

MÁRIO MACIEL DE LIMA JUNIOR

**ANÁLISE DO PERFIL GENOTÍPICO DO SISTEMA GLUTATIONA
S-TRANSFERASE E CITOCROMO P450 NA AVALIAÇÃO DE
SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE PRÓSTATA E DE
PROGNÓSTICO**

CAMPINAS

2006

MÁRIO MACIEL DE LIMA JUNIOR

**ANÁLISE DO PERFIL GENOTÍPICO DO SISTEMA GLUTATIONA
S-TRANSFERASE E CITOCROMO P450 NA AVALIAÇÃO DE
SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE PRÓSTATA E DE
PROGNÓSTICO**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, área de concentração em Clínica Médica.*

ORIENTADORA: PROFA. DRA LAURA STERIAN WARD

CAMPINAS

2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L628a Lima Júnior, Mário Maciel de
Análise do perfil genotípico do sistema glutathione S- transferase e
citocromo P450 na avaliação de susceptibilidade ao câncer de próstata
e de prognóstico / Mário Maciel de Lima Júnior. Campinas, SP :
[s.n.], 2006.

Orientador : Laura Sterian Ward
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Próstata - Câncer. 2. Hiperplasia Prostática. 3. Glutathione
Transferase. 4. Citocromos. 5. Sistema Enzimático do citocromo
P450. I. Ward, Laura Sterian. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Slp/fcm

**Título em ingles : Polymorphic inheritance of Glutathione-S-Transferase
(GST) and the Cytochrome P450 (CYP) genes, the susceptibility to prostate
cancer and prognostic**

Keywords: • Prostate cancer
• Prostatic Hyperplasia
• Glutathione transferase
• Cytochromes
• Cytochrome P-450 Enzyme System

Área de concentração : Clínica Médica

Titulação: Mestrado

**Banca examinadora: Profa. Dra. Laura Sterian Ward
Prof Dr Juvenal Ricardo Navarro Góes
Prof Dr Antônio Guguiotta**

Data da defesa: 31 /01 /2006

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

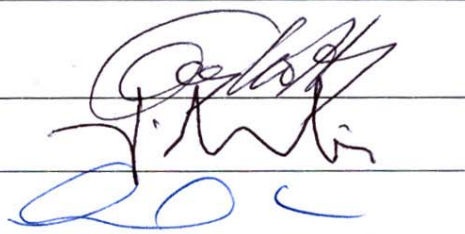
Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Laura Sterian Ward

Membros:

1. Prof(a). Dr(a) Antonio Gugliota _____

2. Prof(a). Dr(a). Juvenal Ricardo Navarro Goes _____

3. Prof(a). Dr(a). Laura Sterian Ward _____



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/01/2006

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Mário e Naizete,

*Às minhas irmãs, Raquel e Mariane; companheiros
de sonhos diversos.*

*Á Fabiana e Mário Neto, minha esposa e filho, que
me deram forças, entusiasmo e iluminaram meu
caminho nesta jornada.*

Ao grande arquiteto do universo pela sabedoria, saúde e força vivenciados nesta trajetória.

Aos pacientes, pela inestimável colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Laura Sterian Ward, orientadora desta obra, o meu sincero agradecimento pelos ensinamentos, pelas palavras proferidas de incentivo, pela oportunidade creditada, pela confiança depositada, pela amizade construída e solidificada nesses anos de convivência. O exemplo de mestre, orientadora e amiga.

À Fabiana Granja, quem me apresentou os novos horizontes da biologia molecular do câncer. Abriu caminhos, incentivou-me, estimulou-me e acima de tudo compreendeu minhas limitações e soube respeitá-las. O seu exemplo como pesquisadora, postura ética e intelectual ficaram registrados em minha memória, nesta longa caminhada trilhada juntos. À você digo-lhe, que jamais serei o mesmo. As mensagens e as lições por você proferidas, serviram de estímulo e foram solidificadas, nesse período de aperfeiçoamento. Esta obra devo-lhe à você.

Ao Prof. Lycurgo de Castro Santos Neto, coordenador e chefe do Departamento de Urologia da Irmandade de Misericórdia de Campinas, pelos seus ensinamentos éticos, pelo elevado espírito científico, sabedoria, convivência e amizade fraterna. Minha eterna gratidão.

Ao Dr. Luís Eduardo Murgel de Castro Santos, pelos ensinamentos técnicos urológicos, pelas discussões dos casos clínicos deste trabalho, pelas palavras de incentivo em momentos cruciais, pela retidão e exemplo como profissional e pessoa. O meu muito obrigado pelo apoio, incentivo ao meu crescimento pessoal e capacitação científica. Sinto-me honrado de tê-lo como amigo.

Ao GEMOCA – Laboratório de Genética Molecular do Câncer da FCM-UNICAMP, a todos os seus integrantes, pelo apoio incondicional, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade construída, pela disponibilidade de condições técnicas e materiais necessários para este estudo.

Às pesquisadoras Mariana e Inês, pelo apoio constante nesta trajetória. Os exemplos de dedicação, amizade e espírito científico. Os meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Antônio Roberto Franchi Teixeira, pela disponibilidade, o apoio moral, os ensinamentos, incentivo e amizade fraterna.

Ao Prof. Dr. Ricardo Navarro Góes, professor titular do Departamento de Cirurgia – FCM-UNICAMP; pelo incentivo, acolhimento, exemplo de vida e dedicação aos seus pares. À você, professor, o mais profundo, sincero e leal agradecimento pelo o que representou em minha formação científica.

*VIDA: É O AMOR EXISTENCIAL.
RAZÃO: É O AMOR QUE PONDERA.
ESTUDO: É O AMOR QUE AVALISA.
CIÊNCIA: É O AMOR QUE INVESTIGA.
FILOSOFIA: É O AMOR QUE PENSA.
RELIGIÃO: É O AMOR QUE BUSCA DEUS.
VERDADE: É O AMOR QUE SE ETERNIZA.
IDEAL: É O AMOR QUE SE ELEVA.
FÉ: É O AMOR QUE SE TRANSCENDE.
ESPERANÇA: É O AMOR QUE SONHA.
CARIDADE: É O AMOR QUE AUXILIA.
FRATERNIDADE: É O AMOR QUE SE EXPANDE.
SACRIFÍCIO: É O AMOR QUE SE ESFORÇA.
RENÚNCIA: É O AMOR QUE SE SEPARA.
SIMPATIA: É O AMOR QUE SORRI.
TRABALHO: É O AMOR QUE CONSTRÓI.
INDIFERENÇA: É O AMOR QUE SE ESCONDE.
DESESPERO: É O AMOR QUE SE DESGOVERNA.
PAIXÃO: É O AMOR QUE SE DESEQUILIBRA.
CIÚME: É O AMOR QUE DESVAIRA.
ORGULHO: É O AMOR QUE ENLOUQUECE.
SENSUALISMO: É O AMOR QUE SE ENVENENA.
FINALMENTE, O ÓDIO, QUE JULGAS SER A ANTÍTESE DO AMOR, NÃO É
SENÃO O PRÓPRIO AMOR QUE ADOECEU GRAVEMENTE.*

(FRANCISCO CÂNDIDO XAVIER)

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xv</i>
ABSTRACT.....	<i>xvii</i>
1- INTRODUÇÃO.....	19
1.1- Evolução natural do câncer de próstata.....	21
1.2- Fatores genéticos envolvidos na etiopatogenia.....	22
1.3- Fatores ambientais envolvidos na etiopatogenia do câncer de próstata.....	27
1.4- Bases moleculares para a inter-relação entre fatores ambientais e o desenvolvimento do câncer de próstata.....	29
1.4.1- Sistema glutationa S-transferase.....	29
1.4.2- Sistema CYP e o gene <i>CYP1A1</i>	32
2- OBJETIVOS.....	34
2.1- Objetivo geral.....	35
2.2- Objetivos específicos.....	35
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	36
3.1- Pacientes.....	37
3.1.1- Critérios de inclusão.....	37
3.1.2- Critérios de exclusão.....	38
3.2- Caracterização da amostra.....	38
3.2.1- Idade.....	43
3.2.2- Raça.....	43

3.2.3- Fumantes e não fumantes.....	44
3.2.4- PSA.....	44
3.2.5- GLEASON.....	44
3.3- Tratamento e seguimento.....	45
3.4- Métodos.....	45
3.4.1- Extração de DNA de sangue periférico.....	45
3.5- Análise dos polimorfismos.....	46
3.5.1- Para os genes <i>GSTM1</i> E <i>GSTT1</i>	46
3.5.2- Para o gene <i>GSTP1</i>	47
3.5.3- Para os genes <i>CYP1A1</i>	49
3.5.4- Para o gene <i>GSTO1</i>	50
3.5.5- Análise estatística.....	52
4- RESULTADOS.....	53
5- DISCUSSÃO.....	68
6- CONCLUSÃO.....	73
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
8- ANEXOS.....	92
8.1- Termo de consentimento.....	93
8.2- Protocolo de pesquisa.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ah	<i>Aryl hidrocarbon</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CDKs	Cinases Dependentes de Ciclinas
CaP	Câncer de próstata
DNA	Deoxyribonucleic Acid – Ácido desoxiribonucléico
EGF	Epidermal Growth Factor – Fator de Crescimento Epitelial
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor – Receptor de Fator de Crescimento Epitelial
G0	Fase G0 do ciclo celular
G1	Fase G1 do ciclo celular
G2	Fase G2
GST	Glutathione S-Transferase
GSTT1	Sistema enzimático da família Glutathione S-transferase, sub-tipo GSTtheta 1
GSTM1	Sistema enzimático da família Glutathione S-transferase, sub-tipo GSTmu 1
GSTP1	Sistema enzimático da família Glutathione S-transferase, sub-tipo GST pi 1
GSTO1	Sistema enzimático da família Glutathione S-transferase, sub-tipo GST ômega 1
HPB	Hipertrofia Prostática Benigna
°C	Graus Celsius

PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism Analysis</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
Start 1	Ponto de restrição ou parada número 1 do ciclo celular na fase G1/S
Start 2	Ponto de restrição ou parada número 2 do ciclo celular na fase G2/M
pb	pares de bases
OR	Odds ratio
P	probabilidade
PSA	<i>Prostatic Specific Antigen</i> – Antígeno Prostático Específico
RyR	Receptor de rionodina
S	Síntese do ciclo celular
T1	Tumor clinicamente inaparente, não palpado e não identificado por imagem
T2	Tumor confinado à próstata
T3	Tumor localmente avançado
T4	Tumor metastático
TNM	Sistema de estadiamento clínico, T-tumor, N-linfonodo, M-metástase
μ	micra
χ^2	Qui-quadrado
x	nível de significância estatística
1 M	um molar

	PÁG.
Tabela 1- Critérios clinicopatológicos utilizados no estadiamento dos pacientes com HPB e CaP.....	41
Tabela 2- Distribuição dos pacientes de acordo com o diagnóstico histológico, idade, PSA e raça.....	44
Tabela 3- Seqüência dos primers utilizados nas reações de PCR para <i>CYP1A1</i>	49
Tabela 4- Distribuição dos pacientes com adenocarcinoma da próstata e hiperplasia prostática benigna de acordo com os genótipos estudados.....	55
Tabela 5- Comparação estatística da população fumante e não fumante e a distribuição dos genótipos dos pacientes com adenocarcinoma da próstata.....	56
Tabela 6- Comparação entre os diferentes genótipos e a avaliação clínica dos pacientes. Doença localizada = T1 + T2 avançada = T3 + T4 de acordo com o T.N.M.....	57
Tabela 7- Comparação entre os diferentes genótipos e a avaliação clínica dos pacientes com relação ao PSA.....	58
Tabela 8- Comparação entre os diferentes genótipos e a avaliação clínica dos pacientes com relação ao escore de Gleason.....	60

	PÁG.
Figura 1- Esquema de pontos de controle do ciclo celular.....	23
Figura 2- Grupo de inibidores do ciclo que atuam impedindo ou regulando negativamente as vias sinalizadoras da progressão no ciclo de divisão celular.....	26
Figura 3- Distribuição dos pacientes segundo anatomo-patológico.	40
Figura 4- Distribuição dos pacientes segundo tratamento.....	42
Figura 5- Distribuição dos pacientes portadores de CaP segundo estadiamento clínico.....	42
Figura 6- Distribuição dos pacientes segundo escore de Gleason...	43
Figura 7- Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo exemplificando os resultados de PCR-multiplex para <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> em pacientes com câncer de próstata..	47
Figura 8- Gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo exemplificando os resultados de PCR de <i>GSTP1</i> em pacientes com câncer de próstata.....	48
Figura 9- Gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo exemplificando os resultados de PCR de <i>CYP1A1</i> em pacientes com câncer de próstata.....	49
Figura 10- Gel de SSCP exemplificando os resultados do padrão de bandas encontrado para os genótipos de <i>GSTO1</i> em indivíduos com câncer de próstata.....	51
Figura 11- Gel de SSCP exemplificando os resultados do padrão de bandas encontrado para os genótipos de <i>GSTO1</i> em indivíduos com câncer de próstata.....	51

	PÁG.
Gráfico 1- Comparação dos diferentes genótipos das <i>GSTT1</i> e <i>GSTM1</i> em portadores de HPB e CaP.....	62
Gráfico 2- Comparação dos diferentes genótipos da <i>GSTM1</i> em portadores de HPB e CaP.....	63
Gráfico 3- Comparação dos diferentes genótipos da <i>GSTT1</i> em portadores de HPB e CaP.....	64
Gráfico 4- Comparação entre os diferentes genótipos do <i>GSTP1</i> em pacientes portadores de HPB e CaP.....	65
Gráfico 5- Comparação entre os diferentes genótipos do <i>GSTO1</i> em pacientes portadores de HPB e CaP.....	66
Gráfico 6- Comparação entre os diferentes genótipos de <i>CYP1A1 m1</i> em pacientes portadores de HPB e CaP.....	67

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é atualmente a neoplasia maligna mais prevalente no mundo, após os tumores de pele. A incidência dessa enfermidade tem crescido nas últimas décadas devido, principalmente; ao aumento da longevidade da população.

Atualmente o CaP tem sido detectado em estágios menos avançados do que no passado. As melhorias dos métodos de diagnóstico contribuem para a detecção precoce dessa neoplasia.

Os polimorfismos de genes que codificam enzimas envolvidas na metabolização de drogas e de xenobióticos, como as do sistema Glutathione S-transferase (GST) e Citocromo P450 (CYP), podem estar implicados no risco e prognóstico para neoplasias.

Foram avaliados os genótipos de *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTO1* e *CYP1A1* em 125 pacientes portadores de câncer de próstata e em 100 indivíduos com hiperplasia prostática benigna. Tempo e atividade ocupacional, tabagismo e outros dados relevantes da história natural da doença foram obtidas por meio de entrevistas.

Não foram encontrados quaisquer associações entre os genótipos estudados e o risco de câncer de próstata, tanto avaliando os diferentes genótipos em separado como em combinações, através de análise de regressão logística uni ou multivariada. Não houve associação entre os genótipos estudados e fatores clínicos de risco para câncer de próstata ou quaisquer parâmetros de agressividade do tumor ao diagnóstico ou durante o seguimento.

Nossos dados permitem concluir que os genótipos de *GST* e *CYP1A1* não estão associados à susceptibilidade ao câncer de próstata ou à sua evolução na população brasileira estudada.

ABSTRACT

Prostate cancer is currently the most common malignancy worldwide, second only to skin tumors. The incidence of prostate cancer has risen dramatically over the last decade, more than can be explained just by the increase in longevity. It is also apparent that prostate cancer is now being detected at less advanced stages than in the past. Increased awareness of the disease and improved detection methods are thought to contribute to this earlier detection.

The polymorphic inheritance of human drug-metabolizing enzymes, such as those encoded by the Glutathione-S-Transferase (GST) and the Cytochrome P450 (CYP) systems, may be implicated in both cancer risk and prognosis.

We compared *GSTT1*, *GSTM1*, *GSTO1*, *GSTP1* e *CYP1A1* genotypes of 125 prostate cancer and 100 benign prostatic hyperplasia patients. Lifetime occupational history, cigarette-smoking, and other anamnestic data were obtained through interviews.

None of the studied polymorphisms was found associated to prostate cancer risk either considered in separate or in combination, in univariate or multivariate regression logistic analysis. Also, there was no association between genotypes and possible clinical factors of risk, or any parameter of tumor aggressiveness at diagnosis or during follow-up.

Our data suggest that *GST* and *CYP1A1* genotypes are not associated to the susceptibility to prostate cancer or its outcome in the Brazilian population.

1- INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é a segunda neoplasia mais prevalente nos homens brasileiros segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), que prevê a ocorrência de 47.280 casos novos em 2006 (<http://www.inca.gov.br>). Estima-se a ocorrência de 51 casos novos a cada 100 mil homens (<http://www.inca.gov.br>). Devido à sua alta incidência e gravidade, o CaP é considerado um problema de saúde pública.

Considera-se o CaP um câncer da terceira idade, uma vez que cerca de três quartos dos casos em todo o mundo ocorrem a partir dos 65 anos de idade (<http://www.inca.gov.br>). Menos de 1% dos casos acomete indivíduos com idade inferior a 40 anos. Observa-se a incidência acumulada da doença em cerca de um em cada sete homens que atingem a oitava e nona décadas de vida (PARKER *et al*, 1996; JEMAL *et al*, 2003). Acredita-se que, a exemplo de outros tipos de tumor, fatores genéticos, hereditários, hormonais, fatores de crescimento, exposição ambiental, ocupacional, alterações em genes somáticos e comportamento dietético estejam relacionados ao desenvolvimento do CaP (BRAWLEY *et al*, 1996; METTLIN *et al*, 1997; GRONBERG *et al*, 1997). A incidência dessa doença mostra íntima relação com a raça, idade, bem como fatores geográficos, com altas taxas de prevalência e mortalidade nos homens afro-americanos e com menor incidência no homem asiático (CARTER *et al*, 1992; CARTER *et al*, 1993; MILLER *et al*, 1996).

A alta frequência desta doença justifica os esforços na busca de melhores métodos de detecção precoce e de marcadores de predisposição e de prognóstico, visando melhorar o planejamento terapêutico.

O PSA produzido pelo tecido prostático e responsável por liquefazer o coágulo seminal; tem sido utilizado desde 1986 para o diagnóstico e seguimento do CaP (PARTIN & OESTERLING, 1987); é portanto o marcador sérico de maior utilidade no diagnóstico, prognóstico e monitorização dos tratamentos para o CaP. Essa glicoproteína dosada no soro apresenta, entretanto, o inconveniente de estar alterada em certas ocasiões que não correspondem necessariamente ao CaP, como por exemplo: prostatites, isquemias, infartos prostáticos, manipulações

(cistoscopia, sondagem uretral, biópsias protáticas), uso de medicações (inibidores da 5- α -redutase, antiandrogênios) (PARTIN & OESTERLING, 1994; BABAIAAN *et al*, 1996).

A busca de um marcador tumoral específico e de prognóstico no CaP, tem incentivado várias pesquisas genéticas e da biologia molecular do câncer. Perfis genéticos poderão ser muito interessantes na definição de biomarcadores específicos que auxiliem o planejamento das abordagens clínicas, cirúrgicas e, futuramente, a utilização da terapia e engenharia genética no tratamento e prevenção do câncer de próstata. Marcadores morfológicos, genéticos e bioquímicos deverão servir de base para a identificação de casos de CaP de alto risco, que são candidatos em potencial para procedimentos mais radicais.

Infelizmente, não temos ainda marcadores biológicos estabelecidos que passam definir e monitorar, de modo qualitativo e quantitativo, o risco de um indivíduo desenvolver a doença, ou que permitam detectar lesões pré-malignas precoces, as suas chances de progressão e o potencial de reversibilidade do processo de carcinogênese (PERERA & WEINSTEIN 2000; SRINIVAS *et al*, 2002; MEDEIROS *et al*, 2004; CARTER & ISAACS, 2004).

1.1- Evolução natural do câncer de próstata

Muitos homens portadores de CaP mantêm-se assintomáticos e morrem por outras causas não relacionadas ao câncer propriamente dito. O número estimado de homens portadores de câncer prostático latente, isto é, um tumor que está presente na glândula, porém que não será detectado ou diagnosticado na vida do paciente, é maior que os portadores da doença clinicamente detectados (BARON & ANGRIST, 1941; OOTA, 1961; FRANKS, 1964; LUNDBERG, 1970; WYNDER, 1971; AKAZAKI, 1973; HUTCHISON, 1976; DHOM, 1979). Não se sabe o porquê de alguns tumores permanecem clinicamente silenciosos enquanto outros são agressivos. Esse fato tem sido

atribuído a vários fatores, entre os quais a idade avançada no momento do diagnóstico e a um crescimento tumoral lento (RUIJTER *et al*, 1999). No entanto, acredita-se que outros fatores como raça, cultura, dieta, hormônios, e, particularmente, fatores genéticos relacionados à velocidade de crescimento e à diferenciação celular, possam estar envolvidos (FRANKS, 1973; ROUS, 1976).

A transformação maligna das células do epitélio prostático e a progressão para o CaP são o resultado de uma série complexa de eventos que sofrem influência de fatores ambientais e genéticos (HAAS *et al*, 1997).

1.2- Fatores genéticos envolvidos na etiopatogenia

É sabido que o ciclo celular, a divisão e a diferenciação celular resultam da ação de oncogenes e de genes supressores de tumores que mantêm um balanço na proliferação, diferenciação e morte celular por apoptose (BISHOP *et al*, 1987; BISHOP *et al*, 1991; VISAKORPI *et al*, 1992; HARTWELL *et al*, 1994).

O ciclo celular, que se estende por 18 a 25 horas na célula prostática, à semelhança da maioria das células, divide-se em quatro fases consecutivas: G1 (intervalo pós-mitótico e pré-síntese de DNA), S (fase de síntese de DNA), G2 (intervalo pós-síntese do DNA e pré-mitótico) e M (mitose). As fases mais importantes do ciclo são a fase S, onde ocorre a síntese de DNA, e a fase M, quando os pares de cromossomos se replicam (fase de duplicação celular). As fases G1, S e G2 compreendem 90% do ciclo celular. Durante todo o ciclo, existem dois pontos de restrição. O primeiro na fase G1/S, denominado *start 1* e o segundo na fase G2/M, chamado *start 2* (Figura 1). As células que estão fora do ciclo celular encontram-se na fase G0, podendo retornar ao ciclo a qualquer momento, dependendo de estímulos apropriados (RABENHORST *et al*, 1993; RABENHORST *et al*, 1994; ALBERTS *et al*, 1997; JOHNSON *et al*, 1999).

As diferentes fases do ciclo celular estão reguladas por duas classes principais de proteínas: as cinases, que transferem o grupo fosfato do ATP para os aminoácidos das proteínas, e as ciclinas, que são reguladoras das cinases. A expressão das ciclinas e a associação das mesmas às cinases dependentes de ciclinas (CDKs) permitem que as células ultrapassem os pontos de restrição. A ciclina B regula CDKs no ponto G2/M e as ciclinas C, D e E são expressas no início da fase G1 (Figura 2). O ciclo celular é regulado por um conjunto de reações bioquímicas independentes que controlam a sua progressão. Muitas dessas reações envolvem cascatas de fosforilação de proteínas reguladoras, as quais direcionam eventos bioquímicos coordenados, como a síntese de DNA na fase S e o processo de mitose (HARPER *et al*, 1992; HALL *et al*, 1995; ALBERTS *et al*, 1997; JOHNSON *et al*, 1999).

Todos os fatores que estimulam a entrada de uma célula no processo de divisão ou sua progressão no ciclo celular são chamados de fatores proto-oncogênicos. A ativação dos proto-oncogenes em oncogenes, que pode ocorrer através de mutações puntiformes, amplificações, deleções, translocações gênicas ou por ativação e autofosforilação dos receptores, induz a produção de sinais mitogênicos da superfície da célula para o núcleo, sinalizando a transcrição e promovendo a divisão celular. Os proto-oncogenes codificam proteínas que podem ser divididas em 5 grupos de acordo com as respectivas funções: EGF-fatores de crescimento epidérmico, EGFR-receptores de fatores de crescimento epidérmico, proteínas transdutoras de sinais citoplasmáticos e proteínas nucleares, incluindo os fatores de transcrição (ALITALO *et al*, 1986; BISHOP *et al*, 1987; VARMUS *et al*, 1989; BISHOP *et al*, 1991; HOOLLYWOOD *et al*, 1992).

Em oposição aos fatores indutores do ciclo celular, os genes supressores tumorais têm uma ação inibitória do ciclo celular e ativam o reparo do DNA ou a indução da apoptose (Figura 2). Quando funcionantes, as proteínas por eles codificadas são fundamentais para a inibição dos mecanismos indutores de carcinogênese. Por outro lado, a desregulação dos seus efeitos supressivos, a

qual pode ocorrer através de perdas alélicas do gene ou por defeitos em seu funcionamento, pode levar à formação de um processo neoplásico (KNUDSON *et al*, 1971; VOLGELSTEIN *et al*, 1988; FEARON *et al*, 1990; LEVINE *et al*, 1991; VISA KORPI *et al*, 1992; HARTWELL *et al*, 1994).

Sabemos que são necessárias alterações múltiplas, sucessivas e seqüenciais em diferentes genes para que ocorra a transformação tumoral (ALITALO *et al*, 1986; BISHOP *et al*, 1987; VARMUS *et al*, 1989; BISHOP *et al*, 1991; HOOLLYWOOD *et al*, 1992).

No entanto, algumas alterações genéticas podem produzir um fenômeno que propicia a ocorrência de novas mutações. Este fenômeno, chamado de instabilidade genética, é importante para explicar o comportamento biológico de alguns tumores que, ao acumularem vantagens de crescimento em relação a outros, se tornam mais agressivos (PITOT *et al*, 1993; RABENHORST *et al*, 1993; WONG *et al*, 1994; LAM *et al*, 1996; SMAALAND *et al*, 1996; TSIHLIAS *et al*, 1999). À semelhança de outros tumores, fenômenos relacionados a instabilidade genética (como a perda de heterozigotidade, indicando o desaparecimento de genes supressores tumorais) parecem ser um evento precoce nos tumores de próstata (HU *et al*, 2005). Assim, é possível que em alguns indivíduos, a perda de alguns genes supressores tumorais ou ativação de determinados proto-oncogenes e sua transformação em oncogenes possam determinar maior instabilidade genética. As sucessivas mutações subseqüentes que poderiam ocorrer no genoma instável destes casos poderiam levar a novas mutações vantajosas em termos de crescimento e diferenciação das células tumorais, explicando uma maior agressividade e pior evolução clínica nestes casos.

1.3- Fatores ambientais envolvidos na etiopatogenia do câncer de próstata

Existem diferenças marcantes na incidência do CaP em diferentes regiões do Brasil e do mundo.

Da mesma maneira que se observa nos diversos países do globo, no Brasil, a incidência do CaP possui uma variação em relação aos seus estados. Por exemplo, a taxa de novos casos de CaP varia de 48,48 casos/100.000 habitantes em Pernambuco para somente 16,2 casos/100.000 no estado da Paraíba ([http://www.inca.gov.br/estimativa /2006](http://www.inca.gov.br/estimativa/2006)). Muito embora essas diferenças podem

ser, em parte, atribuídas às discrepâncias na capacidade de atendimento do sistema de saúde de cada região, é provável que outros fatores estejam envolvidos.

Da mesma forma, diferenças na mortalidade do CaP em vários países do mundo vem sendo atribuídas a fatores genéticos e ambientais além dos fatores sociais como o acesso aos meios de assistência à saúde (HAAS *et al*, 1997).

Uma série de estudos epidemiológicos tem demonstrado que vários fatores ambientais, incluindo irradiação ultra-violeta, poluentes, cigarro e dieta, bem como fatores geográficos e raciais devem contribuir para o desenvolvimento do CaP (EKMAN, 1999; HAYES *et al*, 1999; KOLONEL *et al*, 2000; HSING & DEVESSA, 2001; QUINN, 2002). Uma série de estudos de migração também tem mostrado a importância do estilo de vida e dos fatores ambientais no desenvolvimento do CaP (HSING & DEVESSA, 2001; GRONBERG, 2003).

Fatores dietéticos, androgênios e estilo de vida têm sido reconhecido como preditores de risco para o CaP (WU *et al*, 1991; ROSS *et al*, 1998).

Um grande estudo de coorte, realizado no Hawaii (EUA), sugere que a dieta rica em gordura animal e pobre em verduras/frutas está associada com aumento do risco para o CaP (GIOVANUCCI *et al*, 1993). Muito embora os componentes da carne vermelha que causariam o câncer não tenham sido identificados, acredita-se que, quando cozidas em altas temperaturas ou mesmo grelhadas, as carnes vermelhas produzem aminas aromáticas heterocíclicas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que são substâncias reconhecidamente carcinogênicas (LIJINSKY *et al*, 1964; GROSS *et al*, 1993; MORGENTHALER *et al*, 1995; KNIZE *et al*, 1997). Já os vegetais seriam protetores contra a neoplasia prostática por mecanismo desconhecido (CHAN *et al*, 2001). Agentes anti-oxidantes como o licopeno, selênio, vitamina E também tem sido considerados capazes de reduzir o risco de CaP a partir de estudos de coorte que, infelizmente, são limitados a populações específicas (CLARK *et al*, 1997; CLARK *et al*, 1998; HEINOMEN *et al*, 1998; GANN *et al*, 1999; CHEN *et al*, 2001).

1.4- Bases moleculares para a inter-relação entre fatores ambientais e o desenvolvimento do câncer de próstata

Uma susceptibilidade maior ou menor ao câncer advém da inter-relação entre os fatores ambientais de agressão às células prostática, chamados de fatores xenobióticos, e os fatores genéticos que cada um de nós possui, e que são capazes de neutralizar tais carcinógenos ambientais. O metabolismo de xenobióticos ocorre devido à ação de uma série de enzimas oxidativas que podem ser didaticamente divididas em fases I e II. As enzimas de fase I inativam os carcinógenos ou, eventualmente, ativam alguns compostos de maneira a torná-los mais facilmente identificáveis pelas enzimas de fase II, consideradas principalmente protetoras já que elas detoxificam estes agentes neutralizando-os ou eliminando-os (GUENGERICH, 1997).

Entretanto, uma série de polimorfismos existentes nos genes codificadores destas enzimas modificam a sua ação tornando-as mais ou menos ativas. Os polimorfismos genéticos das enzimas envolvidas na bio-transformação dos agentes carcinógenos tem sido considerados como importantes fatores na gênese do câncer prostático (RESZKA *et al*, 2002; KESHAVA *et al*, 2004).

1.4.1- Sistema glutathiona S-transferase

O sistema Glutathiona S-Transferase (GST) consiste em um grande grupo multigênico de enzimas de detoxificação essencial para a proteção celular (HAYES *et al*, 1995). Sua ação baseia-se na conjugação de xenobióticos com a glutathiona. A conjugação com a glutathiona, além de diminuir a reatividade, aumenta a solubilidade de xenobióticos hidrofóbicos e reduz a meia-vida desses compostos no corpo. Deste modo, o conjugado é transportado para fora da célula por uma bomba de efluxo de glutathiona S-conjugada ATP-dependente, e a seguir é eliminado pela urina e bile (HAYES *et al*, 1995).

Estas enzimas catalisam e conjugam vários carcinógenos, drogas terapêuticas, toxinas ambientais e produtos de “stress” oxidativo que podem estar associados com a etiologia do câncer de próstata (STRANGE *et al*, 1998; THIER *et al*, 2003). Além disso, relacionam-se com a atividade catalítica de metabólitos endógenos e hormônios esteróides, importantes determinantes no desenvolvimento do câncer de próstata (GSUR *et al*, 2001).

Atualmente são conhecidas oito classes distintas de GST: *Alpha*, *Kappa*, *Mu*, *Omega*, *Pi*, *Sigma*, *Theta* e *Zeta*.

A expressão do gene *GSTP1* vem sendo associada ao desenvolvimento de uma série extensa de neoplasias, particularmente relacionadas ao tabagismo, incluindo tumores de cabeça e pescoço, mama, pulmão e próstata (STUCKER *et al*, 2002; OUDE *et al*, 2003). Um polimorfismo envolvendo a troca de uma alanina por uma valina, resultando em uma substituição de aminoácido Ile/Val no exon 5 (I105V) produz 3 variantes alélicas, as variantes em homozigose Ile/Ile e Val/Val e a variante em heterozigose Ile/Val. As variantes Ile/Val e Ile/Ile possuem estabilidade e atividade específica menores do que as das enzimas que contém a isoforma Val/Val (ALI-OSMAN *et al*, 1997). Estudos recentes deste gene em nosso laboratório mostram que este polimorfismo constitui um importante fator de risco para o câncer de tireóide (GRANJA *et al*, 2004).

Por outro lado, se prover proteção contra agentes carcinógenos é benéfico, a ação exagerada das GSTs pode conferir à célula resistência contra drogas e outros compostos que poderiam eventualmente serem utilizados no tratamento do câncer. Portanto, se por um lado, a atividade das GSTs pode beneficiar o organismo metabolizando substâncias nocivas ao organismo e conferindo menor susceptibilidade a neoplasias, por outro pode ser responsável pelo fracasso de um tratamento quimioterápico ao impedir a ação de drogas anti-neoplásicas.

Assim, a hiperexpressão de *GSTP1* causa resistência a diversas drogas anti-neoplásicas e a presença de polimorfismos no “locus” desse gene pode diminuir a eficácia terapêutica de quimioterápicos (HENDERSON *et al*, 1988).

Os genes que codificam as isoenzimas do sistema glutathione S-transferase *GSTT* e *GSTM* possuem uma variante alélica nula na qual o gene inteiro está ausente e, portanto, não existe produção da respectiva enzima. Acredita-se que, por não possuírem tais enzimas, indivíduos com o genótipo nulo tornam-se mais susceptíveis a desenvolverem câncer; por outro lado, estes indivíduos respondem melhor a drogas quimioterápicas.

A enzima *GSTM1* detoxifica metabólitos químicos reativos derivados do cigarro, como o benzo[a]pireno e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (KETTERER *et al*, 1992). *GSTT1* metaboliza várias substâncias com potencial carcinogênico, incluindo os mono-halometanos, os quais são amplamente utilizados como agentes metilantes, pesticidas e solventes (GUENGERICH *et al*, 1995). Vários estudos epidemiológicos sugeriram que o genótipo nulo do gene *GSTM1*, *GSTT1* ou da combinação de ambos está associado à maior susceptibilidade a uma série de cânceres. Estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que a variante nula duplamente homozigota aumenta o risco para câncer de tireóide em 2.6 vezes (MORARI *et al*, 2002). O gene *GSTT1* é expresso em grande quantidade na próstata, sugerindo que a ativação de compostos para os intermediários genotóxicos de *GSTT1* poderia aumentar o risco de neoplasia prostática (REBBECK *et al*, 1999).

A classe Omega das GSTs, recentemente descrita (TONG *et al*, 1998; BORD *et al*, 2000; YIN *et al*, 2001), está envolvida na biotransformação de compostos endógenos e exógenos, entre eles vários carcinógenos importantes, como o arsênico (um contaminante universal da água) e vários outros produtos de “stress” oxidativo e drogas terapêuticas (HAYES *et al*, 1995). Sabe-se que existe a expressão de *GSTO* em tecidos prostáticos, porém sua função fisiológica ainda não é bem conhecida (MARIOT *et al*, 2000; DULHUNTY *et al*, 2001). Além disso,

existem evidências de que *GSTO1* modula receptores de rionodina (RyR), que são canais intracelulares de cálcio do retículo endoplasmático de várias células, envolvidos com a homeostase de Ca^{2+} (MARIOT *et al*, 2000; DULHUNTY *et al*, 2001). Sabe-se que os íons cálcio desempenham papel importante no processo de apoptose celular. A apoptose celular é aumentada quando os receptores de rionodina são ativados em células de câncer da próstata, de forma que a inibição desses receptores poderia proteger células mutadas contra a apoptose causada por mobilização de Ca^{2+} de reservas RyR-sensíveis (MARIOT *et al*, 2000; PAN *et al*, 2000). Uma troca de base C para A na posição 419, causando uma substituição do aminoácido alanina por um aspartato na posição 140 do éxon 4 pode reduzir a atividade enzimática da *GSTO* (TANAKA-KAGAWA, *et al* 2003; WHITBREAD *et al*, 2003).

1.4.2- Sistema CYP e o gene *CYP1A1*

O gene *CYP1A1* pertence à família multigênica do citocromo P450 (CYP) cujas enzimas têm papel importante na biotransformação de muitos xenobióticos (GUENGERICH *et al*, 1997). As várias enzimas do citocromo P450 são chamadas de enzimas de fase I, pois são responsáveis pela monoxidação inicial dos xenobióticos em seu processo de excreção, além de serem responsáveis pela introdução de grupos funcionais, permitindo que as enzimas de fase II reconheçam e atuem sobre o composto xenobiótico (GUENGERICH *et al*, 1997). O gene *CYP1A1* codifica a proteína P4501A1, a qual catalisa a oxidação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em produtos fenólicos e epóxidos (GONZALEZ *et al*, 1998). A ativação desta enzima ocorre pela ligação do composto indutor ao receptor Ah (*aryl hidrocarbon*) que inicia o processo de transcrição dos componentes do metabolismo de xenobióticos (KAWAJIRI *et al*, 1993). Esses compostos indutores podem ser hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, flavonóides de plantas e derivados de indol (MCDONNEL *et al*, 1992). Cerca de 10% da população caucasóide apresenta uma forma polimórfica da enzima *CYP1A1* a qual vêm sendo associada ao risco de neoplasias de

brônquios, laringe e cavidade oral, particularmente em indivíduos fumantes (NEBERT *et al*, 1996). A variante alélica m1 do gene *CYP1A1* apresenta uma substituição de nucleotídeos, de T por C, na região codificadora, associada à elevada atividade enzimática. Esse polimorfismo já foi relacionado ao desenvolvimento de câncer de próstata em famílias japonesas (SONG *et al*, 2001; SUZUKI *et al*, 2003).

CONTROLE INTERNO

- *tamanho adequado?*
- *nutrientes suficientes?*
- *adesão adequada?*

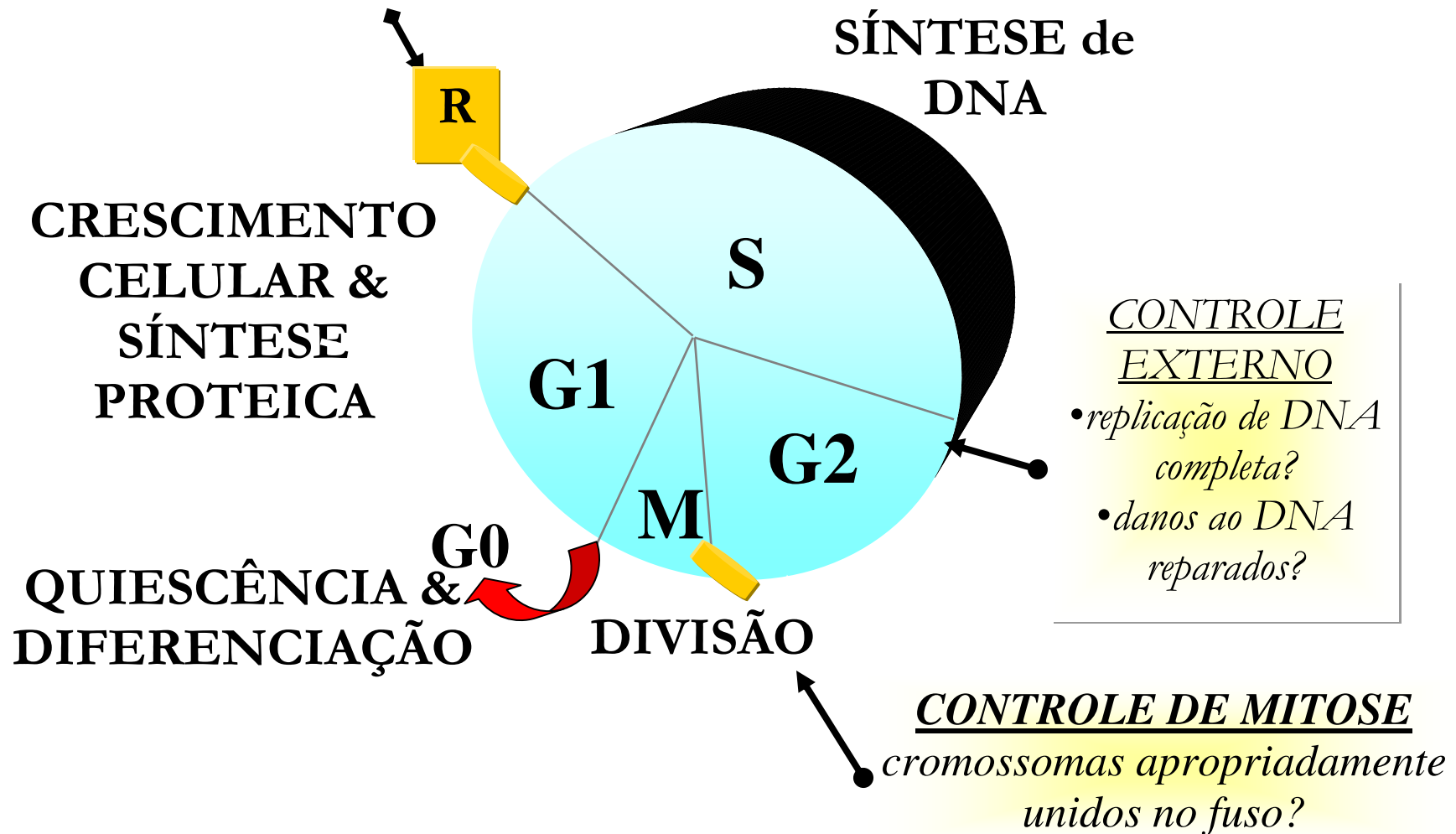


Figura 1- Esquema de pontos de controle do ciclo celular

DNA danificado

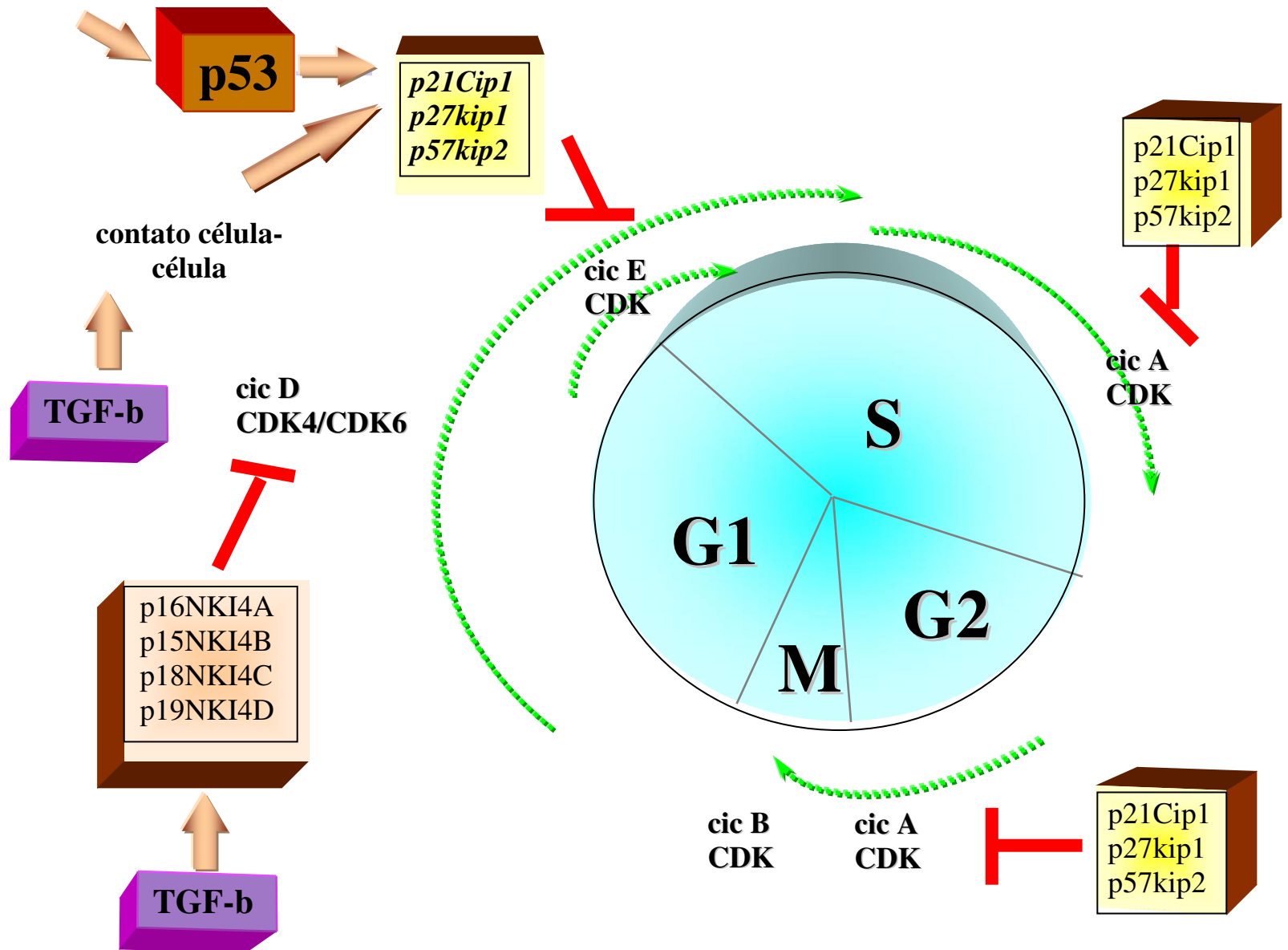


Figura 2 - Representação dos grupos de inibidores do ciclo celular

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Correlacionar a influência de polimorfismos dos genes *GSTM1* (*Mu*), *GSTO1* (*Omega*), *GSTP1* (*Pi*), *GSTT1* (*Teta*) e *CYP1A1* com a ocorrência do CaP buscando definir se estes polimorfismos constituem fator de risco individual ou em combinação para a doença.

2.2- Objetivos específicos

- 2.2.1-** Comparar os perfis genotípicos da população portadora de HPB e de CaP para estabelecer genótipos de risco para neoplasia;
- 2.2.2-** Correlacionar tais perfis genotípicos com outros fatores epidemiológicos (raça) e laboratorial (PSA) reconhecidos como de risco para o CaP;
- 2.2.3-** Correlacionar os perfis genotípicos com o estadiamento (T.N.M.) dos pacientes e anatomo-patológico (Gleason);
- 2.2.4-** Correlacionar os perfis genotípicos com a resposta terapêutica dos pacientes submetidos à radioterapia conformacional da próstata e prostatectomia radical.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Pacientes

Este estudo prospectivo do tipo caso-controle foi realizado a partir do sangue periférico de 225 indivíduos portadores de sintomas do trato urinário inferior consecutivamente atendidos, no período de janeiro de 2003 a janeiro de 2004, no Ambulatório de Urologia do Hospital Irmãos Penteado e Irmandade de Misericórdia de Campinas. Foram incluídos no estudo os pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Informado, de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa local e da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os pacientes responderam a um protocolo de perguntas (anexo 2), aplicado pelo autor, contendo os dados clínicos necessários para esta pesquisa, os quais foram comparados com os respectivos dados dos prontuários médicos, como anatomo-patológico, idade de aparecimento do tumor, tipo histológico do tumor, valores do PSA, toque retal, Gleason, estadiamento clínico e tratamento. O questionário incluía a avaliação do estilo de vida, como história ocupacional e profissional, hábito dietético, incluindo a ingestão de carne vermelha; consumo de drogas, álcool e tabagismo.

Os pacientes foram separados em dois grupos: a categoria dos fumantes e os não fumantes. O primeiro incluía indivíduos que consumiram no mínimo 20 maços (20 cigarros por maço) de cigarro por um ano, no mínimo por um período de 5 anos.

3.1.1- Critérios de inclusão

Para que os pacientes fossem incluídos no estudo era necessário que apresentassem diagnóstico estabelecido de câncer prostático ou hiperplasia prostática benigna, confirmados por biópsia trans-retal ou por exame de peça cirúrgica.

Os estudos clínicos (história clínica, exame físico geral, exame urológico incluindo toque prostático), laboratorial (exames hematológicos gerais, urina I, antígeno prostático específico (PSA) e fosfatase alcalina) e de imagens (ultra-som trans-retal da próstata, cintilografia óssea, tomografia computadorizada do abdome/pelve e radiografia de tórax), foram realizados e analisados sistematicamente em todos os portadores de CaP pelo mesmo observador (o autor). Utilizou-se como critério para estadiamento a classificação proposta pela União Internacional Contra o Câncer e denominada de T.N.M. (Tumor, Nódulo, Metástase) (SOBIN *et al*, 1997).

3.1.2- Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com história pregressa de neoplasia e história de câncer da próstata na família.

3.2- Caracterização da amostra

De um total de 225 pacientes (CaP) incluídos no estudo, 100 eram portadores de HPB e 125 de CaP (Figura 3). Na tabela 1 resumimos as características clínicas, os parâmetros de agressividade ao diagnóstico e o seguimento dos pacientes. As características demográficas e de estilo de vida de ambos os grupos, incluindo o consumo de álcool, carne vermelha, vegetais e exercícios físicos, foram similares.

Desses 125 pacientes, quarenta e oito foram primariamente submetidos a prostatectomia radical, 42 pacientes a radioterapia conformacional prostática, 1 paciente a crioterapia, 10 a terapia hormonal medicamentosa/bloqueio hormonal (análogo LHRH e/ou anti-androgênio), 14 a terapia hormonal cirúrgica/bloqueio hormonal (orquiectomia) e 10 ao acompanhamento clínico (Figura 4). Três pacientes que mantiveram os níveis de PSA elevados após cirurgia radical

foram submetidos à radioterapia na loja prostática. Outros 4 pacientes que evidenciaram persistência da doença após cirurgia (dosagens de PSA>0,2 ng/ml) receberam terapia hormonal medicamentosa (bloqueio hormonal). Três pacientes que apresentaram tumor hormônio resistente e com doença disseminada foram submetidos à quimioterapia sistêmica. Os pacientes portadores de CaP foram seguidos por um período de 37 a 40 meses (média 33 meses) com dosagens sérica periódicas de PSA, de acordo com o protocolo do Serviço de Urologia da Irmandade de Misericórdia de Campinas.

A maioria dos casos (83%) foi diagnosticada em estágio clínico localizado da doença (#T2) e grupo de risco intermediário, ou seja, escore de Gleason 2-6 (62% dos casos). Foram incluídos 19 pacientes com estágio clínico T1 e 75 pacientes com estágio clínico T2 que foram submetidos à radioterapia ou prostatectomia radical. Dezesete (17) pacientes tiveram estadiamento clínico T3 e apenas um (1) T4. Tivemos 13 casos em que o estadiamento clínico não foi notificado (Figura 5).

Como verificamos na figura 4, o tratamento do CaP foi predominantemente por meio da prostatectomia radical (38,4%) (por via retropúbica) e da radioterapia conformacional (33,6%). Entre as modalidades terapêuticas indicadas para quadros mais avançados, houve uma discreta preferência entre os pacientes para a orquiectomia (11,2%) comparado com a hormonioterapia medicamentosa (8%). Um contingente reduzido de pacientes optou pelo acompanhamento (8%).

Como se depreende na figura 6, a maioria dos pacientes (57,6%) se apresentou com escore de Gleason até 6, o que em geral se associa a casos de melhor prognóstico. Observou-se que 36%, dos pacientes avaliados (CaP), possuíam escore de Gleason 7 (3 + 4 ou 4 + 3), o que corresponde a casos de comportamento biológico mais agressivo.

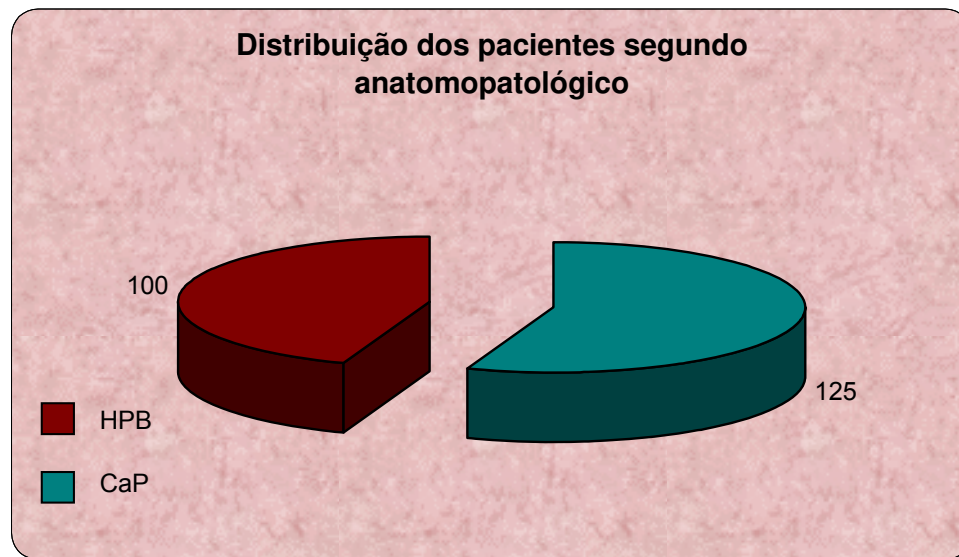


Figura 3- Distribuição dos pacientes segundo anatomopatológico

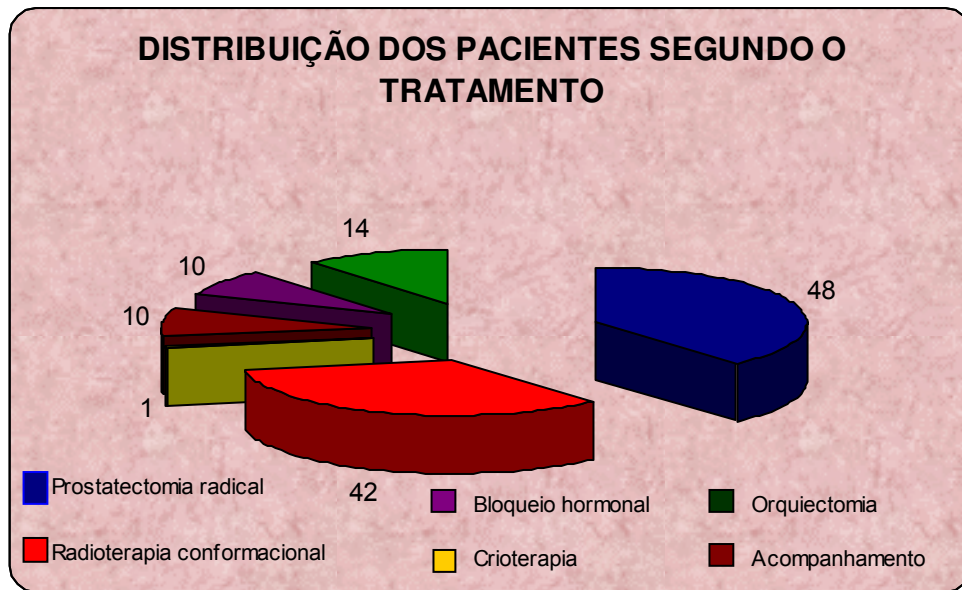


Figura 4- Distribuição dos pacientes segundo o tratamento

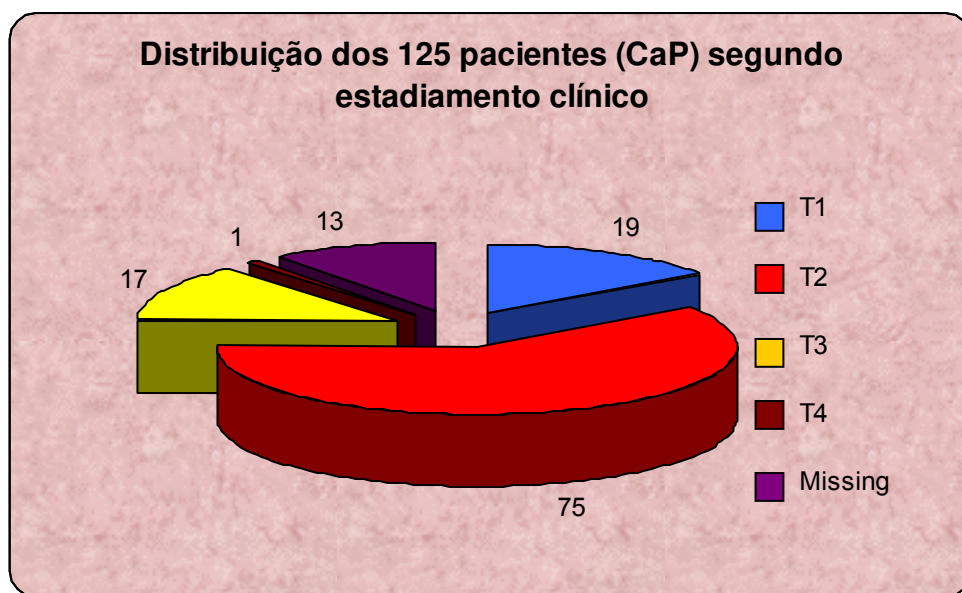


Figura 5- Distribuição dos pacientes portadores de CaP segundo estadiamento clínico

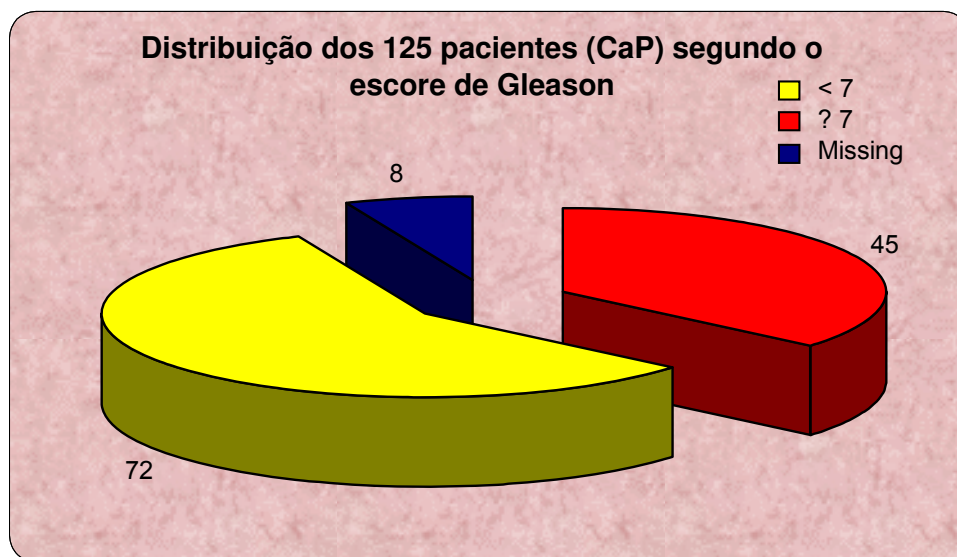


Figura 6- Distribuição dos 125 pacientes segundo o escore de Gleason

3.2.1- Idade

A média das idades dos pacientes foi de 64 anos (variando de 40 a 84 anos), nos pacientes com HPB e de 69 anos (variando de 52 a 92 anos), nos pacientes com CaP (Tabela II). Os pacientes com CaP (89%) possuíam freqüentemente idade maior que 60 anos comparados com os portadores de HPB (31%) ($\chi^2=14.84$; $p<0.001$).

3.2.2- Raça

Entre os pacientes com HPB, 74 eram de cor branca e 16 pacientes não branco; entre os pacientes com câncer da próstata, 90 pacientes eram brancos e 22 não brancos.

Não foi encontrado diferença, entre os pacientes portadores de HPB e neoplasia prostática, em relação à raça (82% brancos e 18% não brancos vs 80% brancos e 20% não brancos).

3.2.3- Fumantes e não fumantes

Não foi encontrado diferença, entre os pacientes portadores de HPB e neoplasia prostática, em relação ao tabagismo (62% fumantes e 38% não fumantes vs 60% fumantes e 40% não fumantes).

3.2.4- PSA

Como esperado os níveis de PSA são mais elevados (30 ± 74) em pacientes com CaP do que os pacientes com HPB (3 ± 3) (MW; $p < 0.001$) (tabela 2).

3.2.5- Gleason

Houve um predomínio dos pacientes com score de Gleason até 6 (57,6%) e 36% com Gleason 7 (3+4 ou 4+3).

Tabela 2- Distribuição dos pacientes de acordo com o diagnóstico histológico, idade, PSA e raça.

	Câncer da Próstata (CaP)	Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) – Controles
	Casos	
Nº	125	100
Idade (anos) *	69,92	64,24
PSA **	9,39	2,18
Raça (branca)	90	74
Raça (não branca)	22	16

* Média

** Mediana

3.3- Tratamento e seguimento

Foi selecionado entre os 125 pacientes portadores de CaP, de modo a avaliar a resposta terapêutica e a sobrevida, 72 pacientes em estágio clínico $\leq$ T2, apresentando escore de Gleason < 7 , PSA ≤ 10 ng/ml (grupo homogêneo), que foi tratado com radioterapia conformacional prostática e prostatectomia radical. O tempo de seguimento médio, nessa análise de subgrupo, foi de 37,6 meses para a radioterapia conformacional e 40 meses para a prostatectomia radical. Sete pacientes faleceram devido à doença específica durante o seguimento. Os resultados terapêuticos foram definidos como favoráveis ou não favoráveis de acordo com os sinais clínicos, elevação do PSA de cada indivíduo e o escore histológico de Gleason inicial. A recorrência da doença foi definida a partir dos seguintes parâmetros: PSA $> 0,2$ ng/ml ou $0,4$ ng/ml acima do nadir em duas amostras consecutivas para prostatectomia radical; nível do PSA $> 0,5$ ng/ml após radioterapia e/ou evidência de doença em qualquer método de imagem. O escore histológico de Gleason foi utilizado, de acordo com a escala de 2 a 10, sendo que os valores menores correspondem a tumores bem diferenciados e os valores maiores a tumores indiferenciados (GLEASON, 1977). Definimos, no nosso estudo, os casos de escore de Gleason < 7 como grupo favorável e de ≥ 7 , como desfavorável, para realizar análise estatística (GLEASON, 1977; EPSTEIN *et al*, 1996).

3.4- Métodos

3.4.1- Extração de DNA de sangue periférico

O DNA das amostras coletadas foi extraído utilizando-se o método padrão do Fenol/Clorofórmio. Inicialmente foi feita a lise das hemácias com tampão (NaCl 10 mM; MgCl₂ 5mM; Tris-HCL 10mM, pH 7.5). A seguir foi feita a lise dos leucócitos com tampão (NaCl 5N; EDTA 0.2M; Tris-HCL 10mM, pH 7,5; Uréia). Foi adicionado SDS (20%) e o produto foi incubado a 37°C por 30 minutos.

O processo de purificação foi feito com Fenol saturado com Tris e Clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1). A precipitação foi feita com Acetato de Sódio (3M), etanol 70% e 100%. O material extraído foi re-suspendido com tampão TE (Tris 10mM e EDTA 1mM).

Após o processo de extração do DNA, uma leitura no Espectrofotômetro foi feita para garantir sua qualidade, considerado adequado para leituras entre 260/280 nm.

3.5- Análise dos polimorfismos

3.5.1- Para os genes *GSTM1* e *GSTT1*

Para a análise dos polimorfismos de *GSTT1* e *GSTM1* utilizamos uma PCR-Multiplex com a co-amplificação do gene da β -globina que foi utilizado como controle para as amostras que possuíam o genótipo nulo para ambos os genes das glutatonas. Utilizamos os primers e condições previamente descritos por Morari *et al*, 2002 e resumidos a seguir. O volume utilizado na PCR foi de 50 μ l, contendo 100 ng de DNA, 50 nM de cada primer (*GSTM1*, *GSTT1* e β -globina), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 μ M de cada nucleotídeo trifosfato, 2,0 mM de $MgCl_2$ e 0.5 U de Taq DNA Polimerase. A PCR foi constituída de 35 ciclos de 94^oC por 45 segundos, com temperaturas de anelamento de 62^oC por 45 segundos e 72^oC por 1 minuto. A fase inicial de desnaturação foi de 2 minutos a 94^oC, e a fase de extensão final foi de 10 minutos a 72^oC. O sistema utilizado foi o MJ PTC-200 PCR. Foi adicionado ao produto final da técnica de PCR azul de bromofenol na proporção de 3:1. Os resultados finais foram analisados posteriormente a partir da visualização sob luz ultra-violeta da amplificação dos genes em géis de agarose 2%, corados com brometo de etídeo (8mg/ml).

A figura 7 exemplifica nossos resultados na identificação de *GSTT1* e *GSTM1*

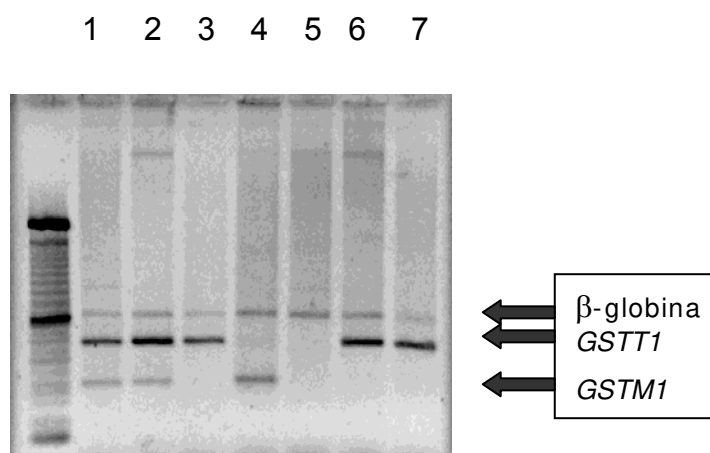


Figura 7- Gel de agarose 2% com o resultado de uma PCR-multiplex de pacientes com câncer de próstata. Amostras 1 e 2 possuem os genes *GSTT1* e *GSTM1*, a amostra 4 apresenta a deleção do gene *GSTT1*, as amostras 3, 6 e 7 apresentam a deleção do gene *GSTM1* e a amostra 5 possui a deleção de ambos os genes. Podemos verificar a presença do DNA pela amplificação do gene da β-globina.

3.5.2- Para o gene *GSTP1*

O gene *GSTP1* foi amplificado com uma PCR simples utilizando os primers em condições previamente descritos por Granja *et al*, 2004 e resumidos a seguir. O volume utilizado na PCR foi de 25 µl, contendo 100 ng de DNA, 50 nM de cada primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 uM de cada nucleotídeo trifosfato, 2,0 mM de MgCl₂ e 0.5 U de Taq DNA Polimerase. A PCR foi constituída de 35 ciclos de 94^oC por 45 segundos, com temperaturas de anelamento de 63^oC por 50 segundos e 72^oC por 1 minuto. A fase inicial de desnaturação foi de 2 minutos a 94^oC, e a fase de extensão final foi de 7 minutos a 72^oC. O sistema utilizado foi o MJ PTC-200 PCR. Os resultados finais foram analisados posteriormente a partir da visualização sob luz ultra-violeta da amplificação dos genes em géis de agarose 2%, corados com brometo de etídeo (8mg/ml). Após confirmar a

amplificação do gene *GSTP1*, as amostras foram submetidas ao processo de Restrição Enzimática (Figura 4). O volume utilizado na restrição enzimática foi de 12,75 µl, contendo 10 µl de PCR da amostra, 0,75 µl de Enzima *A/w261* (BsmAI) e 2 µl de tampão correspondente. O processo de digestão ocorreu a 37°C durante 16 horas e o sistema utilizado foi o MJ PTC-200 PCR. Os resultados finais foram analisados a partir da visualização da restrição enzimática, sob luz ultravioleta, em géis de agarose 3%, corados com brometo de etídeo (8mg/ml), podendo ser classificados como normal, homozigoto e heterozigoto para o gene *GSTP1*.

A figura 8 exemplifica nossos resultados na identificação de *GSTP1*.

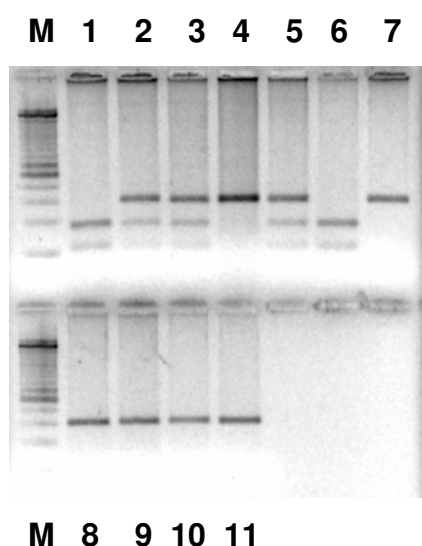


Figura 8- Gel de agarose 3% de *GSTP1*, corado com brometo de etídeo (8mg/ml).

Resultado de uma restrição enzimática de pacientes com câncer de próstata. Amostras 4, 7, 8, 9, 10 e 11 possuem genótipo normal; amostras 1 e 6 possuem genótipo homozigoto e amostras 2, 3 e 5 possuem genótipo heterozigoto para o gene *GSTP1*. O padrão de corrida eletroforética diferencia as variantes de *GSTP1* do padrão normal, o que foi confirmado por sequenciamento direto de 6 amostras representativas desses diferentes padrões de corrida. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático utilizando o Kit Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction.

3.5.3- Para os genes *CYP1A1*

No caso do gene *CYP1A1*, a mesma metodologia e condições acima descritas para *GSTP1* foi utilizada. Foi realizado uma PCR simples, seguida de restrição enzimática. A enzima utilizada foi Msp1 (*Fermentas Life Sciences*) e os primers utilizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3- Seqüências dos primers utilizados nas reações de PCR

Gene *CYP1A1* M1

PRIMER SEQUÊNCIA 5'- 3'	
M1 sense	CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT
M1 antisense	TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT

Para observação dos resultados, fez-se uma eletroforese em gel de agarose 3% corada com brometo de etídeo (8mg/ml). A visualização foi feita sob luz ultravioleta.

A figura 9 exemplifica nossos resultados na identificação de *CYP1A1*.

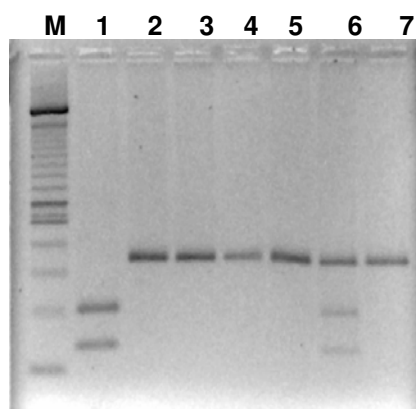


Figura 9- Gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo (8mg/ml). Resultado de uma restrição enzimática de pacientes com câncer de próstata. Amostras 2, 3, 4, 5, e 7 possuem genótipo normal; amostra 1 possui genótipo homozigoto e amostra 6 possui genótipo heterozigoto para o gene *CYP1A1*.

3.5.4- Para o gene *GSTO1*

O gene *GSTO1* e suas variantes foram amplificados pela técnica de PCR-SSCP com posterior seqüenciamento das amostras. Os primers e as condições utilizadas foram previamente descritos (WHITBREAD *et al*, 2003). Em resumo, o volume utilizado na PCR foi de 25 µl, contendo 100 ng de DNA, 50 nM de primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 uM de cada nucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂ e 0.4 U de Taq DNA Polimerase. A PCR foi constituída de 35 ciclos de 94⁰C por 45 segundos, com temperatura de anelamento de 59⁰C por 50 segundos e 72⁰C por 1 minuto. A fase inicial de desnaturação foi de 2 minutos a 94⁰C, e a fase de extensão final foi de 7 minutos a 72⁰C. Os produtos da PCR foram misturados com 95% de formamida deionizada, 0.05% de azul de bromofenol, 0.05% xileno cianol e 50 mM NaOH, e a seguir desnaturados a 94⁰C por 10 minutos. O produto final foi corrido em géis de poliacrilamida 0.4mm/30cm/45cm. A eletroforese foi conduzida a 2-5 W *overnight* em temperatura ambiente. Os géis foram corados com nitrato de prata. Cinco amostras de DNA provenientes de pacientes que tinham alterações de migração na eletroforese foram seqüenciadas para a comprovação dos polimorfismos respectivos. O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador automático utilizando o Kit Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction.

As figuras 10 e 11 exemplificam nossos resultados na identificação de *GSTO1*.

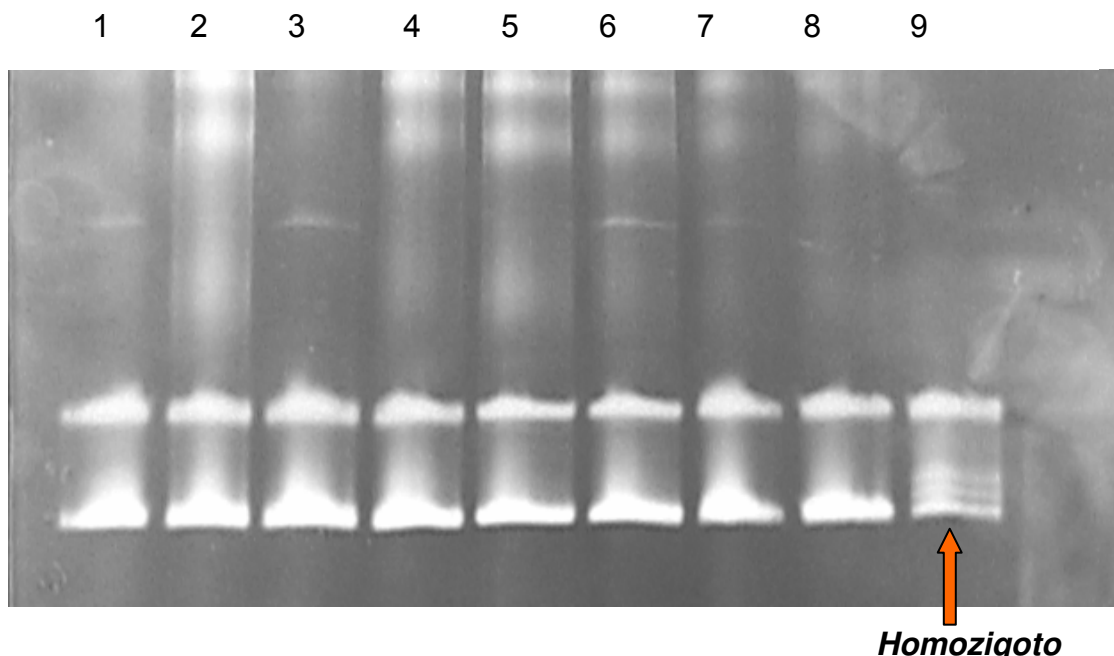


Figura 10 - Gel de *SSCP* demonstrando o padrão de bandas em indivíduos com câncer de próstata. A amostra 9 possui um genótipo homozigoto, as demais amostras apresentam um genótipo normal para o polimorfismo do gene *GSTO1* em pacientes com câncer. Observam-se duas bandas extras na variante em homozigose de *GSTO1*, o que foi confirmado pelo sequenciamento direto da respectiva amostra.

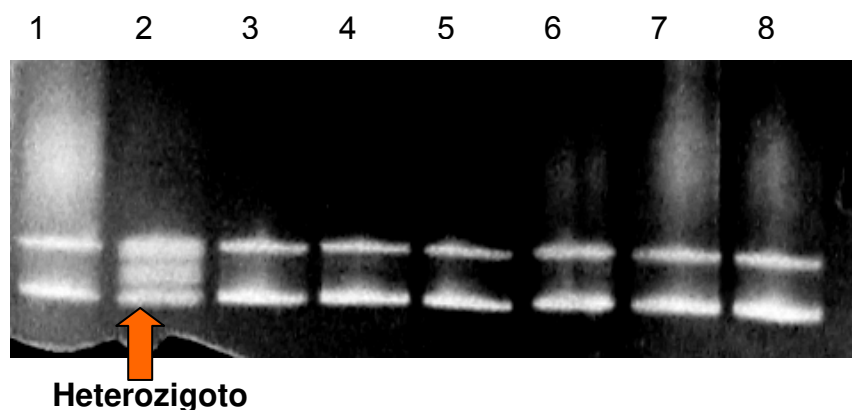


Figura 11 - Gel de *SSCP* demonstrando o padrão de bandas de indivíduos com câncer de próstata. A amostra 2 possui um genótipo heterozigoto, as demais amostras apresentam um genótipo normal para o polimorfismo do gene *GSTO1* em pacientes com câncer. Observa-se uma banda extra na variante em heterozigose de *GSTO1*, o que foi confirmado por sequenciamento direto da respectiva amostra.

Amostras controles positivas e negativas foram incluídas em todas as reações de PCR e corridas eletroforéticas, incluindo as PCR-SSCP-sequenciamento para detectar possíveis contaminações e inconsistências devidas ao manejo dos géis.

3.5.5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o registro e análise estatística das informações coletadas em fichas individuais, foi criado um banco de dados utilizando-se o programa Microsoft Excel 2000. Todas as variáveis de interesse foram categorizadas e estudou-se a presença de associação entre estas variáveis. Para isso foi feito o cruzamento das variáveis apresentadas em tabelas de dupla entrada. A presença de associação entre as variáveis categóricas foi analisada pelo Teste do Qui-quadrado (χ^2) ou pelo Teste Exato de Fischer (para valores esperados menores que 5). A comparação de variáveis numéricas foi feita com o teste de Mann-Whitney (MW) ou Wilcoxon na análise da idade, escore de Gleason e valores de PSA e os diferentes grupos genotípicos. O teste de Kruskal-Wallis (KW) foi utilizado para comparar idade entre os grupos.

O escore de Gleason foi avaliado como variável categórica utilizando o valor de 6 como base; 3+4=7, 4+3=7; 2-6 e 7-10 como as co-variáveis. O estadiamento foi utilizado como variável categórica utilizando o estágio T2 como base; T3 e T3b; e T1 + T2 e T3 + T4 como co-variáveis. Os níveis de PSA também foram avaliados como variáveis categóricas utilizando o PSA total como base; < 4 ng/ml, 4-10ng/ml e > 10 ng/ml como co-variáveis.

A análise de influência das variáveis de interesse no CaP, conjuntamente, foi realizada através da análise de regressão logística, modelos univariado e múltiplo com critério *Stepwise* de seleção de variáveis.

Adotou-se o nível de significância de 0,05. Níveis de probabilidade (P) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes de acordo com a histologia, características clínicas, PSA, Gleason, Estadio T, tabagismo (F: fumantes, NF: Não fumantes), presença de metástase ao diagnóstico, recorrência e/ou metástase à distância durante o seguimento e /ou morte.

	Diagnóstico							Presença de metástase ao diagnóstico		Características Clínicas		Seguimento
	PSA			Gleason		Estadio T		Loco-regional	Distância	Tabagismo		Recorrência
	≤ 4	4-10	> 10	2-6	7-10	T1-T2	T3-T4			Fumantes	Não fumantes	e/ou metástase
Adenocarcinoma da próstata	14	49	59	72	45	94	18	27	1	38	58	34 (7 mortes)
HPB	60	22	4							32	53	

Tempo médio de seguimento 33 meses

4- RESULTADOS

A tabela 4 demonstra a distribuição genotípica em pacientes com HPB e CaP bem como a comparação estatística entre os grupos. Não houve associação genotípica entre *GSTT1* e *GSTM1* nulo e o risco de CaP, nem considerando cada gene individualmente nem analisando suas diferentes combinações (Gráficos 1, 2 e 3). Também, não houve diferença entre as variantes de *GSTP1*, *GSTO1* e *CYP1A1* nos pacientes com HPB e CaP (Gráficos 4, 5 e 6). Análise de regressão logística univariada demonstrou que idade maior que 60 anos ($p<0.001$) e níveis de PSA total maior que 9.39 ng/ml ($p<0.001$) foram os únicos fatores relacionados com a susceptibilidade ao câncer da próstata.

Já que as enzimas *GSTM1* e *CYP1A1* detoxificam hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como o benzo[a]pireno encontrados no cigarro, nós comparamos o risco para CaP em indivíduos fumantes e não fumantes em relação aos genótipos *GSTM1* e *CYP1A1* associados. Como demonstrado na tabela 5, não houve interação significativa entre os genótipos de *GSTM1* ou *CYP1A1* e o fumo.

Também examinamos o risco para o CaP em relação aos genótipos de *GSTs* ou *CYP* e a idade ao diagnóstico, parâmetros de agressividade de acordo com os níveis de PSA total, escore de Gleason e estágio ao diagnóstico (tabelas 6,7 e 8I). Não foi possível demonstrar qualquer relação entre os genótipos estudados e qualquer parâmetro de agressividade do tumor ao diagnóstico ou durante o seguimento. Como demonstrado na tabela VI, não houve interação entre os genótipos de *GSTs* e *CYP* com o câncer localizado ou avançado.

Também não houve relação entre a resposta à radioterapia conformacional ou prostatectomia radical nos resultados em termos de evolução, no grupo de 72 pacientes em que testamos a associação genotípica com estes parâmetros.

Não houve nenhuma correlação entre quaisquer combinações genotípicas de *GSTs* ou de *GST* e *CYP* com fator clínico (PSA), epidemiológico (raça) ou anátomo-patológico.

A distribuição dos diferentes genótipos estudados não está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, tanto nos pacientes com câncer e quanto na população controle (HPB) para nenhum dos genótipos analisados.

Tabela 4- Distribuição dos diferentes genótipos estudados em pacientes com câncer de próstata (CaP = 125 pacientes) e hiperplasia prostática benigna (HPB = 100 pacientes).

Gene	Genótipo	CaP		HPB		Valor P
		N	%	N	%	
GSTP1	Ile 105 Val					
	Ile/Ile	64	52.9	53	54.6	0.578
	Ile/Val	36	29.7	32	32.9	
GSTO1	val/val	21	17.4	12	12.4	
	Ala140Asp					
	ala/ala	114	92.7	91	93.8	0.843
	ala/asp	6	4.8	3	3.1	
GSTT1	asp/asp	3	2.4	3	3.1	
	Presente	82	66.7	75	77.3	0.083
	Nulo	41	33.3	22	22.7	
GSTM1	Presente	56	45.2	46	47.4	0.738
	Nulo	68	54.8	51	52.6	
GSTT1/GSTM1	Presente/presente	36	29.2	33	34.0	0.311
	Presente /nulo	46	37.4	42	43.0	
	Nulo /presente	20	16.2	13	13.4	
	Nulo /nulo	21	17.0	9	9.28	
CYP1A1 M1	(6235T>C)					
	T/T	94	76.4	68	70.1	0.446
	T/C	24	19.5	26	26.8	
	C/C	5	4.07	3	4.0	
GSTM1/CYP1A1 M1	Presente/(T/T)	47	36.72	32	31.7	0.897
	Presente/(T/C)	12	9.37	14	13.9	
	Presente/(C/C)	3	2.34	2	1.98	
	Nulo/(T/T)	48	37.5	38	37.62	
	Nulo/(T/C)	15	11.72	14	13.86	
	Nulo/(C/C)	3	2.34	1	0.99	

Tabela 5- Comparação entre a distribuição dos diferentes genótipos estudados nos pacientes com adenocarcinoma da próstata fumantes e não fumantes.

Gene	Genótipo	Fumantes		Não fumantes			Valor p
		N	%	N	%		
GSTP1	Normal	18	47.3	31	54.4	$X^2 = 0.45$	0.503
	Variantes alélicas	20	52.6	26	45.6		
GSTO1	Normal	52	89.6	35	92.1	F	0.999
	Variantes alélicas	3	7.8	6	10.3		
GSTT1	Presente	23	60.5	44	75.8	$X^2 = 2.56$	0.110
	Nulo	15	39.4	14	24.1		
GSTM1	Presente	19	50.0	26	44.8	$X^2 = 0.25$	0.619
	Nulo	19	50.0	32	55.1		
CYP 1A1 M1	Normal	27	71.0	46	79.3	$X^2 = 0.86$	0.354
	Variantes alélicas	11	28.9	12	20.6		
GSTT1/ GSTM1	Presente /presente	12	31.5	19	32.7	$X^2 = 3.06$	0.383
	Presente /nulo	11	28.9	25	43.1		
	Nulo /presente	7	12.0	7	18.4		
	Nulo /nulo	8	21.0	7	12.0		
CYP 1A1 M1+ GSTM1	Nulo+variantes alélicas	6	15.7	7	12.0	$X^2 = 0.27$	0.602
	outros	32	84.2	51	87.9		

X^2 = Chi-quadrado, F= teste exato de Fisher.

Tabela 6- Comparação entre os diferentes genótipos e a avaliação clínica dos pacientes. Doença localizada = T1+T2; doença avançada = T3+ T4 de acordo com o .N.M.

GSTM1				Valor de P		
		Nulo	Presente			
Doença localizada	N	54	39	p ^a = 0.134		
	(%)	(58)	(41.9)			
Doença avançada	N	7	11			
	(%)	(38.8)	(61.1)			
GSTT1						
		Nulo	Presente			
Doença localizada	N	29	63	p ^a =0.880		
	(%)	(31.5)	(68.4)			
Doença avançada	N	6	12			
	(%)	(33.3)	(66.7)			
GSTP1						
		Selvagem	Variantes alélicas			
Doença localizada	N	48	42	p ^a =0.545		
	(%)	(53.3)	(46.6)			
Doença avançada	N	11	7			
	(%)	(61.1)	(38.8)			
GSTO1						
		Selvagem	Variantes alélicas			
Doença localizada	N	87	5	p ^b =0.038		
	(%)	(94.5)	(5.4)			
Doença avançada	N	14	4			
	(%)	(77.7)	(22.2)			
CYP1A1						
		Selvagem	Variantes alélicas			
Doença localizada	N	68	24	p ^b =0.999		
	(%)	(73.9)	(26)			
Doença avançada	N	14	4			
	(%)	(77.7)	(22.2)			
GSTM1 + CYP1A1						
		GSTM1 nulo/ CYP1A1alterado	Outras combinações			
Doença localizada	N	78	14	p ^b =0.999		
	(%)	(84.7)	(15.2)			
Doença avançada	N	16	2			
	(%)	(88.8)	(11.1)			
GSTT1 + GSTM1						
		GSTT1 nulo/ GSTM1 nulo	GSTT1 presente/ GSTM1 nulo	GSTT1 nulo/ GSTM1 presente	GSTT1 presente/ GSTM1 presente	
Doença localizada	N	15	38	14	25	p ^b = 0.553
	(%)	(16.3)	(41.3)	(15.2)	(27.1)	
Doença avançada	N	2	5	4	7	
	(%)	(11.1)	(27.7)	(22.2)	(38.8)	

p^a = Teste Qui-quadrado

p^b = Teste Exato de Fisher

Tabela 7- Comparação entre os diferentes genótipos e a avaliação clínica dos pacientes com relação ao PSA.

GSTM1			Valor de P
PSA (ng/ml)	Nulo	Presente	
# 4	8 (57.14)	6 (42.86)	
4 - 10	28 (58.3)	11 (61.1)	
> 10	32 (54.24)	27 (45.76)	p ^a = 0.911
GSTT1			
	Nulo	Presente	
# 4	3 (21.43)	11 (78.54)	
4 - 10	16 (34.04)	31 (65.96)	
> 10	21 (35.59)	38 (64.41)	p ^a = 0.595
GSTP1			
	Selvagem	Variantes alélicas	
# 4	8 (57.14)	6 (42.86)	
4 - 10	25 (55.56)	20 (44.44)	
> 10	30 (50.85)	29 (49.15)	p ^a =0.853
GSTO1			
	Selvagem	Variantes alélicas	
# 4	13 (92.86)	1 (7.14)	
4 - 10	45 (95.74)	2 (4.26)	
> 10	53 (89.83)	6 (10.17)	p ^b =0.494
CYP1A1			
	Selvagem	Variantes alélicas	
# 4	13 (92.86)	1 (7.14)	
4 - 10	35 (74.47)	12 (25.53)	
> 10	43 (72.88)	16 (27.12)	p ^a =0.281

GSTM1 + CYP1A1				
	GSTM1 nulo/ CYP1A1alterado	Outras combinações		
# 4	0 (0.00)	14 (100.0)		
4 - 10	8 (17.02)	39 (82.98)		
> 10	9 (15.25)	50 (84.75)		
p ^a =0.261				
GSTT1 + GSTM1				
	GSTT1 nulo/ GSTM1 nulo	GSTT1 presente/ GSTM1 nulo	GSTT1 nulo/ GSTM1 presente	GSTT1 presente/ GSTM1 presente
# 4	1 (7.14)	7 (50.0)	2 (14.29)	4 (28.57)
4 - 10	10 (21.28)	17 (36.17)	6 (12.77)	14 (29.79)
> 10	10 (16.95)	22 (37.29)	11 (18.64)	16 (27.12)
p ^b = 0.902				

p^a = Teste Qui-quadrado

p^b = Teste Exato de Fisher

Tabela 8- Comparação entre os diferentes genótipos e a avaliação clínica dos pacientes com relação ao escore de Gleason.

GSTM1			Valor de P
Gleason	Nulo	Presente	
2-6	36 (50.0)	36 (50.0)	p ^a = 0.152
7-10	28 (63.64)	16 (36.36)	
GSTT1			
	Nulo	Presente	
2-6	27 (38.03)	44 (61.97)	p ^a = 0.149
7-10	11 (25.00)	33 (75.00)	
GSTP1			
	Selvagem	Variantes alélicas	
2-6	34 (49.28)	35 (50.72)	p ^a =0.434
7-10	25 (55.82)	19 (43.18)	
GSTO1			
	Selvagem	Variantes alélicas	
2-6	67 (94.37)	4 (5.63)	p ^b =0.300
7-10	39 (88.64)	5 (11.36)	
CYP1A1			
	Selvagem	Variantes alélicas	
2-6	55 (77.46)	16 (22.54)	p ^a =0.565
7-10	32 (72.73)	12 (27.27)	

GSTM1 + CYP1A1			
	GSTM1 nulo/ CYP1A1alterado	Outras combinações	
2-6	9 (12.68)	62 (87.32)	
7-10	8 (18.18)	36 (81.82)	p ^a =0.419

GSTT1 + GSTM1				
	GSTT1 nulo/ GSTM1 nulo	GSTT1 presente/ GSTM1 nulo	GSTT1 nulo/ GSTM1 presente	GSTT1 presente/ GSTM1 presente
2-6	13 (18.31)	22 (30.99)	14 (19.72)	22 (30.99)
7-10	6 (13.64)	22 (50.00)	5 (11.36)	11 (25.00)
				p ^a = 0.220

p^a = Teste Qui-quadrado

p^b = Teste Exato de Fisher

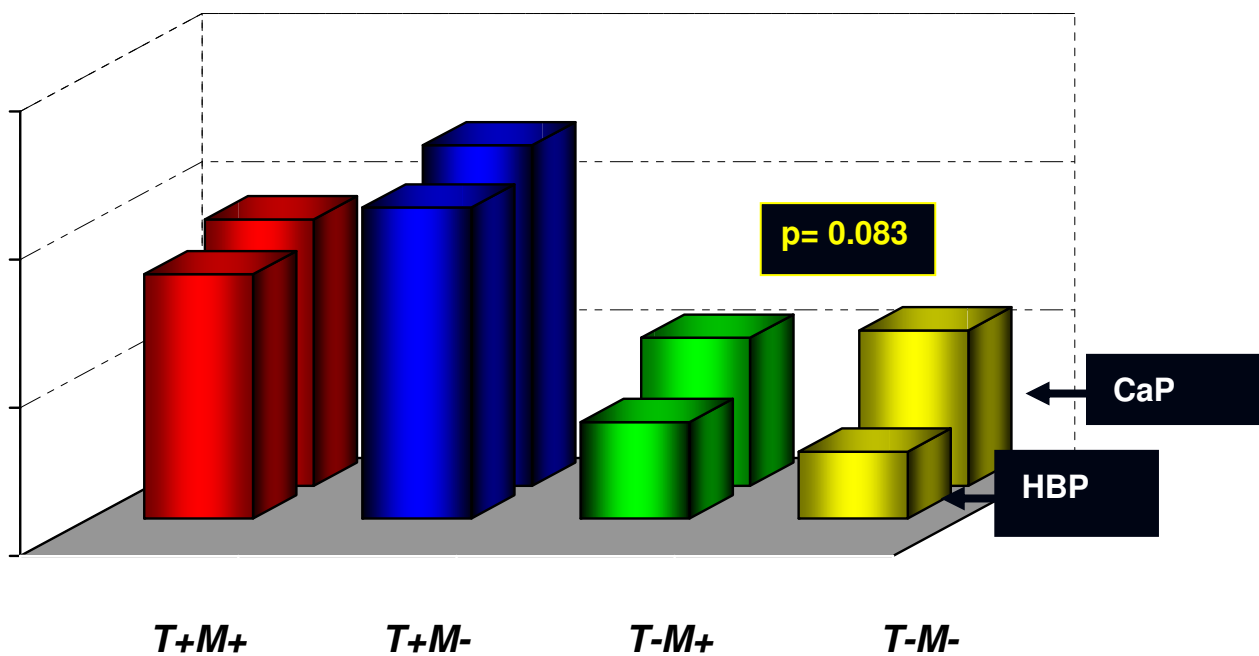


Gráfico 1- Comparação dos diferentes genótipos das *GSTT1* e *GSTM1* em portadores de HPB e CaP

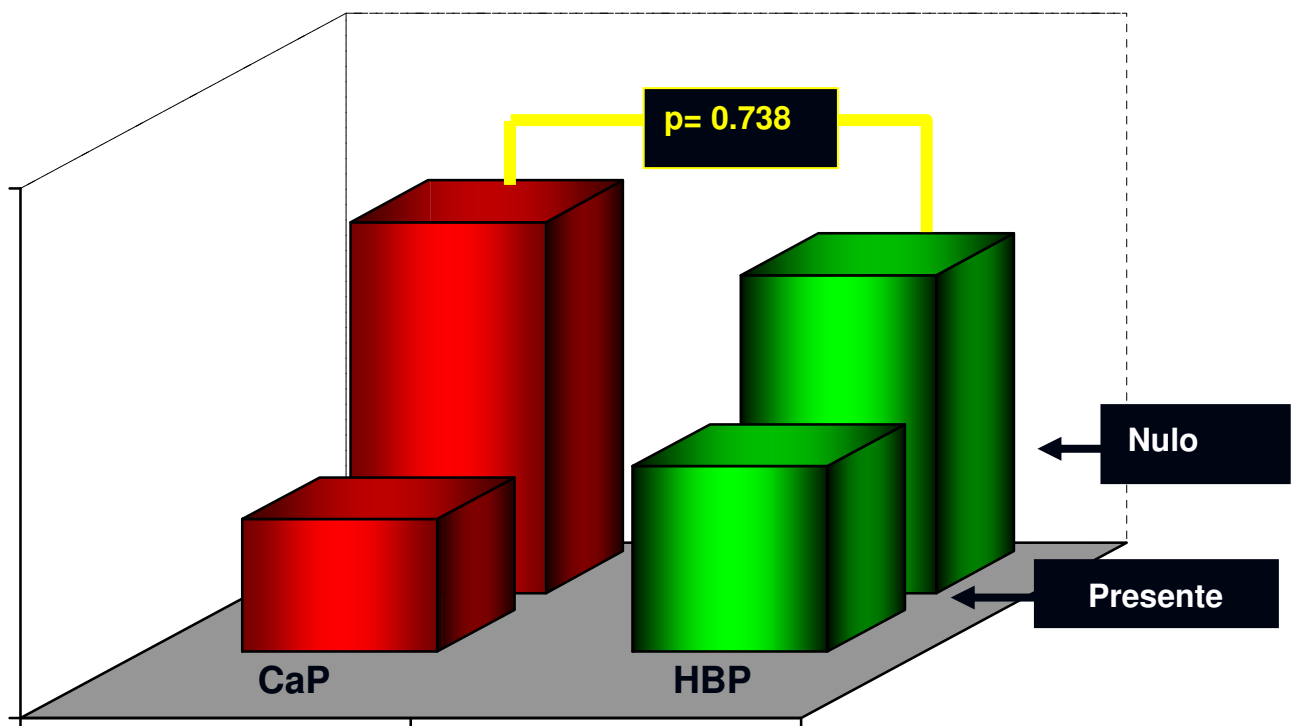


Gráfico 2- Comparação dos diferentes genótipos da *GSTM1* em portadores de HPB e CaP

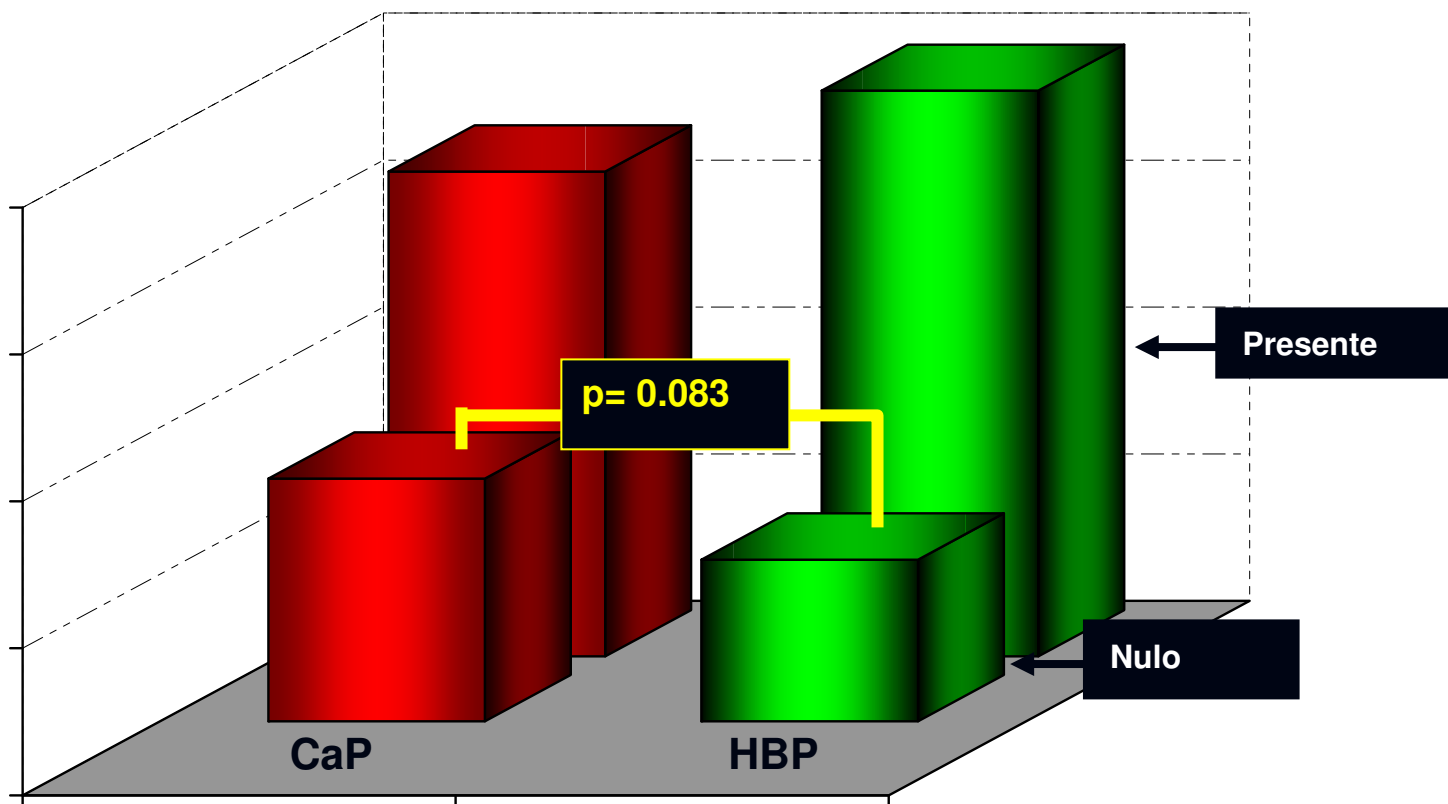


Gráfico 3- Comparação dos diferentes genótipos da *GSTT1* em portadores de HPB e CaP

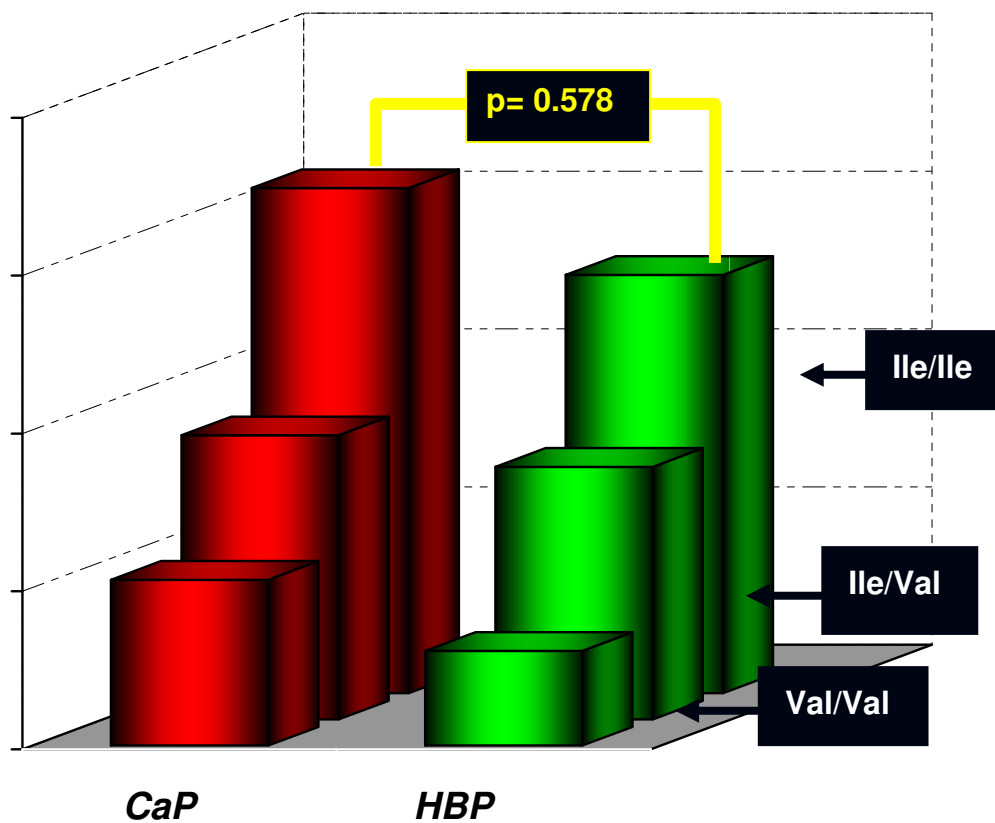


Gráfico 4- Comparação entre os diferentes genótipos do *GSTP1* em pacientes portadores de HPB e CaP

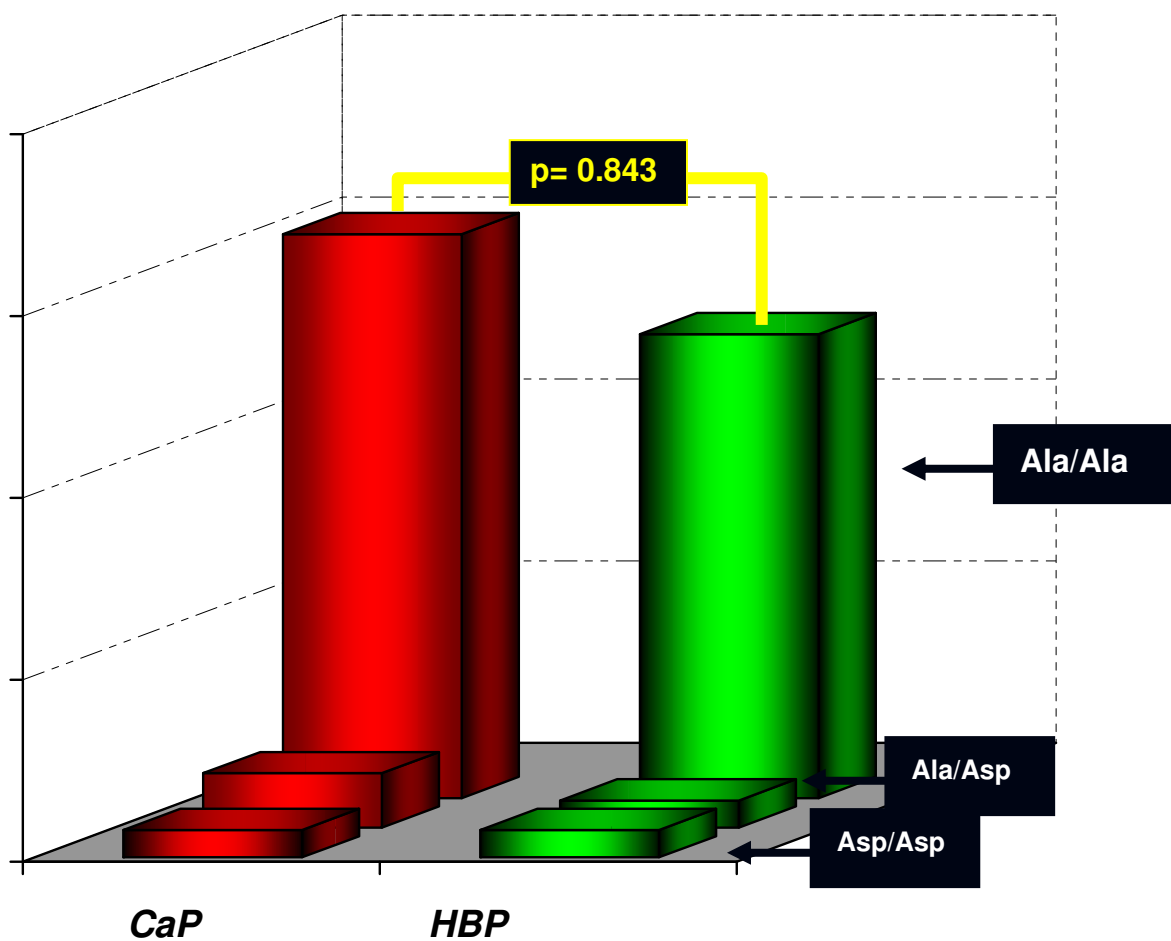


Gráfico 5- Comparação entre os diferentes genótipos do *GSTO1* em pacientes portadores de HPB e CaP

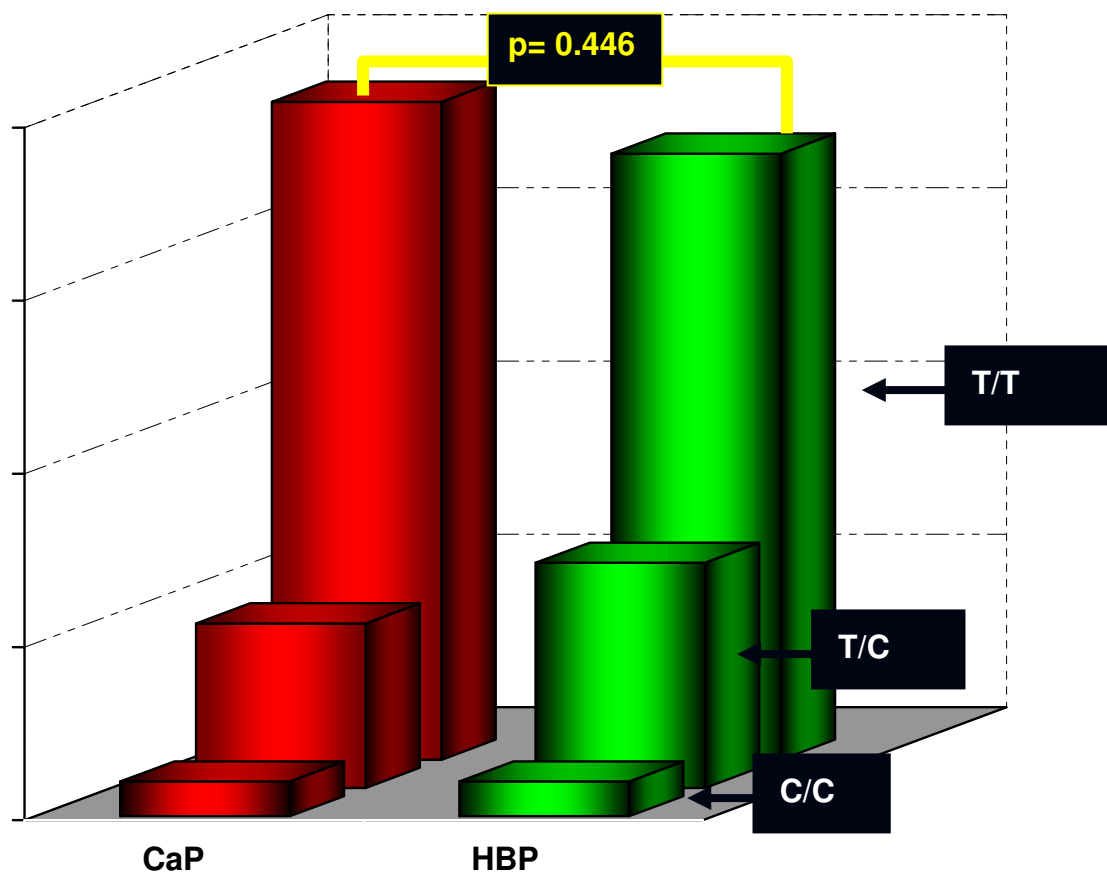


Gráfico 6- Comparação entre os diferentes genótipos de *CYP1A1 m1* em pacientes portadores de HPB e CaP

5- DISCUSSÃO

Um elevado número de estudos publicados nos últimos anos tem procurado definir genes de predisposição ao câncer de próstata (XU *et al*, 1998; GIBBES *et al*, 1999; XUE *et al*, 2000; OSTRANDER & STANFORD, 2000; TAKAKU *et al*, 2003). Igualmente, vários trabalhos têm buscado marcadores de agressividade do CaP. Embora ainda não tenhamos uma aplicação prática destes estudos, as pesquisas em citogenética, cinética celular e biologia molecular, aliadas a observações clínicas e epidemiológicas consistentes têm permitido compreender melhor e identificar os múltiplos, seqüenciais e cumulativos eventos envolvidos na carcinogênese prostática.

Genes que são envolvidos na proteção individual à exposição a agentes carcinogênicos assim como genes moduladores do resultado da terapêutica podem ser implicados tanto no risco de câncer como no seu prognóstico. Uma série de polimorfismos de linhagem germinativa de DNA tem sido investigada na tentativa de delinear modelos poligênicos de susceptibilidade e prognóstico do câncer de próstata. Estes modelos são particularmente interessantes, pois podem ajudar a selecionar indivíduos de alto risco para quimio-prevenção e determinar quais homens com CaP localizado serão mais provavelmente beneficiados com uma terapêutica mais agressiva. Infelizmente, os estudos de investigação de genes de susceptibilidade têm produzido resultados inconsistentes no CaP, principalmente por usarem amostras pequenas, mas também pela estratificação populacional secundária à diversidade étnica das populações investigadas, e ainda devido às limitadas considerações sobre as diferentes combinações dos polimorfismos.

No intuito de aumentar nosso entendimento acerca da interação entre os fatores de exposição ambiental e os fatores genéticos com a patogênese, predisposição e o prognóstico dos pacientes com adenocarcinoma de próstata, foram avaliados os genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* e *CYP1A1* na população brasileira. Não se demonstrou qualquer associação significativa entre os polimorfismos estudados e a susceptibilidade ao câncer de próstata, parâmetros de agressividade tumoral ao diagnóstico ou ainda comportamento durante o

seguimento. Igualmente, não encontramos associação entre *GSTO1* e o adenocarcinoma da próstata, bem como seu comportamento com as variáveis avaliadas. Esse é o primeiro trabalho, de nosso conhecimento, que estuda a influência de *GSTO1*, um gene recentemente descrito e potencialmente interessante, na susceptibilidade ao câncer de próstata.

Contrariando nossos resultados, um estudo recente de tipo caso-controle de número significativo de pacientes portadores de CaP (n=590 pacientes) demonstrou um aumento de risco modesto (OR=1,54; 95% CI: 1.19-2.01) de câncer prostático em indivíduos com deleção homozigota do gene *GSTM1* (AGALLIU *et al*, 2005). Infelizmente, os controles nesse estudo foram selecionados somente com base na anamnese sem a realização de toque retal e dosagem sérica do PSA. Considerando-se a grande prevalência de tumores silenciosos na população, este é um fator essencial que merece uma avaliação mais criteriosa. Em um estudo inicial de tipo caso-controle em que utilizamos 67 pacientes de CaP pareados com indivíduos clinicamente assintomáticos, nós encontramos um risco significativo de CaP em indivíduos com enzimas variantes de *GSTP1*, após ajuste pela idade, tabagismo e uso de drogas (LIMA JUNIOR *et al*, 2004). Os dados demonstravam um aumento de risco de 11 vezes (OR=11,908; 95% CI: 4.956-28.614) para indivíduos com variantes de *GSTP1* e os indivíduos com genótipos nulos combinados para *GSTT1* e *GSTM1* tiveram 2,9 vezes (OR= 2.9012; 95% CI: 1.0752-7.8281) maior risco de câncer prostático comparados com a população considerada normal (LIMA JUNIOR *et al*, 2004). Esses resultados poderiam ser controversos; já que o risco de CaP desapareceu quando passou-se a utilizar, como grupo controle, indivíduos com HPB no presente estudo. Além do fator grupo controle, as características étnicas da população estudada por Agalliu *et al* (*eg*: homens caucasianos de meia idade) podem ter influenciado nos seus resultados, já que existe grande influência étnica na distribuição destes polimorfismos em diferentes populações (AGALLIU *et al*, 2005). Assim, acreditamos que a alta heterogeneidade da composição étnica da população brasileira nos permite diminuir a influência deste fator em nossos dados. Concordando com nossos dados, um estudo de meta-análise publicado

recentemente e que incluiu 11 trabalhos com análise genotípica de *GSTM1* (2.063 casos e 2.625 controles), 10 estudos com análise genotípica de *GSTT1* (1.965 casos e 2.554 controles) e ainda 12 estudos com análise genotípica de *GSTP1* (2.528 casos e 3.076 controles) concluiu que esses três polimorfismos não devem ser fatores importantes de susceptibilidade no CaP (NTAIS *et al*, 2005).

Uma avaliação pormenorizada dessa meta-análise publicada por NTAIS *et al*, nos faz questionar sobre a utilização dos grupos controles, as diferenças étnica dos pacientes (vários países incluídos no estudo), pareamento da idade, raça, bem como o tamanho amostral dos vários estudos.

Nosso trabalho foi criterioso e cuidadoso na inclusão de pacientes com relação à idade, exame de toque retal e dosagem do PSA sanguíneo em todos os pacientes e ainda a inclusão de HPB nos controles (diagnóstico anatomopatológico).

Em relação ao gene *CYP1A1*, há poucas informações sobre o seu papel no risco no câncer de próstata, apesar das múltiplas funções desse gene. Um estudo caso controle utilizando 115 pacientes portadores de CaP e 200 pacientes com HPB como controle encontrou uma frequência do genótipo valina (Val)/valina(Val) para *CYP1A1* de 11.3% nos CaP enquanto que esta frequência foi de apenas 5,5% nos controles. Esse estudo sugeriu que os polimorfismos de *CYP1A1* estariam associados com um aumento significativo de risco para CaP (OR= 2,4; 95% CI= 1:01±5:57) (MURATA *et al*, 2001). Mais ainda, os autores encontraram um risco aumentado de CaP em pacientes que apresentavam a combinação de polimorfismos de *CYP1A1* e *GSTM1* nulo, com um OR de 2,2 (MURATA *et al*, 2001). Interessantemente, ambos GSTs e CYPs são relacionados com o metabolismo de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos derivados do cigarro e também com o consumo de dieta à base de carne vermelha cozida em altas temperaturas. Muito embora o papel do cigarro na susceptibilidade ao câncer de próstata, agressividade ou resposta terapêutica ainda permanecem controversos, muitos estudos indicam que o cigarro não

exerce um papel importante na carcinogênese prostática (MERRICK *et al*, 1993). Nossos dados corroboram tal conclusão visto que não obtivemos qualquer relação entre o perfil genotípico para *GSTM1* e *CYP1A1* com o risco para CaP. Nossos dados também não demonstraram quaisquer relações entre o estilo de vida, dieta e prática esportiva com o risco para CaP. Um estudo recente confirmou a associação de *CYP1A1* com o risco de câncer prostático, mas enquanto o haplotipo T-A-C (*CYP*1 A*) foi significativamente associado com o aumento do CaP, o haplotipo C-A-C (*CYP1A1*2 A*) foi significativamente associado com a diminuição do risco de CaP (CHANG *et al*, 2003). Novamente, nossos dados não sugerem quaisquer influências de *CYP1A1* na patogênese do câncer prostático. No entanto fica evidente a necessidade de mais dados para uma avaliação melhor da importância de *CYP1A1* na etiopatogenia do CaP.

Nossos perfis genotípicos não estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, nem nos pacientes com câncer de próstata como na população controle (HPB). Isto poderia significar que realmente os genótipos estudados têm implicação na etiopatogenia do câncer de próstata. Entretanto, acreditamos que o fato apenas reflita a relativa juventude da população em termos de evolução genética. Para que uma população esteja no equilíbrio de Hardy-Weinberg deve obedecer a algumas regras: os acasalamentos entre os indivíduos dessa população devem se aleatórios e não seletivos; a população não deve estar sujeita a migrações nem a mutações constantes. Assim, as frequências e razões genotípicas nessa população serão constantes de geração para geração. Notemos que as condições para a validade da lei são muito restritas, e que na maioria dos casos ela só pode ser aplicada a populações teóricas (UZUANI & BINDER, 1997). No caso da população brasileira, com sua múltiplas e sucessivas ondas de migração das mais variadas origens, o equilíbrio de Hardy-Weinberg deve levar ainda algum tempo para ser atingido.

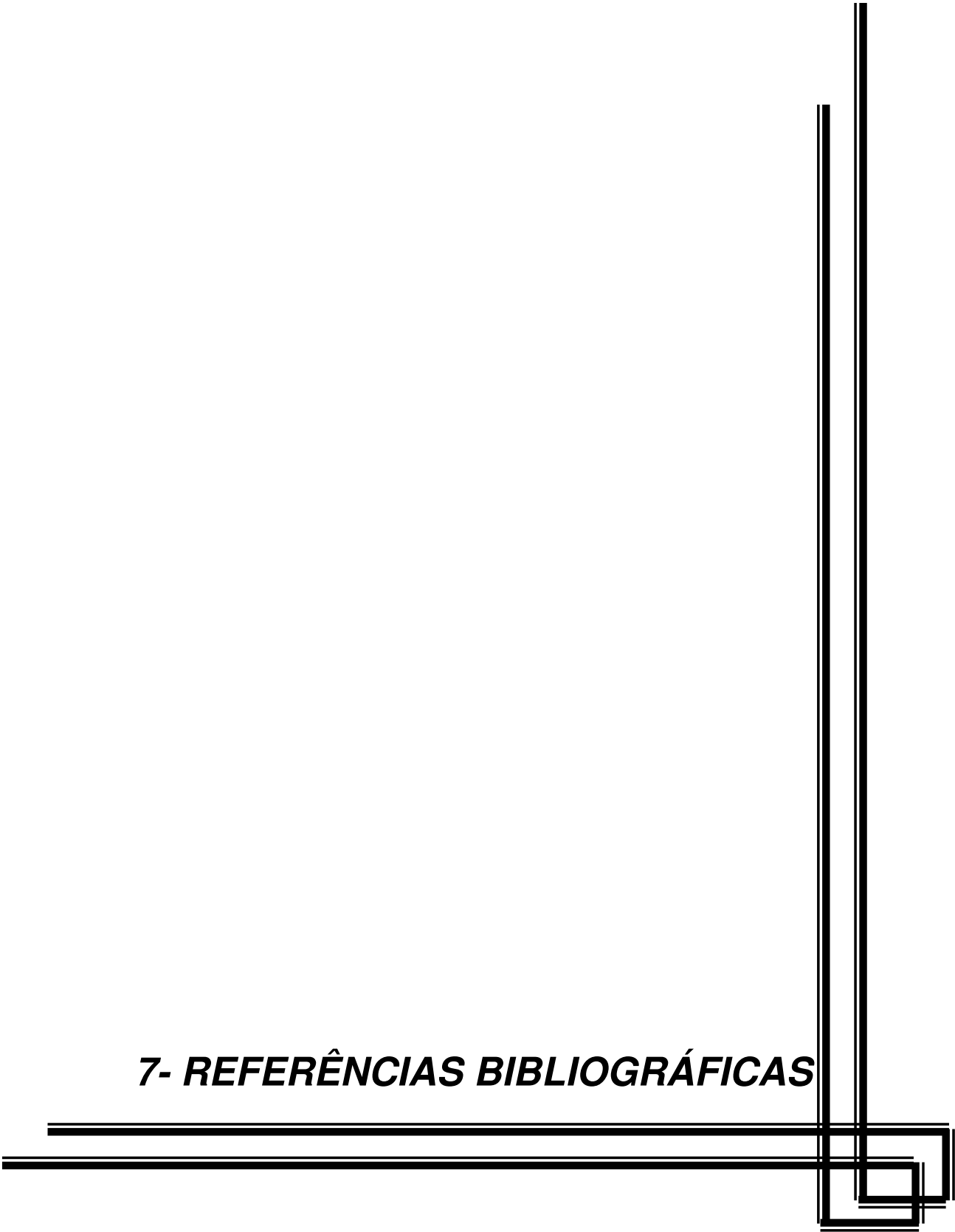
6- CONCLUSÃO

Nossos dados mostram que os polimorfismos dos genes *GSTM1*, *GSTO1*, *GSTP1*, *GSTT1* e *CYP1A1* não estão relacionados nem individualmente nem em associação com o risco ou com a evolução da neoplasia prostática.

Em resumo, concluímos que:

- 6.1.1-** Os polimorfismos dos genes *GSTM1* (*Mu*), *GSTO1* (*Omega*), *GSTP1*(*Pi*), *GSTT1*(*Teta*) e *CYP1A1* avaliados separadamente ou em combinação não possuem correlação com o risco para câncer de próstata.
- 6.1.2-** Os polimorfismos dos genes *GSTM1* (*Mu*), *GSTO1* (*Omega*), *GSTP1* (*Pi*), *GSTT1*(*Teta*) e *CYP1A1* avaliados separadamente ou em combinação não possuem correlação com fatores epidemiológicos (raça) e laboratorial (PSA) de risco para adenocarcinoma da próstata.
- 6.1.3-** Os polimorfismos dos genes *GSTM1* (*Mu*), *GSTO1* (*Omega*), *GSTP1*(*Pi*), *GSTT1*(*Teta*) e *CYP1A1* avaliados separadamente ou em combinação não possuem correlação com o estadiamento clínico e anátomo-patológico (Gleason) nos pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata.
- 6.1.4-** Os polimorfismos dos genes *GSTM1* (*Mu*), *GSTO1* (*Omega*), *GSTP1*(*Pi*), *GSTT1*(*Teta*) e *CYP1A1* avaliados separadamente ou em combinação não possuem associações com a resposta terapêutica dos pacientes portadores de adenocarcinoma da próstata que foram submetidos à radioterapia conformacional prostática e prostatectomia radical.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



AGALLIU, I.; LANGEBERG, W.J.; LAMPE, J.W.; SALINAS, C.A.; STANFORD, J.L. Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms and prostate cancer risk in middle-aged men. **Prostate** Sep 19, [Epub ahead of print], 2005.

AKAZAKI, K.; STERMMERMANN, G.N. Comparative study of latent carcinoma of the prostate among Japanese in Japan and Hawaii. **JNCI**, 50: 1137-1144, 1973.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. *Biologia Molecular da célula*. 3ª Ed. **Artes Médicas**, 911-946, 1997.

ALI-OSMAN, F.; AKANDE, O.; ANTOUN, G.; MAO, J. X.; & BUOLAMWINI, J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. **J Biol Chem.**, 272, 10004-10012, 1997.

ALITALO, K.; SCHWAB, M. Oncogene amplification in tumor cells. **Cancer Res** 47:235, 1986.

BABAIAN, R.J. et al. Comparative analysis of prostate specific antigen and its indexes in the detection of prostate cancer. **J Urol** 156: 432-437, 1996.

BARON, E.; ANGRIST, A. Incidence of occult adenocarcinoma of the prostate after fifty years of age. **Arch Pathol**, 32: 787-793, 1941.

BISHOP, J.M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell** 64:235-248, 1991.

BISHOP, J.M. The molecular genetics of cancer. **Science** 235:305-311, 1987.

BOARD, P. G.; COGGAN, M.; CHELVANAYAGAM, G.; EASTEAL, S.; JERMIIN, L. S.; SCHULTE, G. K.; DANLEY, D. E.; HOTH, L. R.; GRIFFOR, M. C.; KAMATH, A. V.; ROSNER, M. H.; CHRUNYK, B. A.; PERREGAUX, D. E.; GABEL, C. A.; GEOGHEGAN, K. F.; PANDIT, J. Identification, characterization, and crystal structure of the omega class Glutathione Transferases. **J. Biol. Chem.** 275, 24798-24806, 2000.

BRAWLEY, O.W.; KRAMER, B.S. Epidemiology of prostate cancer, in Vogelsang NJ, Sacrdino PT, Shipley WU, Coffey DS: Comprehensive textbook of genitourinary oncology. Baltimore, **Williams & Wilkins**, 565-572, 1996.

BROOKS, J.D.; LIN, X. et al. CG Island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic intraepithelial neoplasia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 7:531-6, 1998.

CARTER, B.S.; BEATY, T.H.; STEINBERG G.D.; CHILDS B.; WALSH P.C. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**. Apr 15; 89(8):3367-71, 1992.

CARTER, B.S.; BOVA, G.S.; BEATY, T.H.; STEINBERG, G.D.; CHILDS, B.; ISAACS, W.B.; WALSH, P.C. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. **J Urol**. Sep; 150(3):797-802, 1993.

CARTER, H.; ISAACS, W. Improved Biomarkers for Prostate Cancer: A Definite Need. **Journal of the National Cancer Institute**. Vol. 96, No. 11, 813-815, June 2, 2004.

CASEY, G.; NEVILLE, P.J.; PLUMMER, S.J. et al. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. **NAT GENET**, 32:581-3, 2002.

CATALONA, W.J.; SMITH, D.S. Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical retropubic prostatectomy for prostate cancer: intermediate-term results. **J Urol**. Dec; 160(6 Pt 2):2428-34, 1998.

CHAN, J.M.; GIOVANUCCI, E.L. Vegetables, fruits, associated micronutrients, and risk of prostate cancer. **Epidemiol Rev**, 23:82-6, 2001.

CHANG, B.L.; ZHENG, S.L.; ISAACS, S.D.; TURNER, A.; HAWKINS, G.A.; WILEY, K.E.; BLEECKER, E.R.; WALSH, P.C.; MEYERS, D.A.; ISAACS, W.B.; XU, J. Polymorphisms in the CYP1A1 gene are associated with prostate cancer risk. **Int J Cancer** 106:375-378, 2003.

CHEN, L.; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; DUNCAN, C. et al. Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entress as a whole-food intervention. **J Natl Cancer Inst**, 93:1872-9, 2001.

CLARK, L.C.; COMBS, G.F. JR.; TURNBULL, B.W. et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: A randomized controlled trial. **JAMA** ,277:1520,1997.

CLARK, L.C.; DALKIN, B.; KRONGRAD, A. et al. Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. **Br J Urol** ,81:730-4,1998.

DANGNELIE, P.C.; SCHUURMAN, A.G.; GOLDBOHN, R.A.; VAN DEN BRANT, P.A. Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. **BJU Int.** 93:1139-1150,2004.

DEVERE WHITE, R.W.; DEITCH, A.D.; JACKSON, A.G.; GANDOUR-EDWARDS, R.; MARSHALLECK, J.; SOARES, S.E.; TOSCANO, S.N.; LUNETTA, J.M.; STEWART, S.L. Racial differences in clinically localized prostate cancers of black and white men. **J Urol.** Jun;159(6):1979-82; discussion 1982-3,1998.

DHOM, G.Fruhe Neoplastische Veranderungen der Prostata. **Verh Dtsch Ges Pathol**, 63: 218-231, 1979.

DULHUNTY, A.; GAGE, P.; CURTIS, S.; CHELVANAYAGAM, G. BOARD, P. The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. **J. Biol. Chem.**, 276, 3319-3323, 2001.

EKMAM, P. Genetic and environment factors in prostate cancer genesis: identifying high-risk cohorts. **Eur Urol** 35: 362-369,1999.

EPSTEIN, J.I.; PARTIN, A.W.; SAUVAGEOT, J.; WALSH, P.C.Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up. **Am J Surg Pathol** 20: 286-292, 1996.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 61:759-767,1990.

FRANKS, L.M.Latent carcinoma of the prostate. **J Pathol Bacteriol**, 68: 603-616,1954.

FRANKS, L.M.Etiology, epidemiology, and pathology of prostate cancer. **Cancer**, 32: 1092-1095, 1973.

GANN, P.H.; MA, J.; GIOVANUCCI, E. et al. Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of prospective analysis. **Cancer RES**,59:1225-30,1999.

GIOVANUCCI, E.; RIMM E.B.; COLDITZ G.A. et al. A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer.**J Natl Cancer Inst**,85:1571-9, 1993.

GONZALEZ, F.J. The molecular biology of cytochrome P450s. **Pharmacol.** 40, 243-288, 1989.

GUENGERICH, F.P.; THIER R.; PERSMARK M.; TAYLOR J.B.; PEMBLE S.E.; KETTERER B. Conjugation of carcinogens by theta class glutathione s-transferases: mechanisms and relevance to variations in human risk. **Pharmacogenetics** 5 Spec No:S103-7,1995.

GUENGERICH, F.P. Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. **Adv. Pharmacol.** 43, 7-35, 1997.

GLEASON, D.F. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. **Hum Pathol.** Mar;23(3):273-9, 1992.

GRANJA, F.; MORARI, J.; MORARI, E. C.; CORREA, L. A.; ASSUMPCAO, L. V.; WARD, L.S. GST profiling may be useful in the screening for thyroid nodule malignancy. **Cancer Lett.**, 209, 129-137, 2004.

GRONBERG, H. Prostate cancer epidemiology. **Lancet** 361:859-864, 2003.

GRONBERG, H.; XU J.; SMITH, JR.; CARPTEN, J.D.; ISAACS, S.D.; FREIJE, D.; BOVA, G.S.; DANBER, J.E.; BERGH, A.; WALSH, P.C.; COLLINS, F.S.; TRENT, J.M.; MEYERS, D.A.; ISAACS, W.B. Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. **Cancer Res.** Nov 1;57(21):4707-9, 1997.

GROSS, G.A.; TURESKY, R.J.; FAY, L.B.; STILLWELL, W.G.; SKIPPER, P.L.; TANDEMBAUM, S.R. Heterocyclic Aromatic Amine Formation In Grilled Bacon, Beef And Fish And In Grill Scrapngs. **Carcionogenesis**,14:2313-8,1993.

GSUR, A.; HAIDINGER, G.; HINTEREGGER, S.; BERNHONFER, G.; SCHATZL, G.; MADERSBACHER, S.; MARBERGER, M.; VUTUC, C. MICKSCHE, M. Polymorphisms of glutathione-S-Transferase genes (GSTP1, GSTM1 and GSTT1) and prostate-cancer risk. **Int. J. Cancer**, 95, 152-155, 2001.

HAAS, G.P.; SAKR, W.A.: Epidemiology of prostate cancer. **CA Cancer J Clin** 47 (5): 273-87; Sep-Oct;1997.

HALL, M.C.; NAVONE, N.M.; TRONCOSO, P.; POLLACK, A.; ZAGARS, G.K.; ESCHENBACH, VON. A.C.; CONTI, C.J.; CHUNG, L.W.K. – Frequency and characterization of p53 mutations in clinially localized prostate cancer. **Urology** 45:470-475,1995.

HARPER, M.E.; GLYNNE-JONES, E.; GODDARD, L.; WILSON, D.W.; MATENHELLA, S.S.; CONN, I.G.; PELLING, W.B.; GRIFFITHS, K. – Relationship of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in prostatic carcinomas to various clinical parameters. **Prostate** 20:243-253,1992.

HARTWELL, L.H.; KASTAN, M.B. – Cell cycle control and cancer. **Science** 266:1821-1828,1994.

HAYES, J.D.; PULFORD, D. J. The glutathione S-Transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, 30, 445-600, 1995.

HAYES, R.B.; ZIEGLER, R.G.; GRIDLEY, G.; SWANSON, C.; GREENBERG, R.S.; SWANSON, G.M.; SCHOENBERG, J.B.; SILVERMAN, D.T.; BROWN, L.M.; POTTERN, L.M.; LIFF, J.; SCHWARTZ, A.G.; FRAUMENI, J.F. JR.; HOOVER, R.N. Dietary factors and risks for prostate cancer among blacks and whites in the United States. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 8:25-34,1999.

HEINOMEN, O.P.; ALBANES, D.; VIRTAMO, J. et al. Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. **J Natl Cancer Inst**, 90:440-6, 1998.

HENDERSON, C.J.; MCLAREN, A. W.; MOFFAT, G. J.; BACON, E. J.; WOLF, C.R. Pi-class glutathione S-transferase: regulation and function. **Chem. Biol. Interact.**, 111-112, 69-82, 1998.

HOOLLYWOOD, D.P.; LEMOINE, N.R. – Growth factors. Oncogenes and tumor suppressor genes. En assesement of cell proliferation in clinical practice. **Eds. Hall PA, Levison A, Wright NA**. Londres, 27-43, 1992.

HSING, A.W.; DEVESA, S.S. Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? **Epidemiol Rev** 23:3-13, 2001.

HU, C.K.; MCCALL, S.; MADDEN, J.; HUANG, H.; CLOUGH, R.; JIRTLE, R.L.; ANSCHER, M.S. Loss of heterozygosity of M6P/IGF2R gene is an early event in the development of prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis.** Nov; 22; [Epub ahead of print], 2005.

HUTCHISON, G.B.: Epidemiology of Prostatic Cancer. **Semin Oncol**, 3: 151-159, 1976.

JEMAL, A.; MURRAY, T.; SAMUELS, A.; GHAFOR, A.; WARD, E.; THUN, M.J. **CA Cancer J Clin.** Jan-Feb; 53(1):5-26, 2003.

XU, J.; MEYERS, D.; FREIJE, D.; ISAACS, S.; WILEY, K.; NUSSKERN, D.; EWING, C.; WILKENS, E.; BUJNOVSZKY, P.; STEVEN BOVA, G.; WALSH, P.; ISAACS, W.; SCHLEUTKER, J.; MATIKAINEN, M.; TAMMELA, T., VISAKORPI, T.; KALLIONIEMI, O-P.; BERRY, R.; SCHAID, D.; FRENCH, A.; MCDONNELL, S.; SCHROEDER, J.; BLUTE, M.; THIBODEAU, S.; GRÖNBERG, H.; EMANUELSSON, M.; DAMBER, J.; BERGH, A.; JONSSON, B.; SMITH, J.; BAILEY-WILSON, J.; CARPTEN, J.; STEPHAN, D.; GILLANDERS, E.; AMUNDSON, I.; KAINU, T.; FREAS-LUTZ, D.; BAFFOE-BONNIE, A.; VAN AUCKEN, A.; SOOD, R.; COLLINS, F.; BROWNSTEIN, M.; JEFFREY, T. Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. **Nature Genetics** 20, 175–179, 1998.

JOHNSON, D.G.; WALKER, C.L. – Cyclins and cell cycle checkpoints. **Annu.Rev.Pharmacol Toxicol** 39:295-312, 1999.

KAWAJIRI, K.; NAKACHI, K.; IMAI, K.; WATANABE, J.; HAYASHI, S. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. **Critical Rev. Oncol. Hematol.**, 14, 77-87, 1993.

KESHAHA, C.; MCCANLIES, E.C.; WESTON, A. CYP3A4 polymorphisms-potential risk factors for breast and prostate cancer: a huge review. **Am J Epidemiol** 160:825-841, 2004.

KETTERER, B.; HARRIS, J.M.; TALASKA, G.; MEYER, D.J.; PEMBLE, S.E.; TAYLOR, J.B.; LANG, N.P.; KADLUBAR, F.F. The human Glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. **Environ Healthy Perspect** 98:87-94, 1992.

KNIZE, M.G.; SALMON, C.P.; METHA, S.S.; FELTON, J.S. Analysis of cooked muscle meats for heterocyclic aromatic amine carcinogens. **Mutat Res**, 376:129-34, 1997.

KNUDSON, A.G. JR – Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 68:820, 1971.

KOLONEL, L.N.; HANKIN, J.H.; WHITTEMORE, A.S.; WU, A.H.; GALLAGHER, R.P.; WILKENS, L.R.; JOHN, E.M.; HOWE, G.R.; DREON, D.M.; WEST, D.W.; PAFFENBARGER, R.S. JR. Vegetables, fruits, legumes and prostate cancer: a multiethnic case-control study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 9:795-804, 2000.

LAM, KY.; LAW, SY-K.; SO, MK-P.; FOK, M.; MA, L.T.; WONG, J. – Prognostic implication of proliferative markers MIB1 and PC10 in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer** 77:7-13, 1996.

LEE, W.H.; MORTON, R.A.; EPSTEIN, J.L.; et al. Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione s-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. **PROC NATL ACAD SCI USA**, 91:11733-7, 1994.

LEVINE, A.J.; MOMAND, J.; FINALY, C.A. – The p53 tumor supressor gene. **Nature** 351:453-456,1991.

LIJINSKY, W.; SHUBIK, P. Benzo(A)Pyrene And Other Polynuclear Hydrocarbons In Charcoal-Broiled Meat. **Science** ,145:53-5,1964.

LIMA JR, M. M. O Doente Portador de Afecções do Trato Genito-urinário – Doenças da Próstata. In: Ward, L. S.; Guariento,M. E. **Manual de Medicina Ambulatorial do Adulto**. Editora Roca, Cap(6). (no prelo).

LIMA JUNIOR M.M.; GRANJA, F.; MORARI, J.; SANTOS, L.E.M.C.; SANTOS, NETO, L.C.; WARD, L.S. GST profile identify prostate cancer risk in brazilian population. **Mediators of Inflammation** [supplement], [abstract]:4, 2004.

LIN, X.; TASCILAR, M.; LEE, W.H.; et al. GSTP1 CpG island hypermethylation is responsible for the absence of GSTP1 expression in human prostate cancer cells. **AM J PATHOL** 159:1815-26, 2001.

LUNDEBERG, S.; BERGE, T: Prostatic carcinoma: an autopsy study. **Scand J Urol Nephrol**,4: 93-97, 1970.

MARIOT, P.; PREVARSKAYA, N.; ROUDBARAKI, M. M.; LE, BOURHIS.; X, VAN COPPENOLLE.; F, VANOVERBERGHE, K.; SKRYMA, R. Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells. **Prostate**, 43, 205-214, 2000.

GIBBS, M.; STANFORD, J.; MCINDOE, R.; JARVIK, G.; KOLB, S.; GOODE, E.; CHAKRABARTI, L.; SCHUSTER, E.; BUCKLEY, V.; MILLER, E.; BRANDZEL, S.; LI, S.; HOOD, L.; OSTRANDER, L. Evidence for a Rare Prostate Cancer–Susceptibility Locus at Chromosome 1p36. **Am. J. Hum. Genet.**, 64:776-787, 1999.

MCDONNEL, W. M.; SCHEIMAN, J.M.; TRABER, P.G.Induction of cytochrome P4501A genes (CYP1A) by omeprazole in the human alimentary tract. **Gastroenterology**, 103, 1509-1516, 1992.

MEDEIROS, R.; VASCONCELOS, A.; COSTA, S.; PINTO, D.; FERREIRA, P.; LOBO, F.; MORAIS, A.; OLIVEIRA, J.; LOPES, C. Metabolic susceptibility genes and prostate cancer risk in a southern European population: the role of glutathione S-transferases GSTM1, GSTM3, and GSTT1 genetic polymorphisms. **Prostate**. Mar 1;58(4):414-20,2004.

MERRICK, G.S.; BUTLER, W.M.; WALLNER, K.E.; GALBREATH, R.W.; LIEF, J.H.; ADAMOVICH, E. Effect of cigarette smoking on biochemical outcome after permanent prostate brachytherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**. 15;58:1056-1062, 2004.

METTLIN, C.J.; MURPHY, G.P.; CUNNINGHAM, M.P.; MENCK, H.R.; **Cancer**. Oct 1;80(7):1261-6,1997.

MILLER, B.A.; KOLONEL, L.N.; BERNSTEIN, L. et al. Racial/ethnic patterns of cancer in the United States 1988-1992. Bethesda, Md: **National Cancer Institute**. NIH Pub. No. 96-4104,1996.

MILLAR, D.S.; OW, K.K.; PAUL, C.L.; RUSSEL, P.J.; MOLLY, P.L.; CLARK, S.J. Detailed methylation analysis of the Glutathione S-Transferase Pi(GSTP1) gene in prostate cancer. **Oncogene** ,18:1313-24, 1999.

MIRCHANDANI, D.; ZHENG, J.; MILLER, G.J.; GHOSH, A.K.; SHIBATA, D.K.; COTE, R.J.; ROY-BURMAN, P. Heterogeneity in intratumor distribution of p53 mutations in human prostate cancer. **Am J Pathol**. Jul;147(1):92-101, 1995.

MONTIE, J.E. Staging system for prostate cancer. **Semin Urol**. Feb;11(1):10-3, 1993.

MORGENTHALER, P.M.; HOLZHAUSER, D. Analysis of mutations induced by 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-B] pyridine (Phip) in human lymphoblastoid cells. **Carcinogenesis** ,16:713-8,1995.

MORARI, E.C.; LEITE, J.L. P.; GRANJA, F.; ASSUMPÇÃO, L. V. M.; WARD, L.S. The null genotype of glutathione S-transferase M1 and T1 locus increases the risk for thyroid cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, 11, 1485-1488, 2002.

MURATA, M.; WATANABE, M.; YAMANAKA, M.; KUBOTA, Y.; ITO, H.; NAGAO, M.; KATOH, T.; KAMATAKI, T.; KAMAMURA, J.; YATANI, R.; SHIRAISHI, T. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP)1 A1 , CYP1A2, CYP2E1, Glutathione S-Transferase (GST) M1 and GSTT1 and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. **Cancer Lett** 165:171-177, 2001.

NAROD, S.A.; HAWKINS, M.M.; ROBERTSON, C.M.; STILLER, C.A. Congenital anomalies and childhood cancer in Great Britain. **Am J Hum Genet.** Mar;60(3):474-85, 1997.

NEBERT, D.W.; MCKINNON, R.A.; PUGA, A. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. **DNA Cell Biol.**, 15, 273-280, 1996.

NELSON, W.G.; DE MARZO, A.M.; DEWEESE, T.L. The molecular pathogenesis of prostate cancer: implications for prostate cancer prevention. **Urology**, 57:39-45, 2001.

NTAIS, C.; POLYCARPOU, A.; IOANNIDIS, J.P. Association of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 gene polymorphisms with the risk of prostate cancer: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 14:176-181, 2005.

OOTTA, K. Latent carcinoma of the prostate among the Japanese. **Acta Un Int Cancer**, 17:952-957, 1961.

OSTRANDER, E. ; STANFORD, J. Genetics of Prostate Cancer: Too Many Loci, Too Few Genes. **Am. J. Hum. Genet.**, 67:1367-1375, 2000.

OUDE, OPHUIS.; M.B. ROELOFS.; H, M.J.; BRANDT, P.A.; PETERS, W.H.M.; MANNI, J.J. Polymorphisms of the glutathione S-transferase P1 gene and head and neck cancer susceptibility. **Head Neck** 25, 37-43, 2003.

PAN, Z.; DAMRON, D.; NIEMINEN, A.L.; BHAT, M.B.; MA, J. Depletion of intracellular Ca²⁺ by caffeine and ryanodine induces apoptosis of Chinese hamster ovary cells transfected with ryanodine receptor. **J. Biol. Chem.** 275, 19978-19984, 2000.

PARKER, S.L.; TONG, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P.A. Cancer statistics **Ca J Clin.** Jan-Feb;46(1):5-27,1996.

PARTIN, A.W.; EPSTEIN, J.I.; CHO, K.R.; GITTELSON, A.M.; WALSH, P.C. Morphometric measurement of tumor volume and per cent of gland involvement as predictors of pathological stage in clinical stage B prostate cancer. **J Urol.** Feb;141(2):341-5,1989.

PARTIN, A.W.; YOO, J.; CARTER, H.B.; PEARSON, J.D.; CHAN, D.W.; EPSTEIN, J.I.; WALSH, P.C. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. **J Urol.** Jul;150(1):110-4, 1993.

PARTIN, A.W.; OESTERLING, J.E. The clinical usefulness of prostate specific antigen: Update 1994. **J Urol** 152:1358-1368,1994.

PARTIN, A.W.; OESTERLING, J.E. Prostate specific antigen in urologic clinical practice. **AUA Update Series.** 14: 1-12; 1995.

PARTIN, A.W.; KATTAN, M.W.; SUBONG, E.N.; WALSH, P.C.; WOJNO, K.J.; OESTERLING, J.E.; SCARDINO, P.T.; PEARSON, J.D. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. **JAMA.** May 14;277(18):1445-51,1997.

PERERA, F.; WEINSTEIN, B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. **Carcinogenesis.** Vol. 21, No. 3, 517-524, March 2000.

PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer** 72:962-970,1993.

QUINN, M.; BABB, P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. **BJU Int** 90:162-73, 2002.

RABENHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHIMITT, F.C.L. Marcadores de proliferação celular. **Rev Bras Patol Clin** 29:24-29,1993.

RABENHORST, S.H.; BURINI, R.C.; SCHIMITT, F.C.L. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. **Rev Bras Cancerol** 40:141-147,1994.

REBBECK, T. R.; WALKER, A.H.; JAFFE, J. F.; WHITE, D.L.; WEIN, A.J.; MALKOWICZ, S.B. Glutathione S-Transferase- μ (GSTM1) and 2 (GSTT1) genotypes in the etiology of prostate cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** 8, 283-287, 1999.

RENNERT, H.; BERCOVICH, D.; HUBERT, A.; et al. A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delag, is associated with prostate cancer in ashkenazi Jews. **AM J HUM GENET** ,71:981-4, 2002.

RESZKA, E.; WASOWICZ, W. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase and glutathione S-transferase related to neoplasm genitourinary system. Minireview. **Neoplasma** 49:209-216, 2002.

ROSS, R.K.; PIKE, M.C.; COETZEE, G.A.; et al. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. **Cancer Res** 58 (20): 4497-504, 1998.

ROUS, P. The challenge to man of the neoplastic cell. **Science**, 157: 24-28, 1967.

RUIJTER, E.; VAN DE, K.A.A.C.; MILLER, G. et al. Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. **Endocr Rev** 20 (1): 22-45, 1999.

SAKR, W.A.; GRIGNON, D.J.; CRISSMAN, J.D.; et al. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 259 cases. **IN VIVO**,8:439-43, 1994.

SEIDEGARD, J.; VORACHEK, W.R.; PERO, R.W.; PEARSON, W.R. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase activity on trans-stilbene oxide are due to gene deletion. **Proc Natl Acad Sci USA** 85:7293-7297, 1998.

SIDRANSKY, D.; VON ESCHENBACH, A.; TSAI, Y.C.; JONES, P.; SUMMERHAYES, I.; MARSHALL, F.; PAUL, M.; GREEN, P.; HAMILTON, S.R.; FROST, P. et al. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples. **Science**. May 3;252(5006):706-9, 1991.

- SMAALAND, R. Circadian rythm of cell division. **Cell Cycle Res** 20:241-266, 1996.
- SOBIN, L.H.; WITTEKUND, C.H. International Union Against Cancer-TNM. Classification of malignat tumors, 5th Ed., **Wiley- Liss**, New York, 1997.
- SONG, N.; TAN, W.; XING, D.; LIN, D. CYP1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. **Carcinogenesis** 22, 11-16, 2001.
- STAMEY, T.A.; FREIHA, F.S.; MCNEAL, J.E.; REDWINE, E.A.; WHITTEMORE, A.S.; SCHMID, H.P. Localized prostate cancer. Relationship of tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer. **Cancer**. Feb 1;71(3 Suppl):933-8, 1993.
- SRINIVAS, P.; VERMA, M.; ZHAO, Y.; SRIVASTAVA, S. Proteomics for Cancer Biomarker Discovery. **Clinical Chemistry** , 48:1160-1169, 2002.
- STRANGE, R.C.; FRYER, A.A. The Glutathione S-transferase: influence of polymorphism on cancer susceptibility. **IARC Sci Publ.** 148: 231-249, 1999.
- STUCKER, I.; HIRVONEN, A.; DE WAZIERS, I.; CABELGUENNE, A.; MITRUNEN, K.; CENEE, S.; KOUM-BESSON, E.; HEMON, D.; BEAUNE, P.; LORIOT, M.A. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. **Carcinogenesis** 23, 1475-1481, 2002.
- SUZUKI, H.; KOMIYA, A.; AIDA, S.; ITO, H.; YATANI, R.; SHIMAZAKI, J. Detection of human papillomavirus DNA and p53 gene mutations in human prostate cancer. **Prostate**. May;28(5):318-24, 1996.
- SUZUKI, K.; MATSUI, H.; NAKAZATO, H.; KOIKE, H.; OKUGI, H.; HASUMI, M.; OHTAKE, N.; NAKATA, S.; HATORI, M.; ITO, K.; YAMANAKA, H. Association of the genetic polymorphism in cytochrome P450 (CYP) 1A1 with risk of familial prostate cancer in a Japanese population: a case-control study. **Cancer Letters** 195, 177-183, 2003.

TANAKA-KAGAWA, T.; JINNO,H.; HASEGAWA,T.; MAKINO,Y.; SEKO,Y.; HANIOKA, N.; ANDO, M.Functional characterization of two variant human GSTO1-1s (Ala140Asp and Thr217Asn). **Biochem Biophys Res Commun** 301:516-520, 2003.

TAKAKU, H.; MINAGAWA, A.; TAKAGI, M.; NASHIMOTO, M. A candidate prostate cancer susceptibility gene encodes tRNA 3' processing endoribonuclease. **Nucleic Acids Research**, Vol. 31,No. 9,2272-2278,2003.

TALAMINI, R.; FRANCESHI, S.; LA VECCHIA, C.; GUARNERI, S.; NEGRI, E.Smoking habits and prostate cancer: a case-control study in norther Italy. **Prev Med**.22:400-408, 1993.

THIER, R.; BRUNING, T.; ROOS, P.H.; GOLKA, K.; KO, Y.; BOLT, H.M. Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. **Int J Hyg Environ Health** 206:149-171, 2003.

THOMPSON, J.A.; WIESNER, G.L.; SELLERS, T.A.; VACHON, C.; AHRENS, M.; POTTER, J.D.; SUMPMANN, M.; KERSEY, J. Genetic services for familial cancer patients: a survey of National Cancer Institute cancer center. **J Natl Cancer Inst.** Oct 4;87(19):1446-55, 1995.

TONG, Z.; BOARD, P. G.; ANDERS, M. W. Glutathione transferase zeta-catalyzed biotransformation of dichloroacetic acid and other alpha-haloacids. **Chem. Res. Toxicol**.11, 1332-1338, 1998.

TSIHLIAS, J.; KAPUSTA, L.; SLINGERLAND, J. – The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. **Annu Rev Med** 50:401-423,1999.

UZUANI, A.; BINER, E. **Biologia**. São Paulo: Ed Habra, v.3, 1997.

VARMUS, H. – An historical overview of oncogenes. Oncogenes and the molecular origins of cancer. Weinberg RA, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press,**Cold Spring Harbor**, NY,3,1989.

VISAKORPI, T. Proliferative activity determined by DNA flow cytometry and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry as a prognostic factor in prostatic carcinoma. **J Pathol.** Sep;168(1):7-13, 1992.

VOLGELSTEIN, B.; FEARON, E.R.; HAMILTON, S.R.; KERN, S.E.; PREISINGER, A.C.; LEPPERT, M.; NAKAMURA, V.; WHITE, R.; SMITS, A.M.; BOS, J.L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **N Engl J Med** 319:525-532, 1988.

XU, J.; ZHENG, S.L.; KOMIYA, A. et al. Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk. **Nat Genet** 32:321-5, 2002.

XUE, W.; IRVINE, R.; YU, M.; ROSS, R.; COETZEE, G.; INGLES, S. Susceptibility to Prostate Cancer: Interaction between Genotypes at the Androgen Receptor and Prostate-specific Antigen Loci. **Cancer Research** 60, 839-841, February 15, 2000.

YIN, Z. L.; DAHLSTROM, J.E.; LE COUTEUR, D.G.; BOARD, P.G. Immunohistochemistry of omega class glutathione S-transferase in human tissues. **J. Histochem. Cytochem.**, 49, 983-987, 2001.

WALSH, P.C. Anatomic radical prostatectomy: evolution of the surgical technique. **J Urol.** Dec;160(6 Pt 2):2418-24, 1998.

WALSH, P.C.; LEPOR, H.; EGGLESTON, J.C. Radical prostatectomy with preservation of sexual function: anatomical and pathological considerations. **Prostate.** 4(5):473-85, 1983.

WANG, L.; MCDONNELL, S.K.; ELKINS, D.A. et al. Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer. **Am J Hum Genet** 71:116-23, 2002.

WHITBREAD, A. K.; TETLOW, N.; EYRE, H. J.; SUTHERLAND, G. R.; BOARD, P.G. Characterization of the human Omega class glutathione transferase genes and associated polymorphisms. **Pharmacogenetics** 13, 131-144, 2003.

WOLK, A. Diet, lifestyle and risk of prostate cancer. **Acta Oncol.** 44:277-281, 2005.

WONG, F.W.S. Immunohistochemical detection of proliferating tumor cells in cervical cancer using monoclonal antibody Ki-67. **Gynecol Obstet Invest** 37:123-126,1994.

WU, C.P.; GU, F.L. The prostate in eunuchs. **Prog Clin Biol Res** 370: 249-55, 1991.

WYNDER, E.L.; MABUCHI, K.; WHITMORE, W.F. JR. Epidemiology of Cancer of The Prostate. **Cancer**, 28: 344-360,1971.

ENDEREÇOS ELETRÔNICOS / PESQUISAS INTERNET

INCA. Instituto Nacional do Câncer: banco de dados. Disponível em:

<http://www.inca.gov.br/conteudo>. Acesso em: 18 dez. 2005.

8- ANEXOS

ANEXO 8.1

TERMO DE CONSENTIMENTO

Projeto de Pesquisa em Genética Molecular do Câncer

Profa. Dra. Laura Sterian Ward

Paciente ou Responsável pelo paciente

Sr(a) :

Idade:

RG:HC:

Endereço:

Telefone:

Concordo em doar sangue e um fragmento do material retirado durante minha cirurgia para pesquisa de genes que podem estar envolvidos no aparecimento do câncer. Sei que se trata de uma pesquisa científica e concordo em que os dados do meu caso, registrados no meu prontuário médico, sejam usados para avaliar a importância dos genes, sabendo que meu nome assim como meus dados clínicos e de laboratório não serão individualmente citados e que em nenhum momento meu diagnóstico ou tratamento serão prejudicados por tal doação.

Também sei que esta pesquisa pode trazer benefícios para a cura ou tratamento do câncer no futuro, mesmo que eu não me beneficie disso agora. Não terei nenhum gasto com a doação do meu material para esta pesquisa e sei que poderei cancelar minha decisão e deixar de participar em qualquer momento. Também não serei submetido a qualquer procedimento que não faça parte da rotina de meu tratamento normal, sob a orientação de meu médico habitual.

Estou consciente da importância de minha participação da qual posso desistir em qualquer momento. Fui informado de que este projeto está aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA e sei que poderei obter todas as informações que desejar no fone (19) 3783-8936.

.....

Assinatura

Profa. Dra. Laura Sterian Ward – Coordenadora do GEMOCA/FCM-UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz ou Caixa Postal 6111 – CEP 13081-970

Campinas – SP / BRASIL FAX : 0055-019-2894107 e-mail: ward@unicamp.br

ANEXO 8.2

PROTOCOLO DE PESQUISA – PRÓSTATA

Nº :

Nome : Idade :

Idade ao diagnóstico : Raça :

Atividade profissional:

» Antecedentes :

Tabagismo Álcool Drogas (maconha, cocaína, crack, outros)

» Hábitos :

Exercícios físicos (semanal) :	SIM	NÃO
Ingesta de carne vermelha :	SIM	NÃO
Ingesta de verduras :	SIM	NÃO

» Exames :

PSA : TR :

» Anatomopatológico :

Tipo histológico :

Gleason :

» Estadiamento

Cintilografia óssea :

Rx Tórax :

CT abdome/Pelve :

» Tratamento :

» Observação :