados

PSA categorizado dos pacientes (n = 79)	
PSA (ng/ml)	Número de indivíduos (%)
0 - 2,5	6 (7,5%)
2,51 – 3,5	5 (6,3%)
3,51 – 4,9	13 (16,4%)
> 5,00	55 (69,6%)
Total	79 (100%)

De posse do fato de que a região polimórfica para o gene *XPD* pode colaborar para a suscetibilidade do câncer de próstata, foi feita uma correlação entre a idade e os critérios clínicos como o PSA e Grau de Gleason para os pacientes que apresentaram polimorfismo variante (homozigotos recessivos) para este gene. No nosso estudo, 15 pacientes foram variantes para *XPD* e de acordo com a clínica observou-se que a média de PSA foi de 6,35, o que não é um valor muito alto para a média de idade obtida (62,06 anos, cujo o PSA normal é de até 5,0). A mediana foi calculada para o índice de Gleason e obteve-se o valor 6, que equivale a um padrão novamente intermediário para Gleason.

Posto isso, nota-se que para a nossa amostra os valores de PSA estavam dentro do padrão esperado, mostrando que apesar da baixa especificidade este ainda é um bom marcador. Contudo, o gene em questão pode até ter relação com o risco aumentado para a doença (*XPD*), mas em pouco pode auxiliar no critério de prognóstico.

Com relação ao índice histológico de Gleason a maioria dos pacientes se encaixou nos índices de 2-6, nível baixo e intermediário. Para nenhum dos três polimorfismos o número de pacientes com Gleason de 7-10 (mau prognóstico) prevaleceu e relação ao índice de 2-6 (tabela 11).

Observa-se que apenas a categoria de pacientes polimórficos para o gene *XPB* o número de pacientes polimórficos foi superior quando comparado com os de genótipo selvagens. Contudo, pouco pode se tirar a partir desses dados. Para qualquer inferência maior teríamos que ter uma amostra de número mais expressivo.

Tabela 13: Relação do perfil histológico de Gleason por polimorfismo estudado

Genótipo	Grau Histológico (N)		
	Gleason 2-6 (N= 57)	Gleason (7-10) (N=28)	
<i>XPB</i>	A/A	22 (38,6%)	10 (35,7%)
	A/C + C/C	35 (61,4%)	18 (64,3%)
		P=0,796	
<i>RAD51</i>	G/G	42 (73,7%)	24 (85,7%)
	G/C + C/C	15 (26,3%)	4 (14,3%)
		P=0,211	
<i>APE1</i>	T/T	34 (59,6%)	15 (53,6%)
	T/G + G/G	23 (40,4%)	13 (46,4%)
		P=0,594	

5.2.4 Análise do polimorfismo para o gene *XPB* com relação as variáveis de exposição de risco

Tendo em vista que quando analisados isoladamente, tanto os fatores de risco (categoria exposição a agrotóxicos) quanto o polimorfismo do gene *XPB* parecem ser fator de risco para o desenvolvimento da neoplasia, julgou-se interessante ver se a relação do polimorfismo em *XPB* com as variáveis de exposição a risco, concomitantemente, apresentariam alguma relação positiva. Contudo, observou-se que esses itens são pontuais e não cumulativos, pois suas ações são independentes. Em todas as nossas comparações o

cálculo do valor de P mostrou-se não significativo.

Tabela 14: Relação do polimorfismo em *XPB* com as variáveis de exposição a risco

Variável	<i>XPB</i> Lys751Gln (heterozigoto e variante) N de pacientes	Selvagem	P-valor	OR (CI 95%)
Consumo de tabaco				
sim	49	31	0.506	0,679
não	21	9		(0,241 - 1,795)
Consumo de bebida alcoólica				
sim	58	35	0.593	0,692
não	12	5		(0,175 - 2,338)
Câncer na família				
sim	31	19	0.843	0,879
não	39	21		(0,375 - 2,064)
Etnia				
branca	38	25		0,720
parda/mulata	24	11	0.699	(0,331 - 1,565)
negra	8	4		
Consumo de drogas				
sim	2	2	0.621	0,562
não	68	38		(0,039 - 8,041)
Exposição a agrotóxico				
sim	15	9	1.000	0,939
não	55	31		(0,337 - 2,739)
Exposição a produto de combustão				
sim	5	7		0,366
não	65	33	0.116	(0,084 - 1,457)
Total	70 (63%)	40 (36%)	110 (100%)	

5.2.5 Contextualização da população brasileira no panorama Internacional

Na análise comparativa no padrão Internacional pelo banco de dados *HapMap*, observou-se que para o alelo polimórfico do gene *XPB* (único gene que se mostrou estatisticamente significativo para as nossas análises) a população Brasileira apresenta uma diferença estatística significativa em relação às populações Chinesa (CHB) e Japonesa (JPT), calculada pelo teste qui-quadrado de *Pearson* (Tabela 13). A frequência do alelo variante variou de 0,076 da população Japonesa (JPT) a 0,358 da população dos

Índios nativos da América (GIH).

Na tabela 15 são mostradas as frequências alélicas e genotípicas para o *locus* polimórfico do gene *XPD* e a contextualização das informações da população brasileira com os dados disponíveis no banco *HapMap* (www.hapmap.org).

O teste qui-quadrado de Pearson foi feito para mais de 5% de significância, com isso observou-se que exceto as populações Japonesa (JPT) e Chinesa (CHB), as demais não foram significativamente diferentes da Brasileira.

Tabela 15: Frequência alélica e genotípica do polimorfismo em XPD e comparação da população Brasileira com dados do *HapMap*.

Frequência genotípica e alélica de XPD na amostra analisada											P-Valor de χ^2 de Pearson na comparação do Genótipo entre a população Brasileira e as populações HapMap
POPULAÇÃO	GENÓTIPO						FREQUENCIA ALÉLICA				
	genótipo	frequencia (Nb)	genótipo	frequencia (Nb)	genótipo	frequencia (Nb)	alelo selvagem	frequencia	alelo variante	frequencia	
CEU (n= 113)	T/T	0.407 (46)	G/T	0.522 (59)	G/G	0.071 (8)	T	0.668	G	0.332	0.065
CHB (n=84)	T/T	0.798 (67)	G/T	0.202 (17)	G/G	0.0 (0)	T	0.899	G	0.101	<0.001
GIH (n=88)	T/T	0.398 (35)	G/T	0.489 (43)	G/G	0.114 (10)	T	0.642	G	0.358	0.228
JPT (n=86)	T/T	0.860 (74)	G/T	0.128 (11)	G/G	0.012 (1)	T	0.924	G	0.076	<0.001
Sind (n=255)	T/T	0.51 (130)	G/T	0.408 (104)	G/G	0.082 (21)	T	0.71	G	0.29	0.698
Nind (n=209)	T/T	0.435 (91)	G/T	0.46 (96)	G/G	0.105 (22)	T	0.665	G	0.335	0.322
Eind (n=388)	T/T	0.49 (190)	G/T	0.407 (158)	G/G	0.103 (40)	T	0.69	G	0.31	0.959
MAH (n=215)	T/T	0.512 (110)	G/T	0.377 (81)	G/G	0.111 (24)	T	0.7	G	0.3	0.883
Brazil (n=310)	T/T	0.50 (155)	G/T	0.396 (123)	G/G	0.103 (32)	T	0.7	G	0.3	—

Legenda:

CEU: Para residentes Utah com ancestralidade do Norte e Oeste Europeu, dados da coleção CEPH.

CHB: Para a população Han, chineses de Pequim.

GIH: Para a comunidade Gujarati, de Índios Nativos de Houston, Texas

JPT: Para a população Japonesa de Tokio, Japão.

Sind: Para a população do Sul da Índia (Vettrisselvi *et al.*, 2007).

Nind: Para a população do Norte da Índia (Gangwar *et al.*, 2009).

Eind: Para a população de Calcutá, Leste da Índia (Majumder *et al.*, 2007).

MAH: Para a população Maharastrian residente em Vidarbha região central da Índia.

6. Discussão

Nos últimos anos as principais áreas de investigação sobre o câncer de próstata têm se concentrado em três pontos principais. São eles: A compreensão do estilo de vida/fatores ambientais/dieta que influenciam a carcinogênese da próstata, a identificação de estratégias para atrasar o início e a progressão da doença; A identificação de biomarcadores para distinguir as formas indolentes das formas agressivas da doença; O desenvolvimento de uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de próstata resistente a andrógeno, bem como a prevenção das metástases ósseas (Shen *et al.*, 2010).

Neste contexto o presente estudo presta apenas uma modesta contribuição para a construção do conhecimento sobre o perfil de uma amostra da população Fluminense na tentativa de poder contextualizá-la e poder tecer algumas considerações sobre seu perfil molecular e de suscetibilidade.

A opção de realizar esta pesquisa envolvendo os polimorfismos em genes de reparo associados com a suscetibilidade ao câncer de próstata advém do pouco conhecimento sobre este segmento na população brasileira e sua importância da contextualização na problemática distinção entre os tipos de tumores. Sendo assim, neste estudo investigou-se a hipótese dos polimorfismos *XPD* (Lys751Gln), *RAD51* (G135C) e *APE1* (Asp148Glu) estarem relacionados à suscetibilidade ao câncer de próstata, analisando o perfil genotípico desses genes em uma amostra caso-controle do Rio de Janeiro. Também foi avaliado se estes polimorfismos têm alguma influência na agressividade do tumor no momento do diagnóstico.

De uma maneira geral, as investigações epidemiológicas têm sugerido que a dieta associada aos fatores de hábitos de vida é um dos maiores colaboradores para as diferenças populacionais no que tange a ocorrência do câncer de próstata em sua forma clínica mais grave (Kolonel 2001). Contudo, os mecanismos moleculares, ou seja, as bases que norteiam esse mecanismo de progressão da doença dentro dessas populações diferentes não são esclarecidas.

Um número considerável de trabalhos tem sustentado a ideia de que a dieta adicionada aos fatores ambientais e aos hábitos de vida afeta a incidência de câncer de próstata pela promoção de inflamações crônicas e/ou estresse oxidativo que culminam com o dano genético, modificações epigenéticas e outras perturbações celulares que

resultam na iniciação do processo neoplásico (DeMarzo *et al.*, 2007).

O único fator de risco que por si só já é significativo para o desenvolvimento do câncer de próstata é o envelhecimento. Enquanto homens com menos de 40 anos tem uma chance de 1/10.000 de desenvolver a doença, esse risco aumenta para 1/7 para homens com 60 anos (ACS, 2012). Contudo, o câncer de próstata não é simplesmente fruto do envelhecimento já que a incidência dos casos varia consideravelmente entre as diferentes populações. É cabível se pensar que a relação do câncer de próstata com a idade avançada reflete provavelmente a interação do ambiente, influências fisiológicas e moleculares que juntamente com o envelhecimento normal presumivelmente exacerbam os efeitos dessas influências.

Apesar do fato da etiologia do câncer ainda não ser totalmente conhecida, alguns fatores são unanimidade no assunto, como a idade, o metabolismo de hormônios andrógenos e “*background*” genético do indivíduo (Gsur *et al.*, 2004).

Neste estudo avaliamos um panorama geral sobre hábitos de vida e fatores de exposição que poderiam interferir no desenvolvimento de alguma patologia, que no nosso caso era o câncer de próstata. Interessantemente para nenhum item sobre características gerais e hábitos de vida (nível de escolaridade, dieta, etnia, histórico de câncer na família, tabagismo, alcoolismo e consumo de drogas) pode ser correlacionado de forma direta a presença do agente com o desenvolvimento da doença.

O único item que mostrou correlação positiva como risco para a suscetibilidade foi o fator de exposição a agrotóxico, ligado na maioria das vezes ao ambiente de trabalho do paciente. Vários estudos demonstram maior taxa de dano de DNA em indivíduos expostos aos agrotóxicos quando comparados com indivíduos não expostos a essas substâncias. Sabe-se também que a genotoxicidade potencial dos agrotóxicos caracteriza-se por ser um fator de risco primário para efeitos em longo prazo relativos à carcinogênese (Bolognesi *et al.*, 2004). A maioria dos estudos realizados indica que a exposição ocupacional aos agrotóxicos aumenta a taxa de dano de DNA (Bolognesi, 2003). Além disso, o potencial genotóxico varia de acordo com o tempo de duração da exposição (Bull *et al.*, 2006). Foi descrita por Koifman e Meyer (2002) a ocorrência de taxas elevadas de infertilidade e câncer de testículo (hormônio-dependente) em

municípios com níveis altos de produção agrícola nos Estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul. Nosso estudo sugere a relação entre agrotóxicos e câncer de próstata com amostra Brasileira. Como no Rio Grande do Sul há uma grande quantidade de trabalhadores rurais expostos a pesticidas (Pacheco e Hackel, 2002) e observa-se também que é um dos estados do Brasil com maior incidência ao câncer de próstata (INCA, 2011), especula-se que esta relação deve ser melhor investigada.

Partindo do pressuposto que a etiologia do câncer é multifatorial, especula-se que na falta de agentes externos significativamente fortes para serem determinantes no desencadeamento da doença, um peso maior deve ser atribuído ao conteúdo genético que tende a predispor o indivíduo ao desenvolvimento da doença.

Já é bem estabelecido que mutações em genes relacionados à resposta aos danos no DNA são ligados com a suscetibilidade ao câncer tanto em humanos quanto em modelos animais. Alguns exemplos clássicos de defeitos nos processos de reparo associados com a predisposição ao câncer são os erros no reparo de mau emparelhamento com o câncer colorretal, o reparo por excisão de nucleotídeos com o câncer de pele e o reparo através de recombinação homóloga com o câncer de mama e ovário (Hoeijmakers *et al.*, 2001; Sherr, 2004).

Os polimorfismos dos códons 312 e 751 de *XPB* são muito estudados na carcinogênese e, além disso, eles podem influenciar a atividade enzimática *in vitro* (Spitz *et al.*, 2001). No nosso estudo foi investigado o polimorfismo no códon 751 de *XPB* e este foi o único gene da nossa análise que sozinho foi capaz de ser relacionado com o risco de desenvolvimento da doença. Nota-se que a via de reparo por excisão de nucleotídeos, da qual *XPB* faz parte é uma via determinante para a correção de danos causados por agentes ambientais e por espécies reativas de oxigênio (Mitra *et al.*, 2001), importantes fatores relacionados ao câncer de próstata.

Embora nem os genes *RAD51* e *APE1* analisados isoladamente tenham apresentado relação de suscetibilidade para com a doença estudada, quando foram analisados os pacientes duplamente polimórficos para *XPB* e para *RAD51*, obteve-se uma relação positiva de risco para a doença. Isso nos leva a pensar nas relações compensatórias existentes entre as vias de reparo. Embora separadas para fins didáticos,

bem se sabe que existe participação das proteínas envolvidas em mais de uma via. Curiosamente, é o caso de *XPD* e *RAD51*. Em 2002, Aloyz e colaboradores mostraram a associação entre as proteínas *XPD* e *RAD51* atuando na remoção de ligações cruzadas entre cadeias de DNA. Embora naquela época não se soubesse se existia uma interação física direta entre as proteínas *XPD* e *RAD51* ou se ambas apenas faziam parte de um mesmo complexo juntamente com outros fatores, a correlação entre elas na recombinação homóloga já era conhecida, o que inclusive refletia na modulação do efeito da via HRR com a resistência às ligações cruzadas (Aloyz *et al.*, 2002).

Em 2008, Fan e colaboradores mostraram por cristalografia da proteína *XPD* de *Sulfolobus acidocaldarius* (proteína SaXPD), que *XPD* de fato possuía um sítio catalítico para *RAD51*. Esse trabalho mostrou que na sequência de alinhamento de SaXPD todos os domínios da helicase são conservados na *XPD* humana. A estrutura de SaXPD mostrou que o seu núcleo catalítico é composto por quatro domínios: dois domínios RAD51/RecA (HD1 e HD2) com dois domínios adicionais inseridos juntos a HD1. Esses quatro domínios contém 22 dos 26 pontos de mutação conhecidos e que estão relacionados com o surgimento de doenças (*Xeroderma Pigmentosum* (XP), *Síndrome de Cockayne* (CS) e *Tricotiodistrofia* (TTD)).

O papel de *RAD51* no nosso objeto de estudo ainda precisa ser melhor elucidado. Sabe-se que apesar de desempenhar um papel na recuperação de DNAs lesionados, em vertebrados, *RAD51* pode contribuir potencialmente para a instabilidade genômica causada pela hiper-recombinação (Klein, 2008; Orre *et al.*, 2006). Estudos desenvolvidos por Schild and Wiese (2010) sugerem que os níveis aumentados de *RAD51* em tumores com defeitos iniciais na recombinação homóloga limitam a instabilidade genômica durante a progressão carcinogênica.

O polimorfismo G135C de *RAD51* está numa região 5'UTR do gene e embora não seja traduzida é uma região importante, pois pode afetar a estabilidade do mRNA e a eficiência translacional já que altera os níveis finais de sua proteína (Gray, 1998). As regiões promotoras e os "*enhancers*" são super importantes no controle da expressão gênica e devido a isso mutações e polimorfismos nessas regiões podem acometer a funcionalidade gênica. Mutações em sítios de ligação para fatores de transcrição nas

regiões promotoras podem levar à redução transcricional de genes, como observado por Niimi e colaboradores em um estudo relacionando mutação no promotor do gene *UGRP1* com menor transcrição do mesmo e maior risco a asma (Niimi *et al.*, 2002). Assim também, Lettice e colaboradores, demonstraram que a polidactilia preaxial resulta de mutações de ponto em região reguladora "*enhancer*" do gene *Shh*, concluindo que mutações de ponto nestas regiões são capazes de causar anormalidades congênitas (Lettice *et al.*, 2003). Apesar do fundamento de que o polimorfismo em *RAD51* pode ser importante para o desencadeamento da neoplasia, com base nos nossos estudos, não se pode dizer que ele tem relação com a suscetibilidade ao câncer de próstata.

Em estudo feito com a população Brasileira (Kuasne *et al.*, 2011) foi mostrado que o polimorfismo em *APE1* Asp148Glu poderia contribuir para a suscetibilidade genética ao câncer de próstata. Em um estudo de meta-análise feito com 12.432 casos e 17.349 controles (Gu *et al.*, 2009) foi visto que os genótipos TG e GG/TG estão associados com o aumento do risco para desenvolvimento de vários tipos de câncer, principalmente o coloretal. Com isso, dado o importante papel de *APE1* nas múltiplas funções biológicas tal como transcrição gênica e reparo de DNA, é biologicamente plausível entender que esse polimorfismo pode modular o risco para vários tipos de câncer. No presente estudo, os índices de suscetibilidade não foram encontrados, o que pode ser explicado por vários fatores inclusive as diferenças genéticas entre as populações amostradas.

Não há dúvidas de que tumores carregam um amplo número de alterações genéticas (Stoler *et al.*, 1999) e que a sucessão de mudanças genéticas são necessárias para se atingir o câncer maduro (Vogelstein e Kinzler, 1993). Neste trabalho foi feita uma simulação de acordo com os parâmetros utilizados para o teste estatístico feito para se usar um marcador biológico. Sabe-se que um marcador biológico é um componente celular, estrutural e bioquímico, que pode definir alterações celulares e moleculares tanto em células normais quanto naquelas associadas à transformação maligna. E se os nossos genes de estudo fossem vistos como marcadores, poderiam servir de indicativo? Sabe-se que um marcador biológico ideal apresenta alta sensibilidade e alta especificidade, a fim de que possa caracterizar precisamente a doença.

No nosso estudo observou-se para o gene *XPD* valores bastante intermediários quanto aos critérios analisados. Já para a combinação entre *XPD* e *RAD51* os valores foram um pouco mais altos. Esses resultados nos dão respaldo em dois pontos: primeiro que ele mostrou o que já era esperado, já que seria improvável atribuir ao nosso objeto de estudo (câncer de próstata) a alteração de apenas um gene como determinante para o desenvolvimento da doença. Outro ponto é que a combinação genética mostrou valores mais altos, isso nos leva a acreditar que a formação de um painel de marcadores pode gerar resultados de fato importantes sobre a evolução da doença. O desafio estaria em encontrar quais seriam os genes necessários para gerar este painel.

A maioria dos trabalhos epidemiológicos-moleculares são baseados no estudo de genes candidatos como marcadores de diagnóstico e prognóstico de doenças e também na resposta aos tratamentos. Como esse tipo de estudo depende da análise genética e o uso da tecnologia voltada para o sequenciamento e genotipagem está cada dia mais exequível tanto em custos quanto em tempo de gasto com análise, isso tem se tornado cada dia mais viável. É claro que a etiologia do câncer de próstata não pode ser explicada pela variabilidade de apenas um *locus* gênico. Contudo, vários trabalhos têm usado de uma boa ferramenta estatística para se buscar compreender o efeito combinado de muitos polimorfismos genéticos. A expectativa é que no futuro esses estudos sejam capazes de testar polimorfismos múltiplos, nos quais os fatores ambientais também devem ser levados em conta. Isso pode permitir a criação de um perfil de risco, quimioprevenção e tratamento para o câncer de próstata (Gsur *et al.*, 2004).

No que tange à busca por biomarcadores podemos dizer que essa procura tem incluído o perfil de expressão gênica, a expressão de miRNA, proteômica do soro e o estudo sobre o metabolismo em geral (Sreekumar *et al.*, 2009). Recentemente, a investigação de possíveis biomarcadores na urina tem permitido a identificação de *PCA3* (*Prostate Cancer Antigen 3*) um possível biomarcador de evolução da doença (Ploussard e de la Taille, 2010). É claro que ainda, poucos ou nenhum destes biomarcadores podem ser utilizados para prever a evolução da doença de forma mais eficiente que, apesar das limitações, o grau de Gleason alcança sozinho.

Na verdade, o que se especula é que a combinação de marcadores formando um

painel é que poderia, enfim, ter sucesso prático na predição da evolução da doença. Alternativamente, a biologia dos sistemas tenta se aproximar dessa realidade identificando os principais genes reguladores da progressão das doenças e com isso seria capaz de estratificar pacientes em vários tipos de câncer (Carro *et al.*, 2009). O que se espera realmente é que a compreensão da oncogenômica que integra a expressão gênica e a análise do número de cópias possa identificar novos biomarcadores de predição do desenvolvimento da doença (Taylor *et al.*, 2010).

Com relação ao perfil da população Brasileira em comparação a outras populações pode-se perceber algumas diferenças. A incidência do câncer de próstata varia substancialmente pelo mundo, como por exemplo: Nos países do Oriente a incidência da doença é de 10 a 100 vezes menor do que em países orientais. É bem verdade que boa parte desse disparate pode ser simplesmente resultado da discrepância dos sistemas de saúde, contudo, a baixa incidência no Japão, é fortemente sugerida por outros fatores como a dieta e os hábitos de vida que envolvem a população (Hsing e Devesa, 2001). Comparado com a população Japonesa já mencionada pode-se falar da alta incidência reportada a Americanos-Africanos, o que só nos leva a acreditar na importância do background genético já citado.

Pesquisas populacionais são importantes a fim de se conhecer melhor e mapear as diferenças existentes entre as mesmas. Nesse contexto está o Projeto Genoma Humano por exemplo, que foi uma pesquisa internacional com o principal objetivo de determinar a sequência dos pares de base do DNA e identificar todos os genes humanos. O projeto ajudou na descoberta de mais de 1.800 genes ligados a doenças humanas entre os 20.000 a 25.000 genes existentes no nosso genoma (Stein e Colditz, 2004).

Em outubro de 2005, foi dado outro grande passo. Foi concluída a primeira fase de outro consórcio internacional entre pesquisadores, o *HapMap*, que é como um catálogo dos padrões comuns de variação genética da população mundial (Morton, 2008). Os dados gerados têm acelerado a pesquisa por genes envolvidos em doenças humanas comuns e já produziu resultados importantes na descoberta de fatores genéticos envolvidos em condições que vão desde a cegueira relacionada ao envelhecimento até a obesidade.

Nosso estudo veio corroborar esta ideia, pois através da análise genética feita até agora, observou-se que para o gene que apresentou relação com a suscetibilidade do desenvolvimento do câncer de próstata (gene *XPB*), a população Brasileira é bastante diferente da população Japonesa e Chinesa. A esse fato agrega-se também a nossa história de colonização, que justifica a proximidade genética da população Brasileira com a Européia, e distanciamento com as Orientais.

Os polimorfismos de genes importantes para o desenvolvimento e função da próstata podem resultar em diferenças significativas na expressão de proteínas envolvidas na fisiologia normal da célula, modificando o seu funcionamento. Estas variações podem ser influenciadas por fatores ambientais ou pela interação entre diferentes polimorfismos. Polimorfismos associados com o câncer de próstata são muito mais comuns na população do que nos genes de suscetibilidade de alta penetrância (Coughlin e Hall, 2002).

Assim, o conhecimento da frequência alélica dos polimorfismos em genes de reparo na população brasileira, a sua distribuição quanto à raça autodeclarada e o seu impacto na doença é uma etapa básica na construção do conhecimento não só no câncer de próstata, mas também no perfil polimórfico da população brasileira, o que poderá servir de subsídeo para estudos futuros.

Com relação à correlação feita entre a presença dos polimorfismo e os dados clínicos, observou-se que embora se possa relacionar a presença destes à suscetibilidade ao desenvolvimento tumoral, não se pode considerar que os mesmos estejam ligados a nível de agressividade (prognóstico da doença). Em contrapartida, os valores de PSA mais uma vez mostraram-se coerentes com o esperado, apesar dos dados que citam sua baixa especificidade, ele ainda pode servir de indicativo para a clínica.

Na verdade, os dados da literatura ainda estão em aberto, mas testes epidemiológicos sugerem que os polimorfismos não só de *XPB*, *RAD51* e *APE1*, mas também de outros genes importantes na manutenção do metabolismo celular e da estabilidade genética, como os que podem alterar a capacidade de reparo do DNA, podem sim, ter papel no aumento à suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças.

7. Conclusão

- Quanto à exposição a fatores de risco, obteve-se que o principal agente de agressão era a exposição a agrotóxicos, embora observa-se que os produtos de combustão também contribuam de alguma forma para o risco, embora de forma mais modesta.
- Sobre as características particulares e de hábitos de vida, nenhum item isolado foi capaz de contribuir para o aumento da suscetibilidade a doença.
- O gene *XPD* foi o único que sozinho mostrou-se estatisticamente significativo capaz na contribuição para o aumento da suscetibilidade a doença, apresentando um valor de $P < 0,001$ (OR 2,36 (1,46 – 3,84)). Nosso estudo sugere que o polimorfismo no gene *XPD* pode ser um marcador em potencial para o risco de câncer de próstata. Contudo, o estudo deve ser expandido a fim de se compreender qual o melhor painel genético capaz de influenciar na chance da doença em presença de reduzida capacidade de reparo de DNA.
- Na combinação entre alelos polimórficos *XPD+RAD51* apresentou relação positiva com a presença da doença, com valor de $P < 0,005$ (OR 3,40 (1,32 – 9,20)).
- Os polimorfismos de *APE1* associado ao de *RAD51* mostrou total dissociação com a suscetibilidade a doença, com valor de $P = 1,000$ (OR 0,86 (0,28 – 2,60)).
- Pacientes triplamente polimórficos não apresentaram relação de risco positiva para o desenvolvimento da doença $P = 0,831$ (OR 1,43 (0,34 – 5,07)).

8. Referências Bibliográficas

Almeida JRC, Pedrosa NL, Leite JB, Fleming TRP, Carvalho VH, Cardoso AAA. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. Revista Brasileira de Cancerologia; 53: 305-316, 2007.

Almeida KH, Sobol RW. A unified view of base excision repair: lesion dependent protein complexes regulated by post-translational modification. DNA Repair (Amst) 6, 695–711, 2007.

Amadei, LPP. Evolução Bioquímica através de medidas seriadas de antígeno prostático específico (PSA) de pacientes submetidos a braquiterapia com implante de semente de 125I no tratamento do adenocarcinoma de próstata. Tese de doutoramento em Ciências. Universidade de São Paulo, 163p. 2008.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012. Atlanta: American Cancer Society; 2012.

Andrén O, Fall K, Franzén L, Andersson SO, Johansson JE, Rubin MA. How well does the Gleason score predict prostate cancer death? A 20-year followup in a population based cohort in Sweden. Journal of Urology 175:1337-1340, 2006.

Antoniou AC, Sinilnikova OM, Simard J, Leone M, Dumont M, Neuhausen SL, et al: RAD51 135G>C modifies breast cancer risk among BRCA2 mutation carriers: results from a combined analysis of 19 studies. American Journal Human Genetic 81:1186-1200, 2007.

Aloyz R, Xu Z, Bello V, Bergeron J, Han F, Yan Y, Malapetsa A, Jamali M, Duncan A and Panasci L. Regulation of Cisplatin Resistance and Homologous Recombinational Repair by the TFIIH subunit XPD. Cancer Research 1, 62; 5457, 2002.

Baccarelli A, Calista D, Minghetti P, Marinelli B, et al. XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. Brazilian Journal Cancer. 90: 497–502, 2004.

Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. Europe Journal Surgical Oncology 30:593-601, 2004.

Beard CJ, Chen MH, Cote K, Loffredo M, Renshaw AA, Hurwitz M, D'Amico AV. Perineural invasion is associated with increased relapse after external beam radiotherapy for men with low-risk prostate cancer and may be a marker for occult, high-grade cancer. Int Journal Radiat Oncology Biological Physical 58: 19-24, 2004.

Belanger A, van Halbeek H, Graves HC, Grandbois K, Stamey TA, Huang L, et al. Molecular mass and carbohydrate structure of prostate specific antigen: studies for establishment of an international PSA standard. Prostate 27:187-197, 1995.

Benhamou S, Sarasin A. ERCC2/XPD gene polymorphisms and lung cancer: a Huge review. American Journal Epidemiology, janeiro 1; 161:1-14. Review, 2005.

Benhamou S, Sarasin A. *ERCC2/XPD* gene polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis* 17, Issue 6, 463-469, 2002.

Bethel CR, Chaudhary J, Anway MD, Brown TR. Gene expression changes are age-dependent and lobe-specific in the brown Norway rat model of prostatic hyperplasia. *Prostate* 69: 838–850, 2009.

Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, *et al.* Prognostic Factors in Prostate Cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 124: 995-1000, 2000.

Bostwick GD, Burke BH, Djakiew D, Euling Susan, Ho S, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters D, Timms B. Human Prostate Cancer Risk Factors. *American Cancer Society* 101: 2371–490; 2004.

Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research* 543: 251-272, 2003.

Bolognesi C, Landini E, Perrone E, Roggieri P. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ (FISH) with all-chromosome centromeric probe. *Mutation Research* 557:109-117, 2004.

Bull S, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis* 21:93-103, 2006.

Carro MS, Lim WK, Alvarez MJ, Bollo RJ, Zhao X, Snyder EY, Sulman EP, Anne SL, Doetsch F, Colman H, *et al.* The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* 463: 318–325, 2009.

Chen L, Ambrosone CB, Lee J, Sellers TA, Pow-sang J, Park JY, Popanda O. Association between polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and APE1, and the risk of prostate cancer in white and black Americans. *Journal Urology* 175: 108–112, 2006.

Costa RM, Chigancas V, Galhardo RDA, Carvalho H, Menck CF. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochemistry*, 85, 11, 1083-1099, 2003.

Coughlin SS, Hall HL. A review of genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *Annals of Epidemiology*, 12: 182-196, 2002.

De Boer J, Donker I, de Wit J, Hoeijmakers JH, Weeda G. Disruption of the mouse xeroderma pigmentosum group D DNA repair/basal transcription gene results in preimplantation lethality. *Cancer Research* 58: 89-94, 1998.

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Fondurulia J, Chen MH, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Wein A, Richie JP. Clinical utility of the percentage of positive prostate biopsies in defining biochemical outcome after radical prostatectomy for patients with clinically localized prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* 18:1164-1172, 2000.

D'Amico AV, Wu Y, Chen MH, Nash M, Renshaw AA, Richie JP. Perineural invasion as a predictor of biochemical outcome following radical prostatectomy for select men with clinically localized prostate cancer. *Journal of Urology* 165 :126-129, 2001.

De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urologic Oncology* 25: 398–400, 2007.

Demple, B, Sung, JS. Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA Repair (Amst)* 4, 1442–1449, 2005.

Denoix, P.F.: *Bull Institute National Hygiene*. 1944;1:69. 1944;2:82. 1950;5:81. 1952; 7:743. Paris.

Dizdaroglu M. Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutation Research* 591, 45–59, 2005.

Drapkin R, Reardon IT, Ansari A, Huang JC, Zawel L, Ann K, Sancar A and Reinberg D. Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 368,769-72, 1994.

Eichelberger LE, Koch MO, Daggy JK, Ulbright TM, Eble JN, Cheng L. Predicting tumor volume in radical prostatectomy specimens from patients with prostate cancer. *American Journal of Clinical Pathology* 120: 386-391, 2003.

Epstein JI, Walsh PC, Carmichael M, Brendler CB. Pathologic and clinical findings to predict tumor extent of nonpalpable (stage T1c) prostate cancer. *JAMA* 2; 271: 368-374, 1994.

Fan J, Wilson DM. Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. *Free Radical Biology & Medicine*. 38, 1121–1138, 2005.

Ferrís-i-Tortajada, J. García-i-Castell, O. Berbel-Tornero, J.A. Ortega-García: Factores de riesgo constitucionales en el cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas* 35:282-288, 2010.

Ferreira MD, Koff WJ. Assessment of serum level of prostate-specific antigen adjunted for the transition zone volume in early detection of prostate cancer. *International*

Brazilian Journal of Urology; 31: 137-45; 2005.

Forget AL, Kowalczykowski SC. Single-molecule imaging brings Rad51 nucleoprotein filaments into focus. *Trends in Cell Biology*, 20, 269-276. Elsevier, 2010.

Fousteri M, Mullenders HF. Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects, *Cell Research* 18: 73-84, 2008.

Galkin VE, Wu Y, Zhang XP, Qian X, He Y, Yu X, et al: The Rad51/RadA Nterminal domain activates nucleoprotein filament ATPase activity. *Structure* 14: 983-992, 2006.

Gangwar R, Manchanda PK, Mittal RD. Implications of *XRCC1*, *XPD* and *APE1* gene polymorphism in North Indian population: a comparative approach in different ethnic groups worldwide. *Genetica* 136, 163–169, 2009.

Garcia-Saez I, Parraga A, Phillips MF, Mantle TJ, et al. Molecular structure at 1.8 Å of mouse liver class pi glutathione S-transferase complexed with S (p-nitrobenzyl) glutathione and other inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 237: 298-314, 1994.

Gray NK. Translational control by repressor proteins binding to the 5'UTR of mRNAs. *Methods in Molecular Biology* 77: 379–397, 1998.

Gryk MR, Marintchev A, Maciejewski MW, Robertson A, Wilson SH, Mullen GP. Mapping of the interaction interface of DNA polymerase beta with *XRCC1*. *Structure* 10, 1709–1720, 2002.

Gsur A, Feik E, Madersbacher S. Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World Journal Urology* 21: 414–423, 2004.

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA Repair Genes and associations with Cancer Risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2002.

Grossfeld GD, Latini DM, Lubeck DP, Broering JM, Li YP, Mehta SS, Carroll PR. Predicting disease recurrence in intermediate and high-risk patients undergoing radical prostatectomy using percent positive biopsies: results from CaPSURE. *Urology* 59:560-565, 2002.

Gu D, Wang M, Wang M, Shang Z e Chen J, The DNA repair gene APE1 T1349G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 27 case-control studies. *Mutagenesis* 24, 6: 507–512, 2009.

Haese A, Becker C, Noldus J, Graefen M, Huland E, Huland H, et al. Human glandular kalikrein 2: a potential serum marker for predicting the organ confined versus nonorgan confined growth of prostate cancer. *Journal Urology*, 163:1491-97, 2000.

Hadi MZ, Coleman MA, Fidelis K, et al. Functional characterization of Ape1 variants

- identified in the human population. *Nucleic Acids Research*, 28, 3871-3879, 2000.
- Helleday T, Lo J, Van Gent DC, Engelward BP. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)* 6, 923-935, 2007.
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374, 2001.
- Hsing AW, Devesa SS. Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? *Epidemiology Review* 23: 3-13, 2001.
- Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. Amino acid substitution variants of *APE1* and *XRCC1* genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 22: 917-922, 2001.
- INCA: Instituto Nacional do Cancer Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2011.
- Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Progress Neurobiology*. 94:166-200, 2011.
- Khan MA, Han M, Partin AW, Epstein JI, Walsh PC. Long-term cancer control of radical prostatectomy in men younger than 50 years of age: update 2003. *Urology* 62 :86-91, 2003.
- Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Letters* 282: 125-136, 2009.
- Khanna KK., Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetic*, 27: 247-254, 2001.
- Klein HL. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA repair*, 7, 686-693, 2008.
- Kolonel LN. Fat, meat, and prostate cancer. *Epidemiology Review* 23: 72-81, 2001.
- Koifman, S, Koifman, RJ, Meyer, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 18, 435-445, 2002.
- Kuasne H, Rodrigues IS, Guembarovski R, Reis M, Fuganti P, Gregório E, Júnior F, Matsuda H, Rodrigues M, Kishima M and Cólus I. Base excision repair genes *XRCC1* and *APEX1* and the risk for prostate cancer. *Molecular Biology Reports* 38:1585-1591, 2011.

Laine JP, Egly JM. When transcription and repair meet: a complex system. *Trends of Genetic*. 22, 430–436, 2006.

Lambert S, Lopez BS. Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant negative forms. *The EMBO Journal* 19: 3090–3099, 2000.

Lee C, Bushman W. Prostatic duct biology, *Prospectives*, 3, 1-4, 1995.

Lehmann RA. The xeroderma pigmentosum group D (*XPD*) gene: one gene, two functions, three diseases. *Genes & Development* 15:15–23. 2001.

Lehmann A. *XPD* structure reveals its secrets. *DNA Repair (Amst)*, 7,11, 1912-1905, 2008.

Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, *et al.* "A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly." *Human Molecular Genetics*. 12: 1725–1735, 2003.

Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, *et al.* A single nucleotide polymorphism in the *RAD51* gene modifies cancer risk in *BRCA2* but not *BRCA1* carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:3232–3236, 2001.

Li C, Liu Z, Wang LE, Strom SS, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI, Mansfield PF, Cormier JN, Prieto VG, Duvic M, Grimm EA, Wei Q. Genetic variants of the *ADPRT*, *XRCC1* and *APE1* genes and risk of cutaneous melanoma. *Carcinogenesis* 27: 1894-1901, 2006.

Lima MV, Ribeiro GS, Mesquita ET, *et al.* Genotypes and the quality of anticoagulation control with warfarin therapy among Brazilian patients. *European Journal Clinical Pharmacology*. 64: 9-15, 2008.

Majumder M, Sikdar N, Ghosh S and Roy B. Polymorphisms at *XPD* and *XRCC1* DNA repair loci and increased risk of oral leukoplakia and cancer among *NAT2* slow acetylators. *International Journal of Cancer*, 120: 2148-2156, 2007.

Manuguerra M, Saletta F, Karagas MR, Berwick M, Veglia F, Vineis P, Matullo G. *XRCC3* and *XPD/ERCC2* Single Nucleotide Polymorphisms and the Risk of Cancer: A Huge Review *American Journal Epidemiology*.164:297-302, 2006.

Matullo G. Combination of DNA repair gene single nucleotide polymorphisms and increased levels of DNA adducts in a population-based study. *Cancer Epidemiological Biomarkers and Prevention* 12, 7, 674-677, 2003.

Ministério da Saúde (MS). Sistema de Informações Ambulatoriais - Manual de Bases Técnicas. Brasília, 2006.

- Mitra S, I Boldogh, T Izumi and TK Hazra. "Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage". *Environment Molecular Mutagen* 38 (2-3): 180-190, 2001.
- Monaco, R. Conformational effects of a common codon 751 polymorphism on the C-terminal domain of the xeroderma pigmentosum D protein. *Journal of Carcinogenesis* 8, p. 12, 2009.
- Monçores MW, Pereira SB, Gouvea LSF, *et al.* Medicina individualizada aplicada à cardiologia. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro*, 21:184-193, 2008.
- Moynahan, ME, Jasin M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 11, 3: 196-207. Nature Publishing Group, 2010.
- Morton, NE. Into the post-HapMap era. *Advances in Genetics*, 60, 727-742, 2008.
- Niimi T, Munakata M, Keck-Waggoner CL, *et al.* "A Polymorphism in the Human UGRP1 Gene Promoter That Regulates Transcription Is Associated with an Increased Risk of Asthma". *American Journal of Human Genetics*. 70: 718-725, 2002.
- O'Donovan A, Wood, RD. Identical defects in DNA repair in xeroderma pigmentosum group G and rodent ERCC group 5. *Nature* 363, 185-188, 1993.
- Orre LM, Fält S, Szeles A, *et al.* Rad51-related changes in global gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 341, 2, p. 334-342, 2006.
- Organização Mundial da Saúde (OMS). Guidelines for the conduct of tobacco smoking among health professionals. Report WHO. Meeting Winnipeg, Canadá., 1983.
- Pacheco AO, Hackel C. Instabilidade cromossômica induzida por agroquímicos em trabalhadores rurais na região de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 18:1675-1683, 2002.
- Pramanik S, Devi S, Chowdhary S, Surendran S, Krishnamurthi K, Chakrabarti T. DNA repairs gene polymorphisms at XRCC1, XRCC3, XPD and OGG1 loci in Maharashtrian population of central India. *Chemosphere* 82, 941-946, 2011.
- Platz EA, Giovannucci E. Prostate Cancer. En: Schottenfeld D, Fraumeni Jr JF, editors. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3rd edition. Oxford: p. 1128-1150, 2006.
- Ploussard, G. la Taille A. Urine biomarkers in prostate cancer. *Nature Review Urology* 7: 101-109, 2010.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2011.

Rangarajan M, Zats J. Effect of formulation on the topical delivery of α -tocopherol. *Journal Cosmetic Science*. 54: 161-174, 2003.

Richardson C. *RAD51*, genomic stability, and tumorigenesis. *Cancer Letters* 218: 127-139, 2005.

Rosa GD, Barcellos GB, Carvalhal GF, Dornelles Neto, EJ. Marcadores tumorais em urologia. *Acta Médica (Porto Alegre)*. 26:155-165, 2005.

Salles PGO. Adenocarcinoma da próstata, estudo anatomopatológico de biópsias ecoguiadas e peças cirúrgicas de prostatectomia radical e correlação com o antígeno prostático específico. Tese de Doutorado. UFMG, 2010.

Sartor AO, Hricak H, Wheeler TM, Coleman J, Penson DF, Carroll PR, Rubin MA, Scardino PT. Evaluating localized prostate cancer and identifying candidates for focal therapy. *Urology* 72: 12–24, 2008.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p. ISBN 0-87969-309-6, 1989.

Schane RE, Ling PM, Glantz, SA. Health effects of light and intermittent smoking: A review. *Circulation*, 121: 13, 1518-1522, 2010.

Schild D, Wiese C. Overexpression of *RAD51* suppresses recombination defects: a possible mechanism to reverse genomic instability. *Nucleic acids research*, 38: 4, 1061-1070, 2010.

Shivji MK, Podust VN, Hubscher U, Wood RD. Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC and RPA. *Biochemistry*, 34, 15, 5011-5017, 1995.

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246, 2004.

Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development* 24: 1967-2000, 2010.

Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Non-conservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Research* 58, 604–608, 1998.

Shuck SC, Short EA, Turchi JJ. Eucaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Research*, 18, 64-72, 2008.

Symington, LS. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66, 4, 630-670, 2002.

Smith CV, Bauer JJ, Connelly RR, Seay T, Kane C, Foley J, Thrasher JB, Kusuda L, Moul JW. 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. *Journal Urology* 164:1964-1967, 2000.

Sociedade Brasileira de Urologia. Projeto Diretrizes. Câncer de próstata localizado: Progressão Bioquímica (PSA) após tratamento. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Rio de Janeiro, v 1, n 1, p 1 a 12, 2006.

Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang LE, Shete S, Amos CI, Guo Z, Lei L, Mohrenweiser H, Wei Q. Modulation of Nucleotide Excision Repair Capacity by XPD polymorphisms in Lung Cancer Patient . *Cancer Research* 61, 1354-1357, 2001.

Stein, C. J.; Colditz, G. A. Modifiable risk factors for cancer. *Brasilian Journal of Cancer*, 90: 2, 299-303, 2004.

Strachan, T, Read, A. P. *Genética Molecular Humana*. 3 ed. Tradução de Henrique Bunselmeyer *et al.* Porto Alegre: Artmed. 576 p. 2002.

Stoler D.L., Chen N., Basik M., Kahlenberg M.S., Rodriguez-Bigas M.A., Petrelli N.J., Anderson G.R. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96, 15121–15126, 1999.

Sugasawa, K.. UV-induced ubiquitylation of XPC complex, the UV-DDBubiquitin ligase complex, and DNA repair. *Journal of Molecular Histology* 37, 189–202, 2006.

Sung, P, Krejci L, Van Komen, S, Sehorn, MG. Rad51 recombinase and recombination mediators. *The Journal of biological chemistry*, 278:44, 42729-42732, 2003.

Srivastava, A, Srivastava, K., Pandey, SN, Choudhuri, G, Mittal, B. Singlenucleotide polymorphisms of DNA repair genes OGG1 and XRCC1: association with gallbladder cancer in North Indian population. *Annals of Surgical Oncology* 16, 1695-1703, 2009.

Takahashi E, Matsuda Y, Hori T, Yasuda N, Tsuji S, Mori M, Yoshimura Y, Yamamoto

A, Morita T, Matsushiro A: Chromosome mapping of the human (RECA) and mouse (Reca) homologs of the yeast RAD51 and Escherichia coli recA genes to human (15q15.1) and mouse (2F1) chromosomes by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 19:376-378, 1994.

Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11–22, 2010.

Tardin OMA, Velozo M, Bernardez S, Balieiro H et al., Estudo de Polimorfismos Genéticos na Insuficiência Cardíaca (GenetIC): delineamento do estudo e metodologia. *Rev SOCERJ*. 22, 36-42, 2009.

True L, Coleman I, Hawley S, Huang CY, Gifford D, Coleman R, Beer TM, Gelmann E, Datta M, Mostaghel E, et al.. A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10991–10996, 2006.

US Centers for Disease Control and Prevention. Health behaviors of adults: United States, 2005 to 2007. *Vital and Health Statistics*, 10, 245: Appendix II, p. 80, 2010.

Vettrisilvi, V, Vijayalakshmi, K, Solomon, PF, Venkatachalam, P. XRCC1 and XPD gene polymorphisms in a South Indian population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 8, 283–286, 2007.

Vogelstein B, Kinzler KW, The multistep nature of cancer, *Trends in Genetics*. 9, 138–141, 1993.

Walker LJ, Robson CN, Black E, et al. Identification of residues in the human DNA repair enzyme HAP1 (Ref-1) that are essential for redox regulation of Jun DNA binding. *Molecular and Cell Biology*, 13, 5370-5376, 1993.

Wang Y, Shupenko CC, Melo LF and Strauss PR: DNA repair protein involved in heart and blood development. *Molecular and Cell Biology* 26: 9083-9093, 2006.

Wang W, Spurdle AB, Kolachana P, Bove B, Modan B, Ebbers SM, Suthers G, Tucker MA, Kaufman DJ, Doody MM, Tarone RE, Daly M, Levavi H, Pierce H, Chetrit A, Yechezkel GH, Chenevix-Trench G, Offit K, Godwin AK, Struewing JP. A single nucleotide polymorphism in the 5' untranslated region of RAD51 risk of cancer among BRCA1/2 mutation carriers. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 10:421, 2001.

Wang, J, Zhao, Y, Jiang, J, Gajalakshmi, V, Kuriki, K, Nakamura, S, Akasaka, S, Ishikawa, H, Suzuki, S, Nagaya, T, Tokudome, S. Polymorphisms in DNA repair genes

XRCC1, XRCC3 and XPD, and colorectal cancer risk: a case-control study in an Indian population. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136, 1517–1525, 2010.

Wang, MC, Valenzuela, LA, Murphy, GP, Chu, TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Investigative Urology*, 17, 2: 159-163, 1979.

White, M. Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfurcontaining 5'→3' DNA helicases. *Biochemical Society Transactions*, 37: 3, 547-551, 2009.

Wick W, Petersen I, Schmutzler RK, Wolfarth B, Lenartz D, Bierhoff E, Hummerich J, Muller DJ, Stangl AP, Schramm J, *et al.*: Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene*, 12:973-978, 1996.

World Health Organization. World Cancer Report. Disponível em: www.who.int/cancer/en - Acesso em 25 jan.12, WHO, 2007.

World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health. Disponível em www.who.int/substance_abuse/publications - Acesso em 14 mar 2012. WHO, 2011.

World Health Organization. Mega country health promotion network: behavioural risk factor surveillance guide. Disponível em: <http://www.who.int/hpr/brfs/Docs/MegaCountrySurveillanceGuide.pdf>. Geneva, 2002.

Xi T, Jones, IM. and Mohrenweiser, HW. Many aminoacid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. *Genomics*, 83, 970–979, 2004.

Yamaguchi N, Gonçalves FT, Confroto NDT. Impacto da farmacogenômica na Oncologia Clínica. *Revista Sociedades Brasileiras de Câncer*; 1: 28-33, 2004.

Zhang J, Dhakal IB, Greene G, Lang NP, Kadlubar FF. Polymorphisms in *hOGG1* and *XRCC1* and Risk of Prostate Cancer: Effects Modified by Plasma Antioxidants. *Urology*, 2009.

Zhou W, Liu G, Miller DP, Thurston SW, Xu LL, Wain JC, Lynch TJ, Su L, and Christiani DC. Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. *Cancer Research*, 62, 1377–1381, 2002.

9. Anexos

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles
Declaração de Consentimento - Controles
Questionário - Controles

Questionário do Projeto:

Polimorfismos Genéticos e Suscetibilidade ao Câncer de Próstata

Dados de identificação:

1 - Data da Entrevista do CONTROLE:

2 - Número de Identificação (usado nas amostras biológicas): _____
(numero consecutivo da coleta de amostras)

3- Hospital da doação de sangue:

Entrevistador:		Instituição:	
Nº registro médico ou Prontuário:		Data do registro:	
Nome do paciente:			
Idade Completa:			
Peso atual:		Altura:	

Endereço atual:	
Bairro:	Cidade:
CEP:	Endereço eletrônico:
Telefones de contato:	
Há quanto tempo mora neste endereço?	

Local de nascimento: Cidade:	Estado:	País:
------------------------------	---------	-------

Relacione os locais e tempo de moradia do paciente.

Local	Tempo de moradia
1- _____	_____
2- _____	_____
3- _____	_____
4- _____	_____
5- _____	_____

Se necessário, completar o restante no verso da página.

Grau de instrução, “C” para completo e “I” para incompleto:

1º grau [] 2º grau [] curso técnico [] universitário [] Pós-Graduação []

Cor de pele

(examine a pele do abdome do paciente e anote a opção de cor de pele que mais se assemelhe)

Cor pele: [] Branca [] Mulata [] Negra [] Outros (Especificar): _____

Tem estória de câncer na família? [] Sim [] Não

Relacione as pessoas, tipo de câncer e a idade de diagnóstico?

Nome	Tipo	Idade de diagnóstico
1- _____	_____	_____
2- _____	_____	_____
3- _____	_____	_____
4- _____	_____	_____
5- _____	_____	_____

Se necessário, completar o restante no verso da página.

Consumo de tabaco e álcool:

O Sr(a) fuma (cigarro ou charuto ou cachimbo)?

(1) Sim, ainda fuma.

A quanto tempo?

Quantidade (unidades ou maços por dia)?

(2) Nunca fumou.

(3) Somente no passado

A quanto tempo?

Quantidades (unidades ou maços por dia)?

O Sr(a) já fez uso de drogas ilícitas? [] Sim [] Não Qual? _____

• idade de início [] idade que parou []

Questões para NÃO-FUMANTES

O Sr(a) vive ou já viveu com um fumante(s)? SIM [] NÃO []

• idade de inicio da convivência [] idade de término []

O Sr(a) trabalha ou trabalhou com um fumante(s)? SIM [] NÃO []

• idade de inicio da convivência [] idade de término []

• n° de horas de exposição [] não lembra []

Hábitos de Bebida:

O Sr(a) bebe?

(1) Sim, todo dia

(2) Sim, socialmente

(3) nunca bebeu

(4) Somente no passado. Qual o período?

Qual o tipo de bebida e quantidade: _____

Hábitos Alimentares:

Alguma vez o Sr(a) consumiu água não tratada? [] Sim [] Não

Qual o período?

Responda sim ou não e a frequência diária ou semanal de consumo.

1 - Enlatados, ou presunto, ou salame, ou lingüiça, ou salsicha

Sim [] Frequência?

Não []

2- 10 ou mais porções de vegetais por dia (incluindo sucos)?

Sim [] Frequência?

Não []

3 – 4 ou mais frutas por dia?

Sim [] Frequência?

Não []

4- Açúcar refinado (em pó, bolos e doces) todo dia?

Sim [] Frequência?

Não []

5 - Carne vermelha?

Sim [] Frequência?

Não []

6 – Peixes ou crustáceos?

Sim [] Frequência?

Não []

7 – Carne de aves?

Sim [] Frequência?

Não []

8 – Carne salgada?

Sim [] Frequência?

Não []

9 – Frituras de fast food (McDonald's, Bob's etc)?

Sim [] Frequência?

Não []

O Sr(a) usou ou usa algum veneno em casa ou no trabalho? _____

Qual? _____ Período de exposição: _____

Relacione todos os locais de trabalho e ocupações que o Sr(a) teve:

Local de trabalho	Ocupações
1- _____	_____
2- _____	_____
3- _____	_____
4- _____	_____
5- _____	_____

Se necessário, completar o restante no verso da página

Ao nascer, o Sr(a) tinha alguma síndrome genética ou malformação? _____

Qual? _____

O Sr(a) tem alguma doença crônica? _____

Qual? _____

O Sr(a) toma algum remédio frequentemente? _____

Qual? _____

O Sr(a) teve exposição à radiação? _____

Qual e quanto tempo? _____

O Sr(a) teve exposição a produtos químicos? _____

Qual e quanto tempo? _____

O Sr(a) teve exposição a produtos da combustão (gasolina, diesel, GNV, álcool, carvão, coque, plástico, madeira)? _____

Quais e por quanto tempo? _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Polimorfismos Genéticos e Suscetibilidade ao Câncer
Próstata

Nome do Voluntário: _____

Número de Matrícula: _____

O Sr^o está sendo convidado a participar no grupo controle (homens sem câncer de próstata) de uma pesquisa sobre os fatores de risco e a genética do câncer de próstata. Por isso, precisamos de uma doação voluntária de uma amostra do seu sangue.

Esta pesquisa poderá contribuir para um melhor conhecimento sobre o surgimento do câncer de próstata.

Para que o Sr^o possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

A identificação do grau de malignidade do câncer de próstata hoje, se dá através da associação entre os valores de PSA, dados da imagem e a biópsia. Os testes de PSA tem sido um grande aliado na busca por encontrar o câncer de próstata em estágios precoce, economizando milhares de vidas nos últimos anos. Contudo, tais procedimentos não são suficientes para uma determinação precisa do que realmente deve ser feito com o caso clínico, uma vez que outras alterações também levam ao aumento dos níveis de PSA, mas nada tem a ver com o câncer. Um contexto incerto resulta na submissão do paciente a biópsias de próstata que podem simplesmente não encontrar indício tumoral ou então encontrar tumores sem altos graus de malignidade, pois por medida de cuidado, o médico urologista acaba por tratar, de maneira incisiva, um tipo de câncer que poderia nunca vir

a se desenvolver, o chamado câncer indolente.

A busca por marcadores moleculares é necessária tendo em vista a vantagem de poder identificar de maneira precoce a susceptibilidade ao câncer de próstata e os diferentes graus de malignidade do tumor, o que interfere no tipo de tratamento a ser executado. Como não há, até hoje no mundo, marcador molecular capaz de orientar o médico Urologista no procedimento a ser adotado, o estudo busca ter impacto neste sentido, sendo um dos primeiros a avaliar genes integrantes das vias de reparo no risco de câncer de próstata.

Conhecendo-se o papel do polimorfismo do DNA de reparo e a relação que as mutações têm sobre o aumento do risco de câncer de próstata, julga-se necessário: Identificar polimorfismo nos genes *XPD*, *RAD51*, *APE1* de reparo de DNA, que possam estar associados a maior susceptibilidade ao câncer de próstata, usando a população do Rio de Janeiro como amostra da população brasileira.

O Sr^o foi convidado a participar neste estudo de pesquisa que visa descobrir se algumas das variantes dos genes envolvidos na produção de andrógenos da próstata e dos genes desintoxicação podem aumentar o risco para desenvolvimento do câncer de próstata. Sua participação é importante para formar um grupo controle que será comparado com os dados dos pacientes com câncer de próstata.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Se o senhor concordar em participar deste estudo será coletada uma amostra de seu sangue de 5 mililitros ou o correspondente a uma colher de sobremesa, para ser submetido a exames laboratoriais.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não há método alternativo nessa pesquisa.

RISCOS

O seu procedimento de doação será exatamente o mesmo de coletas para exames de rotina. Estas punções venosas para exames laboratoriais podem resultar em dor no local da punção ou manchas roxas transitórias chamadas de equimoses. O seu médico poderá orientá-lo como tratá-las, caso isso venha a ocorrer.

BENEFÍCIOS

Este estudo pode não trazer melhora para a sua saúde, entretanto as informações obtidas neste estudo podem contribuir para um melhor conhecimento sobre o câncer de próstata.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O seu acompanhamento durante o procedimento será feito pelo Dr. Jose Scheinkman (CRM: 5218320-7), médico do Serviço de Urologia do Hospital Universitário Antônio Pedro, telefone: (21) 2205-1735.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital do Câncer I / INCA e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicações científicas, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo do Hospital Universitário.

CUSTOS

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que o Sr^o saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que o senhor pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de o senhor decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida e os dados obtidos de suas amostras não serão utilizados.

O médico responsável por esta pesquisa pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos ao senhor ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para Dra. Gilda Brown no telefone 3207- 1805.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que serei submetido a um exame de sangue adicional e que não receberei compensação monetária por minha participação nesta pesquisa.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____ / ____ / ____
(Assinatura do Doador) dia mês ano

(Nome do Doador – letra de forma)

_____ / ____ / ____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao doador.

_____ / ____ / ____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde / Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/Hospital
Universitário Antônio Pedro

PARECER DO PROJETO DE PESQUISA / CEP-CMM/HUAP 048/09

I. Identificação:

- a) Título do projeto: Polimorfismos Genéticos e Suscetibilidade ao Câncer de Prostata.
- b) área temática: Especial
- c) Pesquisador responsável: Gilda Alves Brown
- d) Equipe: Ana Hatagima, Antônio Augusto Ornellas, Raul Quirino
- e) Instituição responsável: INCA.
- f) Outras instituições envolvidas: HUAP
- g) Data de apresentação ao CEP

Comentários de relator frente à Resolução 196/96 e complementares, em particular sobre:

Este protocolo foi enviado ao CEP do INCA em 30/01/2006. Foi aprovado e encaminhado a CONEP. Não está explícito no projeto mas me parece que o HUAP será um centro colaborador e a autorização foi assinada pelo Prof. Haberlandh Sodré Lima em 17/03/2009.

Parecer do Relator:

Sugiro que seja retirado de pauta e encaminhado um adendo ao projeto no CEP de origem para a inclusão do HUAP *e encaminhado ao CEP do HUAP após inclusão do mesmo no projeto.*

Data da reunião: 03/04/2009


Rosângela Arrabal Thomaz
UFF - Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina / HUAP



A: Dra. Gilda Alves Brown
Investigadora Principal

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa

Rio de Janeiro, 26 de janeiro de 2006

Registro CEP nº 091/05 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Projeto: Polimorfismos Genéticos e Suscetibilidade ao Câncer de Próstata

Prezada Doutora

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após re-análise aprovou o Protocolo intitulado: Polimorfismos Genéticos e Suscetibilidade ao Câncer de Próstata (versão de out/05) bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o paciente (versão de jan/06) e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doador do banco de sangue (versão de jan/06) em 26 de janeiro de 2006.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas à análise, registro e arquivamento. Por se tratar de pesquisa classificada em Área Temática Especial, o pesquisador deverá aguardar a sua aprovação final para que se inicie a execução.

Atenciosamente

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



Universidade Federal Fluminense

Hospital Universitário
Antônio Pedro

AUTORIZAÇÃO

Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res. CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento do projeto “Polimorfismos Genéticos e Suscetibilidade ao Câncer de Próstata”, de Gilda Alves Brown, portadora da carteira de identidade número 4532-02-D-CRB-2 e CPF número 824.726.887-68, autorizo sua execução nesta instituição.

Niterói, 17 de março de 2009.

PROF. HABERLANDH SODRÉ LIMA
Diretor Médico

Hospital Universitário Antônio Pedro
Rua Marquês do Paraná 303 – Centro – Niterói – RJ – CEP: 24033-900
Tels: 2629-9408/9409/9421 Fax : 2717-4459
e-mail: direcao@huap.uff.br