



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

BRUNA BRITO SANTOS

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e  
*MTHFR* C677T COM A SUSCETIBILIDADE E PROGNÓSTICO DO  
CÂNCER DE PRÓSTATA DE ALTO RISCO EM PACIENTES NO  
ESTADO DO PIAUÍ**

PARNAÍBA-PI

2017

BRUNA BRITO SANTOS

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e  
*MTHFR* C677T COM A SUSCETIBILIDADE E PROGNÓSTICO DO  
CÂNCER DE PRÓSTATA DE ALTO RISCO EM PACIENTES NO  
ESTADO DO PIAUÍ**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto

PARNAÍBA-PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

S237a Santos, Bruna Brito.

Associação dos polimorfismos *GSTMI* nulo, *GSTTI* nulo e *MTHFR C677T* com a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata de alto risco em pacientes no estado do Piauí [manuscrito] / Bruna Brito Santos. – 2017.

61 f. : il. color.

Impresso por computador (printout).

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto.

Área de Concentração: Biologia Molecular.

1. Idosos. 2. Neoplasia. 3. Suscetibilidade. 4. Biotecnologia. I. Título.

CDD: 305.26

BRUNA BRITO SANTOS

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e  
*MTHFR* C677T COM A SUSCETIBILIDADE E PROGNÓSTICO DO  
CÂNCER DE PRÓSTATA DE ALTO RISCO EM PACIENTES NO  
ESTADO DO PIAUÍ**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto  
Universidade Federal do Piauí – *Campus* Ministro Reis Velloso  
Presidente

---

Prof. Dr. Silmar Silva Teixeira  
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso

---

Prof<sup>a</sup>. Dr. Baldomero Antonio Kato Da Silva  
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso

## DEDICATÓRIA

Aos Mestres, Dr. Giovanni Rebouças Pinto e Msc. Hygor Ferreira Fernandes, pois nada seria desta pesquisa sem suas orientações e empenho, indispensáveis para a produção deste trabalho!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a fonte de fé e sabedoria essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Giovanny Rebouças Pinto por fornecer todas as condições necessárias para a realização desta pesquisa, além de ensinamentos valiosos! Gratidão por tudo!

Ao Hygor Ferreira Fernandes, por ser um grande apoio em todas as etapas desta pesquisa, por toda a sua paciência. Infinita gratidão!

Aos meus Pais, José Nilson e Maria Gorete, por tudo que fizeram por mim! E meus irmãos, Aline Brito, pela alegria e Tarcízio Brito, pela inspiração nos estudos e meu amado sobrinho-afilhado, José, por ser o amor de todos.

Ao meu namorado, Vinícius Lopes, por trazer em minha vida a paz, amor e tranquilidade no momento que mais precisei.

Aos meus queridos amigos GEHMED! Tâmis e Anderson, por todo o aprendizado e parceria! Gratidão por todos (Hianny, Sara, Vânia, Felipe, Victor, Yhasmine e Abdias), pois o caminho desse mestrado foi menos árduo com vocês ao meu lado.

Agradeço em especial, a Valéria Andrade (minha Guru!) por tudo, por todo o aprendizado, por toda a parceria! Muita gratidão!

A amiga, Jessiane Miranda, por todo o companheirismo, e toda a caminhada percorrida juntas. A Stefany Guimarães, por ser minha grande incentivadora desde a seleção deste mestrado!

Aos amigos Michel Correia, Paulo Gregório Nascimento, Victor Marinho e Thales Ronei da Costa Almeida por todo o apoio neste trabalho.

A Secretaria Municipal de Educação de Parnaíba pela licença concedida durante a realização deste mestrado e as escolas Borges Machado na gestão de Silvelena Souza e Comendador Cortez na gestão de Suzana M<sup>a</sup> do Nascimento e Fabiano Araújo por todo o apoio durante os estudos para a seleção no mestrado.

A banca examinadora, Silmar Silva Teixeira e Baldomero Antonio Kato Da Silva por concordarem em contribuir para a melhoria deste trabalho.

A todos os professores deste programa de pós-graduação que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento profissional, em especial, a coordenadora, Durcilene Silva, por todo o apoio necessário para garantir a qualidade deste mestrado.

## EPÍGRAFE

“O senhor... Mire veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas – mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior. É o que a vida me ensinou. Isto que me alegra, montão. E, outra coisa: o diabo, é às brutas: mas Deus é traiçoeiro! Ah, uma beleza de traiçoeiro – dá gosto! A força dele, quando quer – moço! – me dá medo pavor! Deus vem vindo: ninguém não vê. Ele faz é na lei do mansinho – assim é o milagre. E Deus ataca bonito, se divertindo, se economiza”.

João Guimarães Rosa

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de próstata é a neoplasia de maior incidência entre homens, e mais prevalente em países desenvolvidos onde a população é predominantemente idosa. É uma doença multifatorial devido a sua suscetibilidade associada a vários fatores ambientais e genéticos. O estudo de polimorfismos associados à suscetibilidade de desenvolvimento do câncer de próstata tem contribuído para sua melhor compreensão. **Objetivo:** O presente trabalho tem como objetivo avaliar a relação dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e o *MTHFR* C677T com a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata de alto risco em uma população do Piauí. **Metodologia:** Trata-se de um estudo de caso-controle envolvendo 156 pacientes com câncer de próstata classificado de alto risco, com concentração plasmática do antígeno prostático específico  $\geq 20$  ng/mL e/ou escore de Gleason  $\geq 8$  e/ou estágio tumoral T2c/T3 com ou sem avanço nos linfonodos e metástase, seguindo os parâmetros de estratificação tumoral de alto risco D'Amico et al. (2011), e 193 indivíduos saudáveis constituídos por homens idosos a partir de 60 anos de idade, ambos foram genotipados pela técnica de *PCR* multiplex para os genes *GSTM1* e *GSTT1* e técnica *PCR-RFLP* para o gene *MTHFR*. As informações clínicas foram sistematizadas, levando em consideração variáveis como idade, níveis séricos do *PSA*, escore de Gleason e estágio tumoral. **Resultados:** O polimorfismo *GSTM1* nulo demonstrou efeito de proteção contra o câncer de próstata de alto risco (OR= 0,5, IC=95% 0,3-0,8 p=0,005; OR ajustado=0,9, IC=95% 0,9-1,0 p= 0,019). O polimorfismo *GSTT1* nulo apresentou valor estatisticamente significativo com relação ao câncer de próstata de alto risco (OR=2,0, IC=95% 1,2-3,3 p=0,003; OR ajustado= 1,0 IC=95% 0,9-1,0 p=0,001). O polimorfismo *MTHFR* C677T não apresentou associação significativa com o câncer de próstata de alto risco. Não houve associação significativa entre os polimorfismos em estudo e as variáveis clínicas preditoras do prognóstico do câncer de próstata de alto risco. **Conclusão:** Os resultados desta pesquisa sugerem que os polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo podem ser marcadores importantes para futuras aplicações clínicas, quando associados ao câncer de próstata de alto risco.

Palavras-chave: Idosos. Neoplasia. Suscetibilidade.



**ABSTRACT**

**Background:** The prostate cancer is the neoplasia with major incidence among men, and more prevalent in developed countries where the population is prevalingly elderly. It is a multifactorial disease due its suscepibility associated to several environmental and genetic factors. The study of polimorphisms related to suscepibility of developing prostate cancer had contributed for its best comprehension. This study aim to evaluate the relation between the *GSTM1* null, *GSTT1* null, *MTHFR* C677T polymorphisms and the suscepibility and prognosis of the high risk prostate cancer in a population from Piauí. **Methods:** It is a case-control study involving 156 patients with prostate cancer classified as high risk, with prostate-specific antigen plasma concentration  $\geq 20$  ng/mL and/or Gleason score  $\geq 8$  and/or tumor stage T2c/T3 with ou without lymph node progression and metastasis, following the D'amico (2011) high risk tumor stratification criteria, and 193 healthy individual composed by elderly men as of 60 years old, both were genotyped by PCR multiplex to the genes *GSTM1* and *GSTT1* and by PCR-RFLP to the gene *MTHFR*. The clinical information were systematized, considering variables as age, PSA seric levels, Gleason score and tumor stage. **Results:** The *GSTM1* null polymorphism demonstrate protection effect against high risk prostate cancer (OR= 0,5, CI=95% 0,3-0,8 p=0,005; adjusted OR= 0,9, CI=95% 0,9-1,0 p=0,019). The *GSTT1* null polymorphism presented statistically significant value related to high risk prostate cancer (OR=2,0, CI=95% 1,2-3,3 p=0,003; adjusted OR = 1,0 CI=95% 0,9-1,0 p=0,001). The *MTHFR* C677T polymorphism don't indicated significant association with high risk prostate cancer. There wasn't significant association between the studied polymorphisms and prognosis predictors clinical variables of high risk prostate cancer. **Conclusion:** This study results suggest that the *GSTM1* null and *GSTT1* null polymorphisms can be relevant markers to future clinical applications, when associated to high risk prostate cancer.

**Keywords:** Elderly. Neoplasia. Suscepibility.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**GST** – Glutathione S-transferase

**GSTM1** – Gene glutathione S-transferase mu 1.

**GSTT1** – Gene glutathione S-transferase teta 1.

**GWS** – Estudos de Ampla Associação do Genoma (do inglês *Genome-Wide Association Study*).

**INCA** – Instituto Nacional do Câncer.

**KB** – Mil pares de bases.

**MTHFR** – Metileno-tetra-hidrofolato redutase.

**NG/ML** – Nanograma por mililitro.

**PB** – Pares de bases.

**PCR** – Reações em cadeia polimerase

**PSA** – Antígeno Prostático Específico (do inglês *Antigen Prostate Specific*).

**RFLP** – Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (do inglês *Restrict Fragment Length Polymorphism*).

**SNP** – Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*).

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1** - Variantes suscetíveis associadas ao câncer de próstata.....**p.17**
- Figura 2** - Visão oblíqua e anterior da próstata e da uretra.....**p.18**
- Figura 3** - Gene *GSTM1* flanqueado por duas regiões idênticas, as quais por recombinação homóloga resulta na deleção de 16 kb contendo o gene inteiro.....**p.22**
- Figura 4** - Gene *GSTT1* flanqueado por duas regiões HA3 e HA5 que contêm 403 pb idênticas, identificadas como regiões deletadas no gene.....**p. 23**
- Figura 5** – *GSTM1* e tiorredoxina (Trx) atuando como inibidores de ASK1.....**p.25**
- Figura 6** – Padrão de bandas na análise do polimorfismo *GSTM1 nulo* e *GSTT1 nulo*.....**p.33**
- Figura 7**- Padrão de bandas na análise do polimorfismo *MTHFR C677T*.....**p.34**

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Classificação de risco, de acordo com D’Amico, para o câncer de próstata.....	<b>p.20</b>
<b>Tabela 2</b> – Padrão de análise dos polimorfismos.....	<b>p.32</b>
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros de ciclagem adotados nas reações de <i>PCR</i> .....	<b>p.32</b>
<b>Tabela 4</b> – Categorização binária das variáveis clínicas.....	<b>p.35</b>
<b>Tabela 5</b> – Distribuição de idade e <i>PSA</i> entre os grupos caso e controle.....	<b>p.36</b>
<b>Tabela 6</b> – Características clínicas dos pacientes.....	<b>p.36</b>
<b>Tabela 7</b> – Associação dos polimorfismos <i>GSTM1</i> nulo, <i>GSTT1</i> nulo com o câncer de próstata.....	<b>p.38</b>
<b>Tabela 8</b> – Associação dos modelos aditivos, dominante, recessivo e co-dominante do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T com o câncer de próstata.....	<b>p.38</b>
<b>Tabela 9</b> – Associação entre as variáveis clínicas e os polimorfismos <i>GSTM1</i> nulo, <i>GSTT1</i> nulo e <i>_M1</i> nulo/ <i>_T1</i> nulo.....	<b>p.39</b>
<b>Tabela 10</b> – Associação entre as variáveis clínicas e os modelos aditivos do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T.....	<b>p.40</b>
<b>Tabela 11</b> – Associação entre as variáveis clínicas e o modelo dominante do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T.....	<b>p.41</b>
<b>Tabela 12</b> – Associação entre as variáveis clínicas e o modelo co-dominante do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T.....	<b>p.41</b>
<b>Tabela 13</b> – Associação entre as variáveis clínicas e o modelo recessivo do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T.....	<b>p.42</b>
<b>Tabela 14</b> – Distribuição das frequências genótípicas dos polimorfismos <i>GSTM1</i> nulo e <i>GSTT1</i> nulo sozinhos e combinados comparadas com outras populações.....	<b>p.43</b>
<b>Tabela 15</b> – Distribuição das frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo <i>MTHFR</i> C677T comparadas com outras populações.....	<b>p.43</b>

**SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 Câncer de Próstata: Epidemiologia e Fatores de Suscetibilidade .....	15
2.2 Patogenia e Diagnóstico do Câncer de Próstata .....	18
2.3 Prognóstico do Câncer de Próstata .....	19
2.4 Polimorfismos e o Câncer de Próstata .....	21
2.5 Os Genes GSTM1 e GSTT1 e os Polimorfismos Nulos .....	21
2.6 O Gene MTHFR e o SNP C677T .....	25
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 Objetivo Geral .....	28
3.2 Objetivos Específicos .....	28
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	29
4.1 Seleção dos sujeitos e aspectos éticos .....	29
4.2 Extração, Quantificação e Armazenamento do DNA .....	30
4.3 Amplificação e Análise das Regiões Polimórficas .....	31
4.4 Análise estatística .....	34
<b>5 RESULTADOS</b> .....	35
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é a neoplasia de maior incidência em escala global na população masculina (NAGHAVI et al., 2015). No Brasil, ele é o segundo tipo de câncer mais frequente em homens, precedido apenas do câncer de pele não-melanoma e no estado do Piauí, o número de casos triplicaram entre os anos de 2003 a 2016 (BRASIL, 2002; BRASIL, 2016). O câncer de próstata de alto risco se manifesta principalmente em idosos com idade avançada, nos quais 65% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em indivíduos com idades iguais ou superiores a 65 anos, e portanto, sua incidência tem aumentado nos países desenvolvidos, onde a população é predominantemente idosa (BRASIL, 2014).

A complexa etiologia e heterogeneidade clínica do câncer de próstata dificultam as investigações quanto à melhor forma de prevenção, diagnóstico, prognóstico e tratamento dessa doença. Visto que as atuais formas de prevenção e detecção são ainda imprecisas, fatores de suscetibilidade são levados em consideração como: idade, histórico familiar, dieta, consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo. Vários trabalhos demonstraram resultados conflitantes sobre a correlação dos fatores supracitados com o desenvolvimento, incidência e prevalência desse câncer em diferentes etnias (KIMURA, 2012; BAENA; SALINAS, 2014; MANDAIR et al., 2014).

O conhecimento dos polimorfismos em genes candidatos ao desenvolvimento do câncer de próstata irá permitir melhores formas de prevenção e diagnóstico dessa doença. Neste contexto, os polimorfismos nos genes glutathione S-transferase mu 1 (*GSTM1*), glutathione S-transferase teta 1 (*GSTT1*) e metileno-tetra-hidrofolato (*MTHFR*) são importantes para as investigações de associações genéticas e há muito tempo estudados por seu papel no metabolismo celular. As glutathione S-transferases (GSTs) são enzimas multifuncionais codificadas por genes como *GSTM1* e *GSTT1*, com importante função na desintoxicação metabólica, metabolização dos agentes quimioterápicos do câncer e subprodutos do estresse oxidativo. Os polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo acontecem por um evento de recombinação homóloga e repetição de pares de bases, o que resulta na deleção das regiões que contêm os genes *GSTM1* e *GSTT1* inteiros, comprometendo a função enzimática das GSTs (PARL, 2005; FROVA, 2006). O gene *MTHFR* codifica a enzima 5-10 metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR) envolvida na via metabólica do folato, um

importante substrato percussor do metabolismo celular. O polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP* do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) *MTHFR* C677T ocorre pela substituição do alelo citosina (C) pelo alelo timina (T) na posição do nucleotídeo 677, ocasionando a redução da atividade da enzima citada (IZMIRLI, 2013).

A associação dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo sozinhos e *\_M1* nulo/*\_T1* nulo combinados e modelos genéticos aditivos (*CC vs. CT*), (*CC vs. CT*), dominante (*CC vs. CT+TT*), co-dominante (*CT vs. CC+TT*) e recessivo (*TT vs. CC+CT*) do polimorfismo *MTHFR* C677T com o câncer de próstata tem sido foco em pesquisas recentes, relacionando-os com a progressão ou não dos níveis de *PSA* (*PSA*<sup>1</sup> do inglês *Antigen Prostate Specific*), escore de Gleason e estadiamento tumoral TNM (EMEVILLE et al., 2014; GUO et al., 2015a; MANSOUR et al., 2015; WANG; LI; JIANG, 2016). Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a relação desses polimorfismos com a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata de alto risco em uma população do Piauí. Estes estudos são relevantes para o conhecimento dos mecanismos moleculares do câncer de próstata e poderão fornecer subsídios importantes para a aplicação clínica, tanto na prevenção do câncer de próstata como no tratamento, uma vez que o conhecimento prévio da predisposição genética de indivíduos saudáveis suscetíveis a doença e de pacientes com esse câncer poderá reduzir a mortalidade e auxiliar em tratamentos mais direcionados e eficazes.

---

<sup>1</sup>Antígeno prostático específico (*PSA*) é um produto do epitélio prostático, secretado normalmente no sêmen. É uma serino protease cuja função é clivar e liquefazer o coágulo seminal formado após a ejaculação. Em homens normais, apenas quantidades mínimas de *PSA* circulam no soro (ROBBINS; COTRAN, 2010).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer de Próstata: Epidemiologia e Fatores de Suscetibilidade

O câncer de próstata é uma das malignidades de maior incidência nos homens em escala global, com 1,4 milhões de casos incidentes e 293.000 mortes em 2013 (NAGHAVI et al., 2015). No *ranking* geral, está na quinta posição entre os tipos de câncer mais comum, e na população masculina, é o segundo câncer mais frequentemente diagnosticado (FERLAY et al., 2015). A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 61.200 mil casos novos de câncer de próstata (BRASIL, 2015). Essa neoplasia é a mais incidente entre os homens em todas as regiões do Brasil, inclusive na região nordeste, com 51,84/100 mil homens por ano (BRASIL, 2015). No Piauí, estima-se 890/100 mil homens casos novos por ano e na sua capital 210/100 mil homens casos novos por ano, com taxas brutas de 61,82%, 55,41% e 53,60%, respectivamente (BRASIL, 2015). Em 2003, essas estimativas foram consideravelmente inferiores as de 2016, com 35.240 casos novos desse câncer /100 mil homens no Brasil, 220/100 mil homens no estado do Piauí e 100/100 mil homens na capital Teresina com taxas brutas de 17,69%, 15,39% e 30,45%, respectivamente (BRASIL, 2002).

A relação da ligação geográfica com os padrões temporais do câncer que correspondem aos níveis de progresso econômico e social são características chaves para uma avaliação global do câncer (BRAY et al., 2013). Em 2013, o câncer de próstata foi mais prevalente em países desenvolvidos, onde a população é predominantemente idosa, do que em países em desenvolvimento (NAGHAVI et al., 2015). Neste contexto, a taxa de incidência estimada é crescente em países de alta-renda (América do Norte, Oceania, Europa Ocidental, Austrália/Nova Zelândia e Japão), enquanto que as taxas de mortalidade são altas em países de baixa e média renda, onde há maior prevalência do câncer de próstata de alto risco (Sul da África, Caribe, América do Sul) (CENTER et al., 2012). A disseminação do rastreamento do câncer de próstata por meio do exame de dosagem de *PSA*, dentro do espectro considerado normal pela maioria dos autores ( $\leq 4,0$  ng/mL), tem contribuído para sua incidência aumentada em países desenvolvidos, entretanto não contribui para o declínio da mortalidade (FERLAY et al., 2010b; BRAY et al., 2013; CENTER, 2013; FERLAY et al., 2015).



O crescimento das taxas de incidência do câncer de próstata ao longo dos anos no Brasil pode ser devido ao aumento da expectativa de vida, melhoria da qualidade dos sistemas de informação do país e a ocorrência de sobrediagnóstico, em função da disseminação do rastreamento do câncer de próstata com *PSA* e toque retal (BRASIL, 2015). No entanto, esses fatores e um possível diagnóstico precoce nessa população não interferem no decréscimo da mortalidade por esse câncer de alto risco. De 2003 a 2013, houve aumento de 8.977 para 13.772 casos de óbitos por câncer de próstata no Brasil (BRASIL, 2014). Depois do câncer de mama, o câncer de próstata e coloretal estão entre os tipos diagnosticados com maior frequência em países desenvolvidos, não somente devido à extensão de exames para o auxílio na detecção dessas neoplasias, como também detecções de práticas associadas com a urbanização e desenvolvimento econômico (BRAY et al., 2013).

O Programa Nacional de Controle do Câncer de Próstata<sup>2</sup> expõe questões relacionadas ao desenvolvimento do câncer de próstata como idade avançada, histórico familiar, estilos de vida compartilhados entre os membros da família, dieta, consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo (BRASIL, 2002). Uma dieta rica em legumes, frutas e grãos é favorável para prevenir o câncer de próstata, assim como o consumo de carne vermelha processada ou cozida pode estar relacionado ao aumento das chances de ocorrência (BAENA; SALINAS, 2014; MANDAIR et al., 2014).

A variação da incidência do câncer de próstata em diferentes etnias tem sido avaliada como um possível fator de suscetibilidade. Essa neoplasia é mais comum em homens negros do que em homens brancos; ocorrendo com mais frequência em populações afro-americanas e menos frequente em populações asiáticas (JEMAL et al., 2009; WADHERA, 2013; CRAWFORD et al., 2015). No entanto, esse câncer pode ser identificado com maior prevalência em imigrantes asiáticos vivendo na América do Norte e países europeus do que nos seus países de nascimento, assim como imigrantes australianos do leste da Ásia tem taxas de dosagem de *PSA* significativamente mais baixas do que os homens nascidos na Austrália, o que leva a crer que o estilo de vida compartilhado pode ser um fator de maior suscetibilidade do que a etnia (KIMURA, 2012).

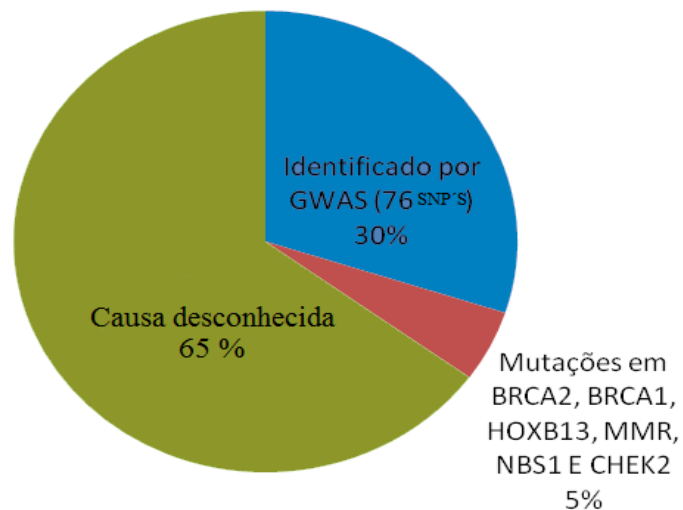
A relação entre fatores genéticos e influências ambientais pode ser um fator importante para o entendimento da patogênese do câncer de próstata (VISAKORPPI, 2003;

---

<sup>2</sup> O programa nacional do controle ao câncer de próstata foi uma implementação à Política Nacional do Câncer, em cumprimento à lei 10.289, de 20 de setembro de 2001 (BRASIL, 2002).

ATTARD et al., 2016). Os *SNPs* são variantes alélicas comuns que têm sido estudadas nos últimos anos e associadas a vários tipos de câncer, inclusive o de próstata; no entanto, seus efeitos modestos diminuem as chances de adequação em aplicações de detecção de doença (BAMBURY; GALLAGHER, 2012; BARBIERI et al., 2012). Mais de 20 estudos de associação do genoma-completo (*GWAS*, do inglês *Genome-Wide Association Study*) em câncer de próstata revelaram sua associação com 76 *SNPs* (ATTARD et al., 2015). Apesar de mutações em genes (por exemplo: *BRCA2*, *BRCA1*, *HOXB13*, *MMR*, *NBS1* e *GHEK2*) conferirem uma suscetibilidade aumentada, não somente para a neoplasia em estudo, como para outros tipos de cânceres, os *SNPs* podem ser mais frequentes e desempenhar um papel importante nos mecanismos moleculares das neoplasias (Figura 1) (VISAKORPI, 2003; BARBIERI et al., 2012; SAVAS et al., 2013; ATTARD et al., 2016).

**Figura 1** - Variantes suscetíveis associadas ao câncer de próstata



Fonte: adaptado de Attard et al. (2016).

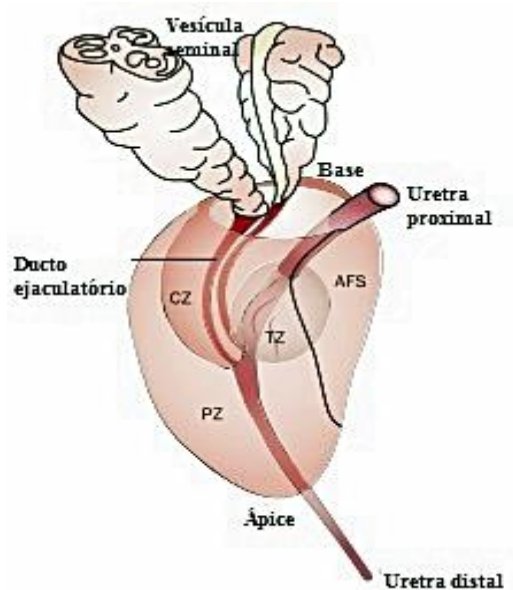
Uma série de estudos do tipo caso-controle tem avaliado evidências da suscetibilidade de associação dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *SNP MTHFR C677T* entre grupo de populações com câncer de próstata em vários estágios tumorais (COLLIN et al., 2009; YANG et al., 2013; EMEVILLE et al., 2014; ALBENDIZADEH et al., 2015). A

descoberta de mais de 50 polimorfismos associados com as chances de desenvolver o câncer de próstata nos últimos sete anos é uma das maiores contribuições para o entendimento de sua etiologia, e poderão futuramente ter potencial utilidade para a prevenção, diagnóstico, prognóstico e tratamento dessa doença (XU et al., 2013).

## 2.2 Patogenia e Diagnóstico do Câncer de Próstata

A próstata é um órgão retroperitoneal que se situa na pelve masculina, logo abaixo da bexiga e à frente do reto. A uretra origina a partir da bexiga e segue um curso por meio da próstata e assoalho pélvico no pênis (WADHERA, 2013). A próstata está dividida em quatro zonas distintas (periférica, central, transicional e estroma fibromuscular anterior) (Figura 2). O tipo mais comum de câncer de próstata, o adenocarcinoma, geralmente se desenvolve na zona periférica (ROBBINS; COTRAN, 2010). Esse tipo de câncer apresenta comportamento heterogêneo e pode ser classificado como (1) invasivo, quando tende a metastizar; (2) latente, que corresponde a pequenos focos de carcinoma bem diferenciados; e (3) oculto, quando é clinicamente inaparente (GLINA, S.; VIEIRA, 2010).

**Figura 2** - Visão oblíqua e anterior da próstata e da uretra.



Fonte: Adaptado de Wadhera (2013).

Para o diagnóstico do câncer de próstata, o exame digital do reto pode detectar o câncer de próstata precocemente, no entanto, o teste do *PSA* é o exame mais utilizado como ferramenta de triagem para auxiliar o diagnóstico precoce dessa doença (ROBBINS; COTRAN, 2010). O *PSA* é uma glicoproteína produzida quase que exclusivamente no componente epitelial da glândula prostática, e o aumento dos seus níveis na circulação está relacionado a doenças na próstata. Tradicionalmente, valores acima de 4,0 ng/mL são indicativos da necessidade de biópsia (BARRY, 2001)..

Apesar dos níveis de *PSA* estarem frequentemente elevados em pacientes com câncer de próstata, também podem estar elevados na hiperplasia prostática benigna (LILJA, 2003; ROBBINS; COTRAN, 2010). É importante considerar o *PSA* como uma variável contínua e analisar outros fatores como a cinética do *PSA*, etnia, biópsia progressiva, história familiar, idade e relação de *PSA* total e livre (GLINA, S.; VIEIRA, 2010). Um estudo utilizou como valor de referência o nível sérico de *PSA*  $\leq 2,0$  ng/mL em homens negros acima dos 40 anos para garantir maior sensibilidade do teste, devido a sua suscetibilidade aumentada nesse grupo étnico (FLESHNER; LAWRENTSCHUK, 2009). Embora existam achados característicos do câncer de próstata na ultrassonografia transretal e em outras modalidades de imagem, a biópsia por agulha transretal é necessária para confirmar o diagnóstico (ROBBINS; COTRAN, 2010). Também correlacionam o nível sérico de *PSA* com o estágio TNM e escore de Gleason do tumor, e podem ser utilizados para triagem e prognóstico desse câncer (SCHULZ; HATINA, 2006; TAYLOR et al., 2010; SONAWANE et al., 2016).

### **2.3 Prognóstico do Câncer de Próstata**

Para o prognóstico exato são necessários métodos para quantificar a provável agressividade clínica, extensão e disseminação do tumor no paciente e assim definir a melhor forma de tratamento (GLINA, S. & VIEIRA, 2010). Sempre quando houver anormalidades na dosagem do *PSA* e toque retal, a biópsia da próstata é necessária para identificar e qualificar o possível tumor de acordo com o escore de Gleason e o estágio TNM.

O escore de Gleason leva em conta o padrão glandular e a relação entre glândulas e estroma prostático. Sendo assim, os tumores são classificados de acordo com a diferenciação celular de 1 a 5, sendo grau 1 o mais bem diferenciado e o grau 5, o mais indiferenciado. O escore final de Gleason é dado pela soma dos graus de padrão primário (predominante) e

secundário (segundo grau histológico mais comum). Dessa forma, as neoplasias mais bem diferenciadas seriam escore 2 (1+1) e as mais indiferenciadas 10 (5+5) (HUMPHREY, 2004). Os tumores com escores 2 a 4 são bem diferenciados, os de 5 a 7 são moderadamente diferenciados e os de 8 a 10 são tumores indiferenciados (PARTIN et al., 1993).

O sistema de estadiamento TNM baseia-se na extensão da lesão primária (T), caracterizada como T1 a T4, e o T0 é usado para indicar uma lesão *in situ*; na extensão de sua disseminação para os linfonodos regionais (N), onde N0 significaria ausência de envolvimento linfonodal, enquanto que N1 a N3 denotaria envolvimento de um número e abrangência crescentes de linfonodos; e na presença ou ausência de metástases hematogênicas (M), onde M0 significa ausência de metástases a distância, enquanto M1, ou algumas vezes M2, indica a presença de metástases e algum julgamento sobre o seu número (ROBBINS; COTRAN, 2010). As características citológicas, como o grau de diferenciação das células tumorais e a variação do tamanho e das formas dos constituintes celulares do tumor, são levadas em consideração no estadiamento do tumor (FALLIS, 2013).

O grau histológico do tumor de próstata deve ser sempre levado em conta ao escolher a melhor forma de tratamento. Sabe-se que os pacientes diagnosticados com escore de Gleason menor do que 7 (bem diferenciados) podem se beneficiar de uma abordagem terapêutica menos agressiva, enquanto que aqueles com escore maior do que 8 (pouco diferenciados) devem ser tratados de forma mais agressiva, justificando a associação de cirurgia, radioterapia e/ou hormônioterapia (MONTENEGRO; FRANCO, 2006; PIERORAZIO et al., 2013). Para a compreensão do grau histológico do tumor, o sistema de classificação de risco mais utilizado de acordo com D'Amico, desde 1998, refere-se ao  $PSA < 10$  ng/mL, escore de Gleason  $\leq 6$  e estágio tumoral T1c ou T2a para classificar pacientes com câncer de próstata de baixo risco. Para classificar pacientes de risco intermediário, refere-se ao  $PSA \geq 10 < 20$  ng/mL e/ou escore de Gleason = 7 e/ou estágio tumoral T2b. Quanto aos pacientes de alto risco, devem apresentar  $PSA \geq 20$  ng/mL e/ou escore de Gleason  $\geq 8$  e/ou estágio tumoral T2c/T3 (D' AMICO, 2011) (Tabela 1).

<b>Tabela 1 - Classificação de risco, de acordo com D'Amico, para Câncer de Próstata</b>	
<b>Risco Baixo</b>	$PSA < 10$ ng/mL e escore de Gleason $\leq 6$ e estágio clínico T1c ou T2a
<b>Risco Intermediário</b>	$PSA \geq 10$ , mas $< 20$ ng/mL ou escore de Gleason = 7 ou estágio clínico T2b
<b>Risco Alto</b>	$PSA \geq 20$ ng/mL ou escore de Gleason $\geq 8$ ou estágio clínico T2c/T3

Fonte: Adaptado de D'Amico (2011).

Recentes estudos têm avaliado o papel dos polimorfismos *GSTMI* nulo, *GSTT1* nulo e *MTHFR* C677T associados com um bom ou mau prognóstico do tumor na próstata e coloretal, buscando perspectivas futuras em aplicações clínicas no tratamento dessas doenças (BAI et al., 2009; KÜÇÜKHÜSEYİN et al., 2011; KRUGER et al., 2015; YAN et al., 2016).

## 2.4 Polimorfismos e o Câncer de Próstata

Polimorfismos são variações nas sequências de nucleotídeos, apresentam frequência maior do que 1% em uma população e podem ser *SNPs*, de inserção ou deleção, repetição em tandem ou polimorfismos nulos (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013). Os *SNPs* podem resultar em variações no sítio de restrição das enzimas, influenciar nas taxas de transcrição, afetar a estabilidade de mRNA e alterar os níveis de proteína traduzida. São as formas mais comuns, frequentemente bialélicas e favoráveis para a utilização de tecnologias de genotipagem por meio da técnica de Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (*RFLPs*, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*), que analisam um grande número de amostras em curto espaço de tempo (BALASUBRAMANIAN et al., 2004).

Polimorfismos em genes com papel crucial na maquinaria celular têm sido estudados, relacionando-os a suscetibilidade com o câncer de próstata em diferentes populações na Europa, África, Ásia e miscigenadas, no entanto, os resultados são controversos entre as diferentes etnias (LOHMUELLER et al., 2003; CORDELL; CLAYTON, 2005; LEWIS; BAI et al., 2009; COLLIN et al., 2009; LI; XU, 2012; KNIGHT, 2012; SAVAS et al., 2013; YANG et al., 2013; DURSO et al., 2014).

## 2.5 Os Genes *GSTMI* e *GSTT1* e os Polimorfismos Nulos

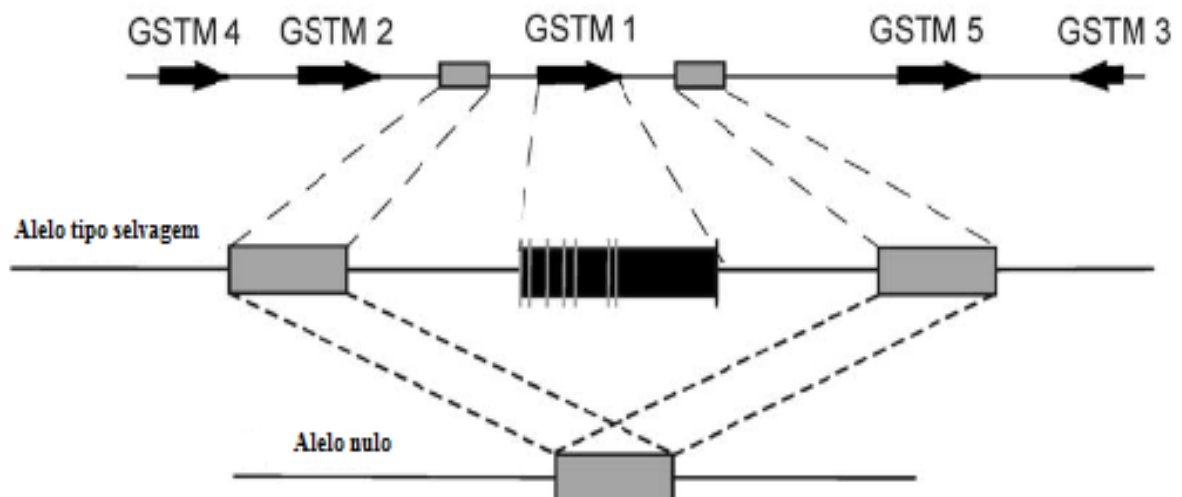
Nos seres humanos, oito famílias de genes codificam as glutatona s-transferase (*GSTs*) solúveis (alfa, mu, teta, pi, zeta, sigma, kappa e ômega) (STRANGE et al., 2001). A classificação dessas famílias é de acordo com substrato específico, afinidade química, estrutura, sequência de aminoácido e comportamento cinético da enzima (LANDI, 2000). O gene *GSTMI* está entre as cinco classes de genes da família mu, situados em tandem (5'-

*GSTM4-GSTM2-GSTM5-GSTM3-3'*), agrupados em 20 kb, localizado no cromossomo 1 (1p13.3). O gene *GSTT1* faz parte da família teta, mapeado no cromossomo 22 (22q11.2) e separado por 50 kb (PARL, 2005). Numerosos polimorfismos existem nos genes GSTs humanos, incluindo a completa ausência de *GSTM1* ou *GSTT1*, com frequências de 20% a 50% em algumas populações (NEBERT; VASILIOU, 2004).

As GSTs fazem parte de uma família de enzimas multifuncionais envolvidas no metabolismo de fase II, com papel fundamental na detoxificação celular de uma ampla variedade de componentes exógenos e endógenos (FROVA, 2006). As GSTs catalisam a conjugação do tripeptídeo glutationa com uma ampla variedade de componentes eletrofílicos, como os produtos de estresse oxidativo, poluentes ambientais e carcinógenos, deixando tais componentes mais solúveis, prontos para serem excretados ou compartimentados por enzimas metabólicas de fase III (PARL, 2005; FROVA, 2006). Elas também podem metabolizar agentes quimioterápicos de câncer e subprodutos do estresse oxidativo (LANDI, 2000; HAYES et al., 2004).

Os polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo acontecem quando são deletados em homozigotos, conseqüentemente não expressos em suas respectivas proteínas, e essa deleção é causada, provavelmente, por um evento de recombinação homóloga, envolvendo repetições de pares de bases (PARL, 2005). O gene *GSTM1* está em uma região que contém muitas seqüências repetitivas e flanqueado por duas regiões idênticas com 4,2 kb (Figura 3).

**Figura 3** - Gene *GSTM1* flanqueado por duas regiões idênticas, as quais por recombinação homóloga resulta na deleção de 16 kb contendo o gene inteiro.



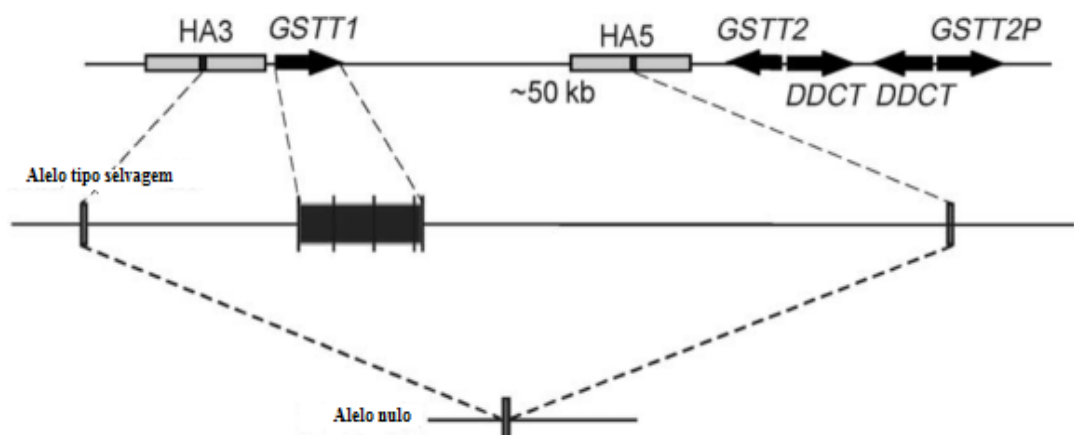
Fonte: Adaptado de Parl (2005).

O polimorfismo *GSTM1* nulo acontece por recombinação homóloga dessas sequências repetitivas localizadas nas extremidades direita e esquerda, o que resulta em uma deleção de 16 kb, contendo o gene *GSTM1* inteiro (PARL, 2005). Uma análise da seção de 119 kb contendo os genes *GSTT1* e *GSTT2* revelaram homólogos extensos com duas regiões (HA3 e HA5) de 18 kb com mais de 90% de homologia flanqueando *GSTT1*. As regiões HA3 e HA5 contêm duas repetições de 403 pb idênticas, que são identificadas como regiões de deleção do polimorfismo *GSTT1* nulo por meio de sua recombinação homóloga (Figura 4) (PARL, 2005).

As células que apresentam o polimorfismo nulo desses genes são mais suscetíveis à troca de cromátides irmãs, levando a exposição a vários eletrófilos, decréscimo na detoxificação de carcinógenos e agentes quimioterápicos ou ambientais (HAYES; STRANGE, 2000; NEBERT; VASILIOU, 2004). As diferenças na capacidade de metabolizar drogas podem ser atribuídas à variação genética na população, ou podem ser devido a outros fatores, tais como indução de enzimas afetadas por dietas ou drogas (HAYVES; STRANGE, 2000).

Estudos recentes têm avaliado a suscetibilidade dos polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo com vários tipos de câncer (mama, esôfago, oral, bexiga, rins e próstata), apresentando controvérsias com relação à etnia e a correlação com os fatores de risco, tais como fumo e álcool (HU et al., 2015; KRUGER et al., 2015; JUNE et al., 2015; SHARMA et al., 2013).

**Figura 4** - Gene *GSTT1* flanqueado por duas regiões HA3 e HA5 que contêm 403 pb idênticas, identificadas como regiões de deleção desse gene.



Fonte: Adaptado de Parl (2005).

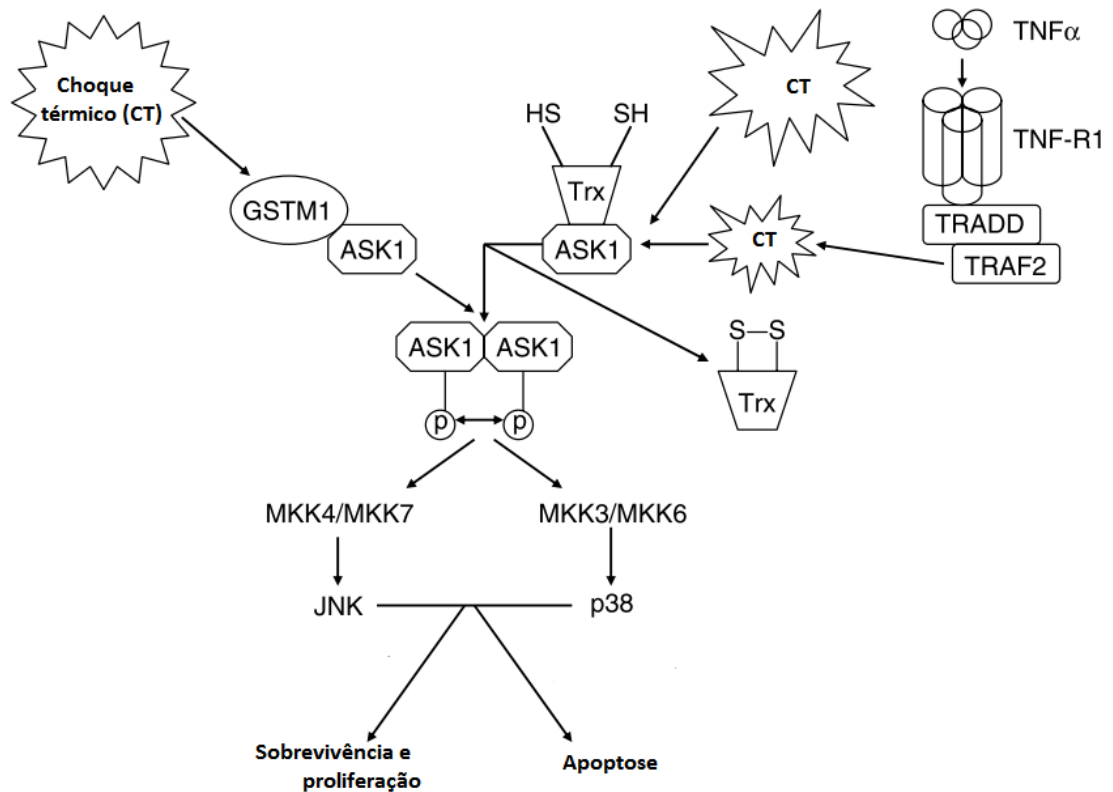


A expressão de GST em células cancerosas pode ser um fator importante no aparecimento de um fenótipo mais agressivo e resistente (RAMSAY; DILDA, 2014). Com relação ao câncer de próstata de alto risco, vários estudos expressam resultados conflitantes quanto a sua suscetibilidade com esses polimorfismos em diferentes etnias (caucasianos, africanos, asiáticos e afro-americanos), inclusive na associação dupla desses genótipos com esse câncer em estágios clínicos de baixo, médio e alto risco (GONG et al., 2012; WEI et al., 2012; YANG; DU; YAO, 2013; EMEVILLE et al., 2014).

Alguns trabalhos demonstram efeito de proteção do genótipo *GSTM1* nulo com câncer de mama em caucasianas, esofageal e aerodigestivo na Índia, tireoide papilífero em Portugal e oral no Brasil (ROODI et al., 2004; LEMOS, 2008; HATAGIMA et al., 2008; SHARMA et. al, 2013; BANSAL et al., 2015). Os genes *GSTM1* e *GSTM2* partilham semelhanças consideráveis entre a identidade da sequência e padrão de expressão enzimática, o que pode justificar o efeito de proteção do polimorfismo *GSTM1* nulo com o câncer (BHATTACHARJEE et al., 2013a). A deleção desse gene também pode ser vantajosa para célula, uma vez que a expressão alterada da proteína GSTM1 pode prejudicar a terapia de tumores e influenciar no mau prognóstico do câncer, portanto, qualquer influência enzimática ou condições estressantes podem influenciar o seu papel na regulação da cinase ASK1 envolvida em mecanismos de apoptose celular (Figura 5) (DORION; LAMBERT; LANDRY, 2002; MCILWAIN; TOWNSEND; TEW, 2006).

Um estudo de caso-controle conduzido na Europa demonstrou que indivíduos portadores do polimorfismo *GSTM1* nulo apresentaram menos probabilidade de desenvolver o câncer de próstata, quando obtinham em sua dieta, alimentos rico em glucosinolatos (couve-flor, espinafre, couve, rúcula, repolho, agrião, mostarda), nos quais mantinham os isotiocianetos, substâncias responsáveis pela proteção de células contra o estresse oxidativo, por mais tempo no metabolismo (STEINBRECHER et al., 2010).

**Figura 5** – GSTM1 e tiorredoxina (Trx) atuando como inibidores de ASK1.



Estresses diversos, tais como o choque térmico (CT) ou fatores de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ), podem provocar a liberação de ASK1 a partir do complexo GSTM1-ASK1 ou TRX-ASK1. A cinase ASK1 é ativada por meio da autofosforilação que por sua vez ativa as quinases (MKK4/MKK7, MKK3/MKK6, JNK e p38). O destino da célula é dependente da exposição tempo e concentração do estresse. Fonte: Adaptado de McIlwain (2006).

## 2.6 O Gene *MTHFR* e o SNP C677T

O gene *MTHFR* está localizado no cromossomo 1 (1p36.3). Vários polimorfismos foram descritos nesse gene, alguns dos quais prejudicam a eficiência de sua transcrição ou a função de seu produto proteico. Desses polimorfismos, o mais estudado é *MTHFR* C677T, caracterizado pela substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) na posição do nucleotídeo 677 e pela consequente substituição do aminoácido alanina por valina no códon 222 (Ala222Val) (IZMIRLI, 2013). Em indivíduos com genótipo homozigoto TT, a atividade da enzima *MTHFR* é reduzida em 30%, enquanto que em indivíduos heterozigotos CT, em 65%, ambos comparados a atividade enzimática normal do genótipo selvagem CC (FROSST et al., 1995).

A redução na atividade da enzima MTHFR ocasionada pelo polimorfismo *MTHFR* C677T diminui os níveis de folato no plasma, levando a hipometilação do DNA e instabilidade genômica (XIE et al., 2015). A enzima MTHFR catalisa a redução do 5,10-metilenotetrahidrofolato (CH<sub>2</sub>THF) em 5-metiltetrahidrofolato (CH<sub>3</sub>THF), o primeiro é essencial para a síntese de pirimidinas e purinas, enquanto que o segundo é a forma circulatória de folato mais abundante, responsável pela doação de grupos metil para a remetilação da homocisteína em metionina (SCHWAHN; ROZEN, 2001). Portanto, um bloqueio na produção da enzima MTHFR leva a um elevado nível sérico de homocisteína a uma redução nos níveis de metionina (GOYETTE et al., 1994). A deficiência nessa atividade enzimática pode ocasionar hiperhomocisteinemia e consequentemente homocistinúria (JAMIL, 2014).

A redução do substrato de MTHFR 5,10-metilenotetrahidrofolato causa a redução dos níveis de biossíntese de timidilato, levando a desequilíbrios de grupos de desoxinucleotídeos e aumento da incorporação incorreta de uracila no DNA, que potencialmente causa danos cromossômicos, rupturas de cadeia dupla de DNA e hipometilação de DNA (FROSST et al., 1995). Neoplasias malignas derivadas de tecidos que proliferam rapidamente e têm maior necessidade de síntese de DNA, devem ser mais suscetíveis à deficiência de folato e danos resultantes de DNA (WU et al., 2010). Entretanto, a hipometilação do DNA pode resultar na expressão de genes supressores de tumores e inibir o desenvolvimento de câncer de próstata (LEE et al., 1997; NELSON et al., 2004). O que justifica o efeito de proteção do polimorfismo *MTHFR* C677T associado ao câncer de próstata (KÜÇÜKHÜSEYİN et al., 2011; LI; XU, 2012).

O folato é um dos mais importantes substratos precursores do metabolismo celular, agindo como transportador de fragmentos de carbono, responsável pela síntese de purina-pirimidina, DNA, RNA e pela metilação do DNA e de proteínas (IZMIRLI, 2013). Por meio do isolamento do cDNA de *MTHFR*, foi possível identificar sua função cromossômica e a relação com o metabolismo do folato (GOYETTE et al., 1994). Portanto, alterações funcionais no gene *MTHFR* podem causar desordens, desempenhando importante papel na tumorigênese. Um estudo demonstrou chances aumentadas para a ocorrência do câncer de próstata entre homens com baixo consumo de folato e portadores do polimorfismo *MTHFR* C677T (KOBAYASHI, 2012).

No Brasil, ainda não há pesquisas que avaliam a suscetibilidade de *MTHFR* C677T com o câncer de próstata, apenas para outros tipos de câncer (mama, tireóide e coloretal (BATSCHAUER et al., 2011; BARBOSA et al., 2012; BARBOSA et al., 2015; LOPES et al., 2016). Alguns estudos sugerem associação de *MTHFR* C677T com o câncer de próstata em vários estágios tumorais, outros demonstram o efeito de proteção do seu homozigoto mutante 677TT contra esse câncer, enquanto há estudos que não relatam qualquer associação (COLLIN et al., 2009; KÜÇÜKHÜSEYİN et al., 2011; FARD-ESFAHANI et al., 2012; LI; XU, 2012; ZHANG et al., 2012; ABEDINZADEH et al., 2015; GUO et al., 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar associações entre os polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *MTHFR* C677T com a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata de alto risco em pacientes no Estado do Piauí.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Comparar os genótipos dos polimorfismos encontrados nas populações caso e controle para analisar possíveis associações destes com a suscetibilidade ao câncer de próstata de alto risco;
- Comparação da frequência do genótipo desses polimorfismos no grupo de pacientes com câncer de próstata de alto risco, levando em consideração, variáveis como idade, níveis séricos de *PSA*, escore de Gleason e estágio tumoral TNM.
- Comparar as distribuições das frequências alélicas e genotípicas obtidas dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *MTHFR* C677T entre o grupo de indivíduos saudáveis deste estudo com as observadas em outras populações;

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Seleção dos sujeitos e aspectos éticos

Foram analisadas 156 pacientes diagnosticados com câncer de próstata de alto risco do Departamento de Urologia do Hospital São Marcos em Teresina, Piauí (grupo de casos), pertencentes ao biorrepositório que se encontra no laboratório de Biologia Molecular do Campus Ministro Reis Velloso na Universidade Federal do Piauí, e 193 indivíduos do sexo masculino sem histórico pessoal ou familiar de câncer, os quais constituem o grupo controle. Atendendo à resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos, este projeto teve seu protocolo aprovado no dia 13 de julho de 2010, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (CAAE nº 0140.0.045.000-10).

Amostras de sangue periférico dos pacientes com câncer de próstata de alto risco foram coletados no ato da prostatectomia, uma vez que em tal procedimento já se possui um acesso venoso, e não exclusivamente para a pesquisa, o que anula qualquer incômodo e risco desnecessário. Alternativamente, amostras frescas congeladas de tecido prostático foram fornecidas pelo Departamento de Patologia do Hospital para análise. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas sob refrigeração no Departamento de Patologia do Hospital, logo depois foram encaminhadas em caixas térmicas para o Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, para serem processadas.

Os pacientes ou seus responsáveis legais, foram informados da pesquisa e ao concordarem em participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), autorizando a coleta da amostra durante ou após o procedimento cirúrgico. Foram incluídos neste estudo voluntários com diagnóstico histopatológico de câncer de próstata de alto risco, sem distinção de cor e classe social e que constassem em seus registros médicos, informações clínicas de  $PSA \geq 20$  ng/mL e/ou escore de Gleason  $\geq 8$  e/ou estágio tumoral T2c/T3, com ou sem avanço nos linfonodos (N0-N2) e metástase (M0-M1), seguindo os parâmetros de estratificação tumoral de alto risco D'Amico et al. (2011). Foram excluídos do estudo indivíduos que, por qualquer razão ou motivo, tinham a sua capacidade de autodeterminação reduzida, sobretudo no que se refere ao TCLE, e indivíduos que já

possuíam um parente de 1º grau participando da pesquisa, estratégia que visa diminuir a semelhança amostral e, conseqüentemente, aumentar a significância dos resultados.

Como o câncer de próstata de alto risco acomete principalmente indivíduos idosos com médias de idade avançada, o grupo controle constitui-se de amostras de sangue periférico de homens idosos com médias de idades semelhantes, residentes de Parnaíba-PI, provenientes do banco de amostras controle. São idosos sem histórico de câncer, de doença prostática anterior ou de alteração em teste de *PSA* anterior, com resultado de *PSA*  $\leq 2,5$  ng/mL, valor usado como critério de inclusão, abaixo do que é considerado o valor normal para assegurar que o indivíduo do grupo controle tivesse menor chance de desenvolver câncer de próstata. Os mesmos critérios de inclusão foram adotados, e as amostras de sangue periférico foram obtidas por meio de punção venosa a vácuo, em tubos contendo EDTA, levadas em caixas térmicas para dosagem do *PSA*, em laboratórios na cidade de Parnaíba, conveniados com o Sistema Único de Saúde.

#### **4.2 Extração, Quantificação e Armazenamento do DNA**

As amostras de sangue periférico foram submetidas à extração do DNA com o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Inc., USA), de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, os seguintes passos foram seguidos: 300  $\mu$ L de sangue total foram adicionados à 900  $\mu$ L de solução de lise celular e a mistura incubada por 10 minutos com movimentos de inversão constantes; em seguida, após a centrifugação da mistura, descartou-se o sobrenadante, e as amostras foram levadas ao vórtex para evitar a formação de grumos nas etapas seguintes, que é a adição de uma mistura de 300  $\mu$ L de solução de lise nuclear e 100  $\mu$ L de solução de precipitação de proteínas; centrifugou-se novamente e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 300  $\mu$ L de isopropanol, submetendo novamente à centrifugação, seguida pelo descarte do sobrenadante e pela adição de etanol 70%; uma nova centrifugação foi feita e o sobrenadante foi então descartado e a amostra de DNA obtida, visível como uma massa branca no fundo do tubo que foi incubada com 100  $\mu$ L de uma solução de reidratação em banho-maria por 1 hora a 65°C para que o DNA fosse eluído, ou seja, para que ficasse disperso em solução de forma homogênea.

Para a extração do DNA a partir das amostras de tecido prostático, fragmentos de tecido (aproximadamente 20 mg) foram mecanicamente homogeneizados (homogeneizador

manual, modelo D-130, Wiggense SDN BHD) em solução de lise nuclear (*Wizard® Genomic Kit*, Promega Inc., USA) e depois incubados com 20 mg/mL de proteinase K a 65°C por 12 horas ou até que o fragmento estivesse completamente digerido. Subsequentemente, a proteinase K foi inativada a 95°C por 15 minutos e o produto total foi usado para a extração do DNA de forma semelhante ao procedimento de extração de DNA a partir de sangue periférico descrito anteriormente.

A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com GelRed TM® (Biotium, Hayward, CA, USA), e em espectrofotômetro (Biospec-nano, Shimadzu, Japan), por meio do comprimento de onda de 260 e 280 nm. Uma vez confirmada a pureza, concentração e qualidade das amostras, as mesmas foram armazenadas em freezer (-20°C) no Laboratório de Genética e Biologia Molecular, UFPI, Campus de Parnaíba.

### 4.3 Amplificação e Análise das Regiões Polimórficas

A avaliação da região polimórfica dos genes *GSTM1* e *GSTT1* (a presença ou ausência do alelo) foi analisada por reação em cadeia da polimerase (*PCR*) multiplex utilizando-se como controle positivo interno a amplificação do gene *CYP1A1*. As regiões polimórficas restantes foram analisadas pela técnica de *PCR* associada ao polimorfismo baseado no comprimento do fragmento de restrição (*PCR-RFLP*).

A reação de *PCR* foi realizada em um volume total de 25 µL para as regiões polimórficas de *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo, com as seguintes concentrações padrão: 200 µM de cada dNTPs (deoxinucleotídeo trifosfato), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (cloreto de magnésio), 0,4 µM de cada primer, 1,0 U de Taq DNA polimerase, 1 µL de DNA genômico, 2,5 µL de Tampão 1x e água estéril em quantidade suficiente para completar 25 µL. Para analisar o polimorfismo *MTHFR* C677T, a reação de *PCR* foi realizada em um volume total de 15 µL com as seguintes concentrações padrão: 200 µM de dNTPs (deoxinucleotídeo trifosfato), 1,3 mM de MgCl<sub>2</sub> (cloreto de magnésio), 0,3 µM de cada primer, 1,0 U de Taq DNA polimerase, 0,6 µL de DNA genômico, 2,5 µL de Tampão 1x e água estéril em quantidade suficiente para completar 15 µL. Vale ressaltar que, para todo conjunto de reações preparado, é usado um controle negativo (branco), no qual todos os reagentes estão presentes, com exceção do DNA, para o controle de possíveis contaminações com outro DNA que não seja o do indivíduo em



questão. Depois de misturados, os reagentes foram submetidos a diferentes padrões de ciclagem gerados em termociclador (AmpliTherm Thermal Cycler, Madison, WI, USA). A Tabela 2 apresenta os padrões de análise dos polimorfismos, como o *primer* utilizado e o tamanho do produto de amplificação e a Tabela 3 resume os parâmetros adotados para a amplificação da região polimórfica estudada.

**Tabela 2** – Padrões de análise dos polimorfismos.

Polimorfismos	Sequência de Primer (5' - 3')	Produto (pb)	RFLP	Alelos (pb)
<i>GSTMI</i> nulo	GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G	255		
<i>GSTTI</i> nulo	TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA	418		
<i>MTHFR</i> C677T	CTG ACT GTCA TCC CTA TTG GCA CCT CAC CTG GAT GGG AAA GAT	223	<i>HinfI</i>	C (223) T (124 e 99)
<i>CYP1A1</i>	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	312		

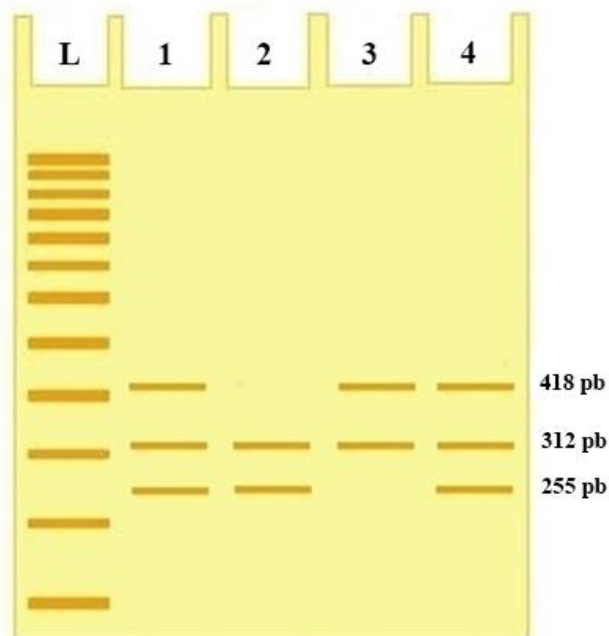
**Tabela 3** – Parâmetros de ciclagem adotados para as reações de *PCR*

Polimorfismo	Desnaturação Inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão final
<i>GSTMI</i> nulo	95°C / 5 min	95°C / 2 min	95°C / 2 min	72°C / 1 min	72° / 4 min
<i>GSTTI</i> nulo	95°C / 5 min	95°C / 2 min	59°C / 1 min	72°C / 1 min	72° / 4 min
<i>MTHFR</i> C677T	94°C / 3 min	94°C / 45 seg	54°C / 1 min	72°C / 0:45 min	72° / 7 min

Para averiguar a qualidade da amplificação, bem como excluir a possibilidade de contaminação, os produtos da *PCR* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corados com GelRed® e visualizados em transiluminador, sob luz ultravioleta, a partir do qual se realiza a foto-documentação do gel para posterior análise visual. A análise das amostras quanto ao genótipo dos polimorfismos *GSTMI* nulo e *GSTTI* nulo está sendo realizada após corrida eletroforética em gel de agarose 2% e subsequente visualização das bandas coradas previamente com *GelRed* TM® em transiluminador UV. A presença ou ausência (genótipo nulo) do gene *GSTMI* e *GSTTI* foi determinada pela presença ou ausência

de uma banda de 255 pb e 418 pb para os genótipos dos polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo, respectivamente, acompanhado pela presença de uma banda de 312 pb correspondente ao produto da amplificação do controle *CYP1A1* (Figura 6).

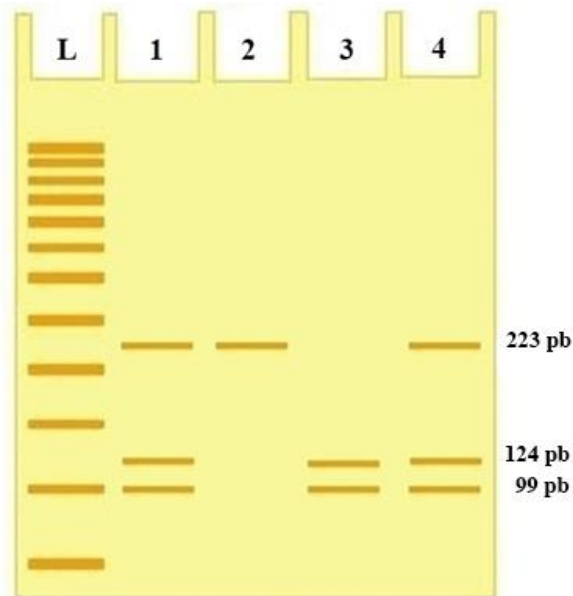
**Figura 6** - Padrão de bandas na análise do polimorfismo *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo.



Análise dos polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo pela técnica de PCR com seus respectivos genótipos 2 e 3. Gene *GSTM1* representado pela presença da banda na altura de 255 pb e *GSTT1* representado pela presença da banda na altura de 418 pb. O gene *CYP1A1* é o controle positivo da amplificação representado pela banda na altura de 312 pb.

As condições padronizadas para análise do polimorfismo *MTHFR* C677T pela técnica de *RFLP* corresponde a 0,1 µL enzima (1U); 0,8µL tampão; 3 µL PCR; 11,1 µL H<sub>2</sub>O; 37°C por 16 horas. Após a digestão, os produtos da *RFLP* foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), em cuba vertical, com uma corrente de 120V por 2 horas, e visualizados por meio da impregnação com nitrato de prata. O alelo T do polimorfismo citado cria um sítio de restrição que será reconhecido pela enzima *HinfI*. Os padrões de bandas esperados dos fragmentos para cada genótipo são C/C (223 pb/223 pb) nos indivíduos homocigotos selvagens, C/T (223 pb/124 pb e 99 pb) nos heterocigotos para o polimorfismo e T/T (124 pb e 99 pb/ 124 pb e 99 pb) nos homocigotos para o polimorfismo (Figura 7).

**Figura 7-** Padrão de bandas na análise do polimorfismo *MTHFR* C677T.



Análise do polimorfismo *MTHFR* C677T pela técnica *RFLP* com seus respectivos genótipos 2 : C/C (223 pb/223 pb), 1 e 4: C/T (223/124 pb e 99 pb/ e 223/124 pb e 99 pb) e 3 : T/T( timina/timina 124 pb e 99 pb/ 124 pb e 99 pb) e L: Ladder de 50 pb.

#### 4.4 Análise estatística

Ao final das análises, as populações caso e controle foram testadas quanto ao seu equilíbrio pela lei de Hardy-Weinberg. Para a análise da distribuição dos genótipos dos polimorfismos entre as duas populações foi utilizado o teste do Qui-Quadrado ou, quando necessário, o teste Exato de Fisher, mesmo teste estatístico aplicado para comparar as distribuições alélicas e genotípicas observadas entre a população controle deste estudo com as obtidas em outras populações.

Os polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo foram analisados separadamente e *\_M1* nulo/*\_T1* nulo combinados. Foram estimados os efeitos de quatro modelos genéticos do polimorfismo *MTHFR* C677T: modelos aditivos *CC* vs. *CT* e *CC* vs. *TT*, modelos dominante *CC* vs. *CT+TT*, co- dominante *CT* vs. *CC+TT* e recessivo *TT* vs. *CC+CT*.

Para verificar a distribuição dos genótipos dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *\_M1* nulo/*\_T1* nulo combinados, e modelos genéticos de *MTHFR* C677T entre as duas populações e das variáveis clínicas na população de pacientes, foi utilizado modelos de regressão logística não-condicional não ajustado e ajustado por idade, cada variável clínica foi

categorizada de forma binária de acordo com sua contribuição para a agressividade tumoral (Tabela 4).

Para determinação da distribuição das idades e *PSA* entre os grupos caso e controle foi realizado o teste de variância não-paramétrico Kruskalwallis.

As análises foram realizadas com o auxílio do pacote estatístico IBM SPSS Statistics versão 20.0.0. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$  como significativo) e intervalo de confiança de 95%. Para os modelos de regressão logística foram aplicados os testes de Cook, Hosmer-Lemeshow, teste de Omnibus e matriz de correlação a fim de avaliar a veracidade dos dados encontrados.

**Tabela 4** – Categorização binária das variáveis clínicas.

<b>Variáveis clínicas</b>	<b>Categorização binária</b>
<i>PSA</i> pré-operatório	$\geq 20$ ng/mL ou $< 20$ ng/mL
Escore de Gleason	$\geq 8$ (4+4) ou $< 8$ (4+4)
TNM	T1a/T2b (N0-N2/M0-M2) ou T2c/T3 (N0-N2/M0-M1)

## 5 RESULTADOS

Este estudo consiste na análise da associação entre os polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *MTHFR* C677T com a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata de alto risco em pacientes no estado do Piauí. Para o gene *MTHFR*, os grupos caso e controle foram testados e constatados o equilíbrio de Hardy-Weinberg, de acordo com o teste do Qui-quadrado apresentaram valores de  $p=0,282$  para casos e  $p=0,904$  para controles.

Foram analisadas 349 amostras, compreendendo 156 casos e 193 controles. Não houve diferenças significativas na distribuição da idade entre os grupos ( $p=0,115$ ). A média da idade dos casos foi de  $67,8 \pm 7,5$ , e os níveis de *PSA* ( $p < 0,001$ ), variando de 0,19 a 2.327 ng/mL (Tabela 5).

**Tabela 5** – Distribuição de idade e *PSA* entre os grupos caso e controle

	Controle (n=193)	Caso (n=184)	p
<b>Média de idade <math>\pm</math>DP</b>	68,3 $\pm$ 6,6 anos	67, 8 $\pm$ 7,5 anos	0,115
<b>Varição de idade</b>	54 - 97 anos	44-97 <sup>1</sup> anos	
<b><i>PSA</i> inicial (amplitude)</b>	1,09 (0,06-2,5) ng/ml	62,9 <sup>2</sup> (0,19 -2.327) ng/ml	<0,001

DP=Desvio Padrão,<sup>1</sup>Dados disponíveis para 183 amostras; <sup>2</sup>Dados disponíveis para 146 amostras.

A análise descritiva das amostras dos pacientes constata que 39,1% apresentam *PSA* pré-operatório maior que 20 ng/mL. Em relação ao escore de Gleason, 59,6% apresentam valores menores que 8 (4+4) e 40,3% maior ou igual a 8 (4+4). A maior parte dos pacientes possui tumor em estágio avançado, 67,9%, que corresponde aos níveis T2c-T4, contanto, sem comprometimento nodal e metástase (N0-M0) (Tabela 6).

**Tabela 6** – Características clínicas dos pacientes

Variáveis Clínicas	N (%)
<b>PSA pré-operatório</b>	
< 10	36 (23,1)
10 – 19,99	28 (17,9)
> 20	61 (39,1)
ND	31 (19,9)

<b>Escore de Gleason</b>	
< 8	93 (59,6)
≥ 8	59 (40,3)
ND	4 (2,6)
<b>Estágio Tumoral</b>	
T1/T2b (N0/M0)	12 (7,6)
T1/T2b (N1/M0)	11 (7,2)
T2c/T4 (N0/M0)	106 (67,9)
T2c/T4 (N1/M1)	4 (2,5)
T2c/T4 (N1/M0)	8 (5,1)
T2c/T4 (N0/M1)	11 (7,2)
ND	4 (2,5)

---

ND=Não disponível

Para a análise da associação dos genótipos com a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata de alto risco, foram utilizados modelos de regressão logística não-condicional normal e ajustado por idade, devido a desigualdade entre os números de caso e controle e entre os genótipos e as variáveis clínicas, além de eliminar fatores que possam influenciar na análise e interpretação dos dados deste estudo. Os modelos foram ajustado por idade, sabendo que essa variável está entre os fatores que influenciam no prognóstico do câncer de próstata.

Na análise da associação do polimorfismo *GSTMI* nulo com a suscetibilidade ao câncer de próstata de alto risco, foi demonstrado efeito de proteção contra esse subtipo tumoral (OR=0,5, IC 95%=0,3-0,8, p=0,005; O.R ajustado=0,9, IC 95%=0,9-1,0, p=0,019). O polimorfismo *GSTTI* nulo apresentou valor estatisticamente significativo com relação ao câncer de próstata de alto risco (OR=2,0; IC 95%=1,2-3,3; p=0,003; OR ajustado=1,0; IC 95%=0,9-1,0; p=0,001). A análise da combinação dos polimorfismos *\_MI* nulo/*\_TI* nulo não apresentou associação significativa com esse subtipo tumoral (OR=1,6, IC 95%=0,7-3,6, p=0,263; OR ajustado=1,0, IC 95%=0,9-1,0, p=0,333) (Tabela 7).

**Tabela 7** – Associação dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo com a suscetibilidade ao câncer de próstata.

<i>GSTM1/GSTT1</i>	Caso n(%)	Controle n(%)	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p <sup>1</sup>
<i>GSTM1</i> normal	138 (76,2)	120 (62,8)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>GSTM1</i> nulo	43 (23,8)	71 (37,2)	0,5 (0,3-0,8)	0,005*	0,9 (0,9-1,0)	0,019*
<i>GSTT1</i> normal	120 (66,7)	154 (80,6)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>GSTT1</i> nulo	60 (33,3)	37 (19,4)	2,0 (1,2-3,3)	0,003*	1,0 (0,9-1,0)	0,001*
<i>_MI</i> normal/ <i>_TI</i> normal	72 (39,7)	99 (51,8)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>_MI</i> nulo/ <i>_TI</i> nulo	10 (5,5)	16 (8,8)	1,6 (0,7-3,6)	0,263	1,0 (0,9-1,0)	0,333

<sup>1</sup>Ajustado por idade.

Não houve associação significativa entre os modelos genéticos aditivos *CC vs. CT* ( $p=0,556$ ;  $p^1=0,574$ ) e *CC vs. TT* de *MTHFR C677T* ( $p=0,851$ ;  $p^1=0,631$ ) com o câncer de próstata de alto risco. Os modelos genéticos dominante *CC vs. CT+TT* ( $p=0,605$ ;  $p^1=0,712$ ), co-dominante *CT vs. CC+TT* ( $p=0,404$ ;  $p^1=0,453$ ) e recessivo *TT vs. CC+CT* ( $p=0,575$ ;  $p^1=0,736$ ) também não apresentaram associação a suscetibilidade ao câncer de próstata de alto risco (Tabela 8).

**Tabela 8** – Associação dos modelos aditivos, dominante, recessivo e co-dominante do polimorfismo *MTHFR C677T* com o câncer de próstata.

<i>MTHFR C677T</i>						
Modelo aditivo	Caso n(%)	Controle n(%)	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p <sup>1</sup>
CC	100 (54,1)	110 (57)	1,00	1,00	1,00	1,00
CT	75 (40,5)	71 (36,8)	1,1(0,7-1,7)	0,556	0,9 (0,9 – 1,0)	0,574
TT	9 (4,9)	12 (6,2)	0,8(0,3-2,0)	0,851	1,0 (0,9 -1,0)	0,631
Modelo dominante	Caso(%)	Controle(%)				
CC	100 (54,1)	110 (57)	1,00	1,00	1,00	1,00
CT+TT	84 (45,6)	83 (43)	0,8(0,5-1,3)	0,605	0,9 (0,9-1,0)	0,712
Modelo co-dominante	Caso(%)	Controle(%)				
CT	75 (40,5)	71 (36,8)	1,00	1,00	1,00	1,00
CC+TT	109 (59,6)	122 (53,8)	0,8(0,5-1,2)	0,404	0,9(0,9-1,0)	0,453
Modelo	Caso(%)	Controle(%)				

<b>recessivo</b>						
TT	9 (4,9)	12 (6,2)	1,00	1,00	1,00	1,00
CC+CT	175 (95,1)	181 (93,7)	0,7 (0,3-1,8)	0,575	1,0 (0,9-1,0)	0,736

<sup>1</sup> Ajustado por idade.

Não houve associação dos polimorfismos *GSTM1* nulo ( $p=0,395$ ;  $p^1=0,911$ ), *GSTT1* nulo ( $p=0,519$ ;  $p^1=0,661$ ) e *\_MI* nulo/*\_TI* nulo ( $p=0,303$ ;  $p^1=0,731$ ) com o *PSA*. Não houve associação significativa entre os polimorfismos *GSTM1* nulo ( $p=0,620$ ;  $p^1=0,532$ ), *GSTT1* nulo ( $p=0,239$ ;  $p^1=0,327$ ) e *\_MI* nulo/*\_TI* nulo ( $p=0,419$ ;  $p^1=0,597$ ) com o escore de Gleason. Também não houve associação significativa entre os polimorfismos *GSTM1* nulo ( $p=0,726$ ;  $p^1=0,790$ ), *GSTT1* nulo ( $p=0,402$ ;  $p^1=0,271$ ) e *\_MI* nulo/*\_TI* nulo ( $p=0,266$ ;  $p^1=0,211$ ) com o estágio tumoral TNM (Tabela 9).

**Tabela 9** – Associação entre as variáveis clínicas e os polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *\_MI* nulo/*\_TI* nulo.

<i>GSTM1/GSTT1</i>	<i>PSA</i> <20 n (%)	<i>PSA</i> >20 n (%)	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p <sup>1</sup>
<i>GSTM1</i> normal	50 (80,6)	43 (74,1)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>GSTM1</i> nulo	12 (19,3)	15 (25,9)	0,6 (0,2-1,6)	0,395	0,9 (0,9-1,0)	0,911
<i>GSTT1</i> normal	43 (69,3)	37 (63,7)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>GSTT1</i> nulo	19 (30,6)	21 (36,3)	0,7 (0,3-1,6)	0,519	0,9 (0,9-1,0)	0,661
<i>_MI</i> normal/ <i>_TI</i> normal	33 (94,2)	26 (86,6)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>_MI</i> nulo/ <i>_TI</i> nulo	2 (5,7)	4 (13,3)	0,3 (0,1-2,3)	0,303	0,9 (0,9-1,0)	0,731
	<b>Gleason &lt; 8 n (%)</b>	<b>Gleason ≥ 8 n (%)</b>				
<i>GSTM1/GSTT1</i>						
<i>GSTM1</i> normal	69 (75)	44 (78,6)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>GSTM1</i> nulo	23 (25)	12 (21,4)	1,2 (0,5-2,7)	0,620	0,9 (0,9-1,0)	0,532
<i>GSTT1</i> normal	63 (68,4)	33 (58,9)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>GSTT1</i> nulo	29 (31,5)	23 (41,1)	0,6 (0,3-1,3)	0,239	0,9 (0,9-1,0)	0,327
<i>_MI</i> normal/ <i>_TI</i> normal	43 (84,3)	27 (93,1)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>_MI</i> nulo/ <i>_TI</i> nulo	8 (15,6)	2 (6,8)	0,5 (0,1-2,1)	0,419	0,9 (0,9-1,0)	0,597
	<b>TNM localizado n (%)</b>	<b>TNM (avanzado) n (%)</b>				
<i>GSTM1/GSTT1</i>						
<i>GSTM1</i> normal	69 (76,6)	43 (74,1)	1,00	1,00	1,00	1,00
<i>GSTM1</i> nulo	21 (23,3)	15 (25,9)	0,8 (0,4-1,8)	0,726	0,9 (0,9-1,0)	0,790



GSTT1normal	56 (62,2)	40 (68,9)	1,00	1,00	1,00	1,00
GSTT1nulo	34 (37,7)	18 (31,1)	1,3 (0,6-2,7)	0,402	1,0 (0,9-1,0)	0,271
_MInormal/_TInormal	43 (55,1)	27 (51,4)	1,00	1,00	1,00	1,00
_MInulo/_TInulo	8 (44,9)	2 (48,6)	2,5 (0,4-12,7)	0,266	1,0 (0,9-1,0)	0,211

<sup>1</sup>Ajustado por idade

Não houve associação significativa do modelo genético aditivo (*CC* vs. *CT*) de *MTHFR* C677T com o *PSA* ( $p=0,406$ ;  $p^1=0,372$ ), escore de Gleason ( $p=0,321$ ;  $p^1=0,370$ ) e estágio tumoral TNM ( $p=0,740$ ;  $p^1=0,432$ ). Também não houve associação significativa do modelo aditivo (*CC* vs. *TT*) com o *PSA* ( $p=0,840$ ;  $p^1=0,878$ ), escore de Gleason ( $p=0,292$ ;  $p^1=0,284$ ) e estágio tumoral TNM ( $p=0,636$ ;  $p^1=0,381$ ) (Tabela 10).

**Tabela 10** – Associação entre as variáveis clínicas e os modelos aditivos do polimorfismo *MTHFR* C677T.

<b>MTHFR C677T Modelos aditivos</b>	<b>PSA &lt; 20 n(%)</b>	<b>PSA ≥ 20 n(%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p<sup>1</sup></b>
CC	31 (47,6)	21 (45,6)	1,00	1,00	1,00	1,00
CT	31 (47,6)	21 (45,6)	0,5 (0,1 – 2,5)	0,406	1,0 (0,9 – 1,0)	0,372
TT	3 (4,6)	4 (8,6)	0,8 (0,1 – 4,1)	0,840	1,0 (0,9 – 1,0)	0,878
	<b>Gleason &lt; 8 n(%)</b>	<b>Gleason ≥ 8 n(%)</b>				
CC	49 (53,2)	32 (54,2)	1,00	1,00	1,00	1,00
CT	36 (39,1)	25 (42,8)	2,2 (0,4 – 11,7)	0,321	1,0 (0,9-1,0)	0,370
TT	7 (7,6)	2 (3,4)	0,5 (0,4 – 12,6)	0,292	1,0 (0,9-1,0)	0,284
	<b>TNM localizado n(%)</b>	<b>TNM avanzado n(%)</b>				
CC	50 (54,0)	32 (53,6)	1,00	1,00	1,00	1,00
CT	35 (40,5)	25 (42,8)	1,2 (0,2-5,4)	0,740	1,0 (0,9-1,0)	0,432
TT	6 (5,4)	3 (3,6)	0,6 (0,3-6,2)	0,636	1,0 (0,9-1,0)	0,381

<sup>1</sup>Ajustado por idade.

Não houve associação significativa do modelo dominante de *MTHFR* C677T com o PSA ( $p=0,234$ ;  $p^1=0,270$ ), escore de Gleason ( $p=0,907$ ;  $p^1=0,857$ ) e estágio tumoral TNM ( $p=0,687$ ;  $p^1=0,749$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11** – Associação entre as variáveis clínicas e o modelo dominante do polimorfismo *MTHFR* C677T.

<i>MTHFR</i> C677T Modelo dominante	PSA < 20 n(%)	PSA ≥ 20 n(%)	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p <sup>1</sup>
CC	31 (53,1)	21 (42,3)	1,00	1,00	1,00	1,00
CT+TT	30 (46,8)	34 (57,6)	0,6 (0,3 – 1,3)	0,234	0,9 (0,9-1,0)	0,270
	Gleason < 8 n(%)	Gleason ≥ 8 n(%)				
CC	49 (45,3)	32 (45,7)	1,00	1,00	1,00	1,00
CT+TT	43 (54,7)	27 (54,2)	0,9 (0,4-1,8)	0,907	1,0 (0,9-1,0)	0,857
	TNM localizado n(%)	TNM avançado n(%)				
CC	50 (55,0)	32 (53,4)	1,00	1,00	1,00	1,00
CT+TT	41 (45,0)	28 (46,6)	0,7 (0,1-3,1)	0,687	0,9 (0,9-1,0)	0,749

<sup>1</sup> Ajustado por idade.

Não houve associação significativa do modelo co-dominante de *MTHFR* C677T com o PSA ( $p=0,130$ ;  $p^1=0,178$ ), escore de Gleason ( $p=0,732$ ;  $p^1=0,574$ ) e estágio tumoral TNM ( $p=0,734$ ;  $p^1=0,727$ ) (Tabela 12).

**Tabela 12** – Associação entre as variáveis clínicas e o modelo co-dominante do polimorfismo *MTHFR* C677T.

<i>MTHFR</i> C677T Modelo co- dominante	PSA < 20 n(%)	PSA ≥ 20 n(%)	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p <sup>1</sup>
CT	31 (47,6)	21 (45,6)	1,00	1,00	1,00	1,00
CC+TT	34 (52,3)	25 (54,3)	0,5 (0,2-1,1)	0,130	0,9 (0,9-1,0)	0,178
	Gleason < 8 n(%)	Gleason ≥ 8 n(%)				

CT	36 (38,8)	25 (42,3)	1,00	1,00	1,00	1,00
CC+TT	55 (61,1)	34 (57,6)	1,1 (0,5-2,1)	0,732	1,0 (0,9-1,0)	0,574
	<b>TNM avançado n(%)</b>	<b>TNM localizado n(%)</b>				
CT	35 (38,8)	25 (41,6)	1,00	1,00	1,00	1,00
CC+TT	55 (61,1)	35 (59,4)	1,1 (0,5-2,2)	0,734	1,0 (0,9-1,0)	0,727

<sup>1</sup> Ajustado por idade.

Também não houve associação significativa do modelo recessivo de *MTHFR* C677T com o *PSA* ( $p=0,619$ ;  $p^1=0,757$ ), escore de Gleason ( $p=0,298$ ;  $p^1=0,390$ ) e estágio tumoral TNM ( $p=0,687$ ;  $p^1=0,749$ ) (Tabela 13).

**Tabela 13** – Associação entre as variáveis clínicas e o modelo recessivo do polimorfismo *MTHFR* C677T.

<b><i>MTHFR</i> C677T Modelo recessivo</b>	<b><i>PSA</i> &lt; 20 n(%)</b>	<b><i>PSA</i> ≥ 20 n(%)</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>p<sup>1</sup></b>
TT	3 (4,6)	4 (8,6)	1,00	1,00	1,00	1,00
CT+CC	61 (95,4)	55 (91,4)	1,4 (0,3 – 6,9)	0,619	1,0 (0,9 – 1,0)	0,757
<b>Modelo Recessivo</b>	<b>Gleason &lt; 8 n(%)</b>	<b>Gleason ≥ 8 n(%)</b>				
TT	7 (7,6)	2 (3,4)	1,00	1,00	1,00	1,00
CC+CT	85 (92,3)	57(96,6)	0,4 (0,1-2,1)	0,298	0,9 (0,9-1,0)	0,390
<b>Modelo recessivo</b>	<b>TNM localizado n(%)</b>	<b>TNM avançado n(%)</b>				
TT	6 (6,5)	3 (5,0)	1,00	1,00	1,00	1,00
CC+CT	85 (93,4)	57 (95,0)	0,7 (0,1-3,1)	0,687	0,9 (0,9-1,0)	0,749

<sup>1</sup> Ajustado por idade.

A análise das distribuições das frequências genotípicas dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e na combinação *\_M1* nulo/*\_T1* nulo do grupo controle comparadas com outras populações apontam não haver diferenças entre as frequências encontradas neste estudo com as de outras populações ( $p>0,05$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14** – Distribuição das frequências genotípicas dos polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo sozinhos e combinados comparadas com outras populações.

Pesquisa	População	Etnia	n	Frequências genotípicas				
				<i>GSTM1</i> nulo	<i>GSTT1</i> nulo	p	<i>M1</i> nulo/ <i>T1</i> nulo	p
Presente estudo	Piauí	Miscigenados	191	37,2	19,4	Ref.	8,8	Ref.
Gattás et al. (2004)	Bahia	Miscigenados	137	35,7	23,8	0,565	9,1	0,63
Gattás et al. (2004)	São Paulo	Caucasianos	233	55,4	22,3	0,570	9,9	0,627
Salem et al. (2011)	Bahranian	Caucasianos	167	49,7	28,7	0,718	14,4	0,618
Salem et al. (2011)	Líbano	Caucasianos	141	52,5	37,6	0,385	16,3	0,615
Salem et al. (2011)	Tunísia	Caucasianos	186	63,4	37,1	0,731	21	0,61
Sivonová et al. (2009)	Eslováquia	Caucasianos	228	57	19,7	0,331	NA	NA
Mansour et al. (2015)	Turabah	Caucasianos	164	56,1	20,7	0,440	11	0,624
Safarinejad et al. (2011)	Tehran	Asiáticos	336	28	20,8	0,425	12,5	0,622
Mallick et al. (2006)	Caribe	Africanos	134	26,8	36,5	0,016	NA	NA
Emeville et al. (2015)	Caribe	Africanos	622	31,7	30,9	0,098	7,2	0,638

NA – Não avaliado

A análise das distribuições das frequências alélicas do polimorfismo *MTHFR* C677T, no presente estudo, revela divergências entre as frequências alélicas observadas em miscigenados no México ( $p=0,001$ ), afro-americanos em Atlanta ( $p=0,027$ ) e asiáticos na China ( $p=0,003$ ) (Tabela 15).

**Tabela 15** – Distribuição das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo *MTHFR* C677T comparadas com outras populações.

Pesquisa	População	Etnia	n	Freq. Alélicas		
				C	T	P
Presente estudo	Piauí	Miscigenados	193	75,4	24,6	Ref.
Vieira et al. (2015)	Amazônia	Miscigenados	124	68	32	0,347
Ferreira et al. (2012)	Piauí	Miscigenados	200	75,7	24,3	0,871
Zanrosso et al. (2005)	Brasil	Miscigenados	249	71	29	0,633
wilcken et al. (2003)	México	Miscigenados	500	43	57	0,001*
wilcken et al. (2003)	Atlanta	afro-americanos	298	87,4	12,6	0,027*
Lopez-Cortez et al. (2013)	Equador	Caucasianos	110	73	27	0,872
Kobayashi et al. (2012)	Canadá	Caucasianos	334	68,8	31,9	0,348
Wu et al. (2016)	China	Asiáticos	2026	54,8	45,2	0,003*
Wu et al. (2010)	Taiwan	Asiáticos	436	70,9	29	0,633

## 6 DISCUSSÃO

O câncer de próstata representa o segundo mais comum no mundo, é a quinta causa de morte entre os homens, representando 6,6% da mortalidade total por câncer masculino (JUNE et al., 2015). Foram estimados cerca de um milhão de casos diagnosticados com esse câncer, dos quais 70% ocorrem em regiões mais desenvolvidas (Austrália, Nova Zelândia e América do Norte). Entretanto, a mortalidade é mais acentuada em regiões subdesenvolvidas, como Caribe (29/100 mil homens por ano), África (24/100 mil homens por ano), enquanto na Ásia é menos recorrente (2,9/100 mil homens por ano) (CENTER et al., 2012; FERLAY et al., 2015; BANERJEE; KAVIANI, 2016). Esse câncer tem uma complexa etiologia e heterogeneidade clínica. A idade, histórico familiar, dieta, consumo de bebidas alcoólicas e tabagismo são fatores de suscetibilidade que podem auxiliar no entendimento das formas de prevenção e detecção do câncer de próstata, entretanto, os resultados de pesquisas são conflitantes entre as diferentes etnias, devido aos diferentes estilos de vida entre as populações (KIMURA, 2012; BAENA; SALINAS, 2014; MANDAIR et al., 2014). Compreender a disposição dos polimorfismos em indivíduos com câncer de próstata de alto risco poderá ser uma ferramenta de auxílio ao tratamento e melhoria da qualidade de vida de pacientes (PERDANA et al., 2016; ATTARD et al., 2016).

Esta pesquisa engloba uma análise de 349 amostras, compreendendo 156 pacientes com câncer de próstata de alto risco e 193 indivíduos saudáveis. A média de idade desses pacientes foi avançada ( $67,8 \pm 7,5$  anos), semelhante a determinada em outras pesquisas que envolvem pacientes com esse mesmo quadro clínico (THOMPSON, M. D. et al., 2004; JUNE et al., 2015; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013). Portanto, é evidente a relação entre a idade avançada e o câncer de próstata de alto risco (SUPIT et al., 2013). O grupo controle foi constituído de idosos com idades próximas à média dos pacientes ( $68,3 \pm 6,6$ ), como um dos critérios de inclusão para esta pesquisa.

Este estudo demonstrou níveis séricos de *PSA* com grande variação (0,19-2.327 ng/mL) entre os pacientes, apresentando uma média de 62,9 ng/mL. Fatores como a etnia, idade e doenças que afetam a arquitetura e/ou o volume da próstata são conhecidas por influenciar os níveis séricos de *PSA* (SAVBLOM et al., 2009), o que demonstra a instabilidade e pouca confiabilidade da sua utilização como marcador tumoral (LILJA, 2003; GLINA, S.; VIEIRA, 2010; SONAWANE et al., 2016). Entretanto, o *PSA* ainda é o

biomarcador mais utilizado, devido a sua facilidade e baixo custo para o auxílio na detecção do câncer de próstata, apesar da sua baixa especificidade, como os resultados falso-positivos em pacientes com hiperplasia prostática benigna (FILELLA; FOJ, 2016; SONAWANE et al., 2016). Neste trabalho, houve diferença significativa dos níveis séricos de *PSA* entre os grupos caso e controle ( $p \leq 0,001$ ), fato já esperado, pois um dos critérios de inclusão de indivíduos do grupo controle foi a condição de possuir  $PSA \leq 2,5$  ng/mL.

O presente trabalho analisa a associação dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *MTHFR* C677T com a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata de alto risco em pacientes no estado do Piauí. Estudos de associação genética vêm buscando respostas para o melhor entendimento da etiologia de diferentes tipos de câncer em diferentes populações, com o intuito de identificar relações entre polimorfismos genéticos com o grau de agressividade para futuras aplicações no tratamento (COLLIN et al., 2009; KÜÇÜKHÜSEYİN et al., 2011; FARD-ESFAHANI et al., 2012; YANG et al., 2013; EMEVILLE et al., 2014; ALBENDIZADEH et al., 2015; HU et al., 2015; KRUGER et al., 2015; GUO et al., 2015).

Os genes *GSTM1* e *GSTT1* fazem parte da família de enzimas que metabolizam agentes quimioterápicos do câncer e subprodutos do estresse oxidativo, funções essas que podem ser comprometidas quando esses genes são deletados, tornando-os candidatos à suscetibilidade a diversas doenças como o câncer de próstata (HAYES; STRANGE, 2000). O polimorfismo *MTHFR* C677T afeta a atividade da enzima envolvida no metabolismo do folato, precursor do metabolismo celular, inclusive na metilação do *DNA*. A deficiência do folato tem relação com a ocorrência de vários cânceres, dentre eles, o câncer de próstata (IZMIRLI, 2013).

O presente estudo demonstrou efeito de proteção do polimorfismo *GSTM1* nulo contra o câncer de próstata de alto risco (OR=0,5, IC 95%=0,3-0,8,  $p=0,005$ ; O.R ajustado=0,9, IC 95%=0,9-1,0,  $p=0,019$ ). Este resultado poderia ser explicado por uma mudança nos padrões de expressão individuais da enzima GST envolvidos na biotransformação e na conversão de pró-carcinógenos em metabólitos genotóxicos (VAN BLADEREN, 2000). A deleção de *GSTM1* pode ser vantajosa para a célula, uma vez que a expressão alterada da proteína *GSTM1* pode prejudicar a terapia de tumores e influenciar no pior prognóstico do câncer (Figura 5) (DORION; LAMBERT; LANDRY, 2002; MCILWAIN; TOWNSEND; TEW, 2006). A reduzida atividade de conjugação de *GSTM1* com outros genes ou com o substrato

GSH pode evitar a depleção da atividade de GSH (Glutathione, L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystenilglycine), evitando danos oxidativos ao DNA e lesões mutagênicas associadas (PARL, 2005).

As GSTs têm sobreposição de especificidades de substrato, ou seja, a deficiência de uma isoenzima de GST individual pode ser compensada por outras isoformas (PARL, 2005). Dessa forma, esse efeito de proteção do polimorfismo *GSTM1* nulo também pode ser ocasionado por um efeito compensatório do gene *GSTM2* sobre a deleção de *GSTM1*, pois partilham 75%-99% de semelhança entre a identidade da sequência e padrão de expressão enzimática (BHATTACHARJEE et al., 2013b).

Até o presente, este é o primeiro relato que demonstra efeito de proteção de *GSTM1* nulo contra o câncer de próstata em populações miscigenadas. Um estudo de caso-controle conduzido em caucasianos na Europa demonstrou efeito de proteção de *GSTM1* nulo, no entanto, em interação com *GSTT1* nulo, contra a suscetibilidade ao câncer de próstata em indivíduos que ingeriam glucosinolatos presentes em vegetais diversos (OR=0,72; IC 95%=0,53-0,96; p=0,007) (STEINBRECHER et al., 2010). Houve resultados semelhantes aos resultados desta pesquisa, para outros tipos de câncer, como o de mama em mulheres caucasianas, esofageal e aerodigestivo em grupos de subpopulação na Índia, tireoide papilífero em Portugal e oral no Brasil (ROODI et al., 2004; HATAGIMA et al., 2008; LEMOS et al., 2008; SHARMA et al., 2013; BANSAL et al., 2015)

Com relação à suscetibilidade de *GSTM1* nulo com o câncer de próstata, estudos recentes expressam sua associação significativa com o câncer de próstata em asiáticos, europeus, americanos, caucasianos e grupos miscigenados no caribe (p<0,05), em contraste, essas pesquisas não mostram essa suscetibilidade em africanos (p>0,05) (WEI et al., 2012; EMEVILLE et al., 2014; WANG et al., 2015; MALIK et al., 2016)

Os resultados desta pesquisa demonstram associação significativa do polimorfismo *GSTT1* nulo com o câncer de próstata (OR=2,0; IC 95%=1,2-3,3; p=0,003; OR ajustado=1,0; IC 95%=0,9-1,0; p=0,001). Corroborando com esses resultados, estudos com indivíduos portadores do polimorfismo *GSTT1* nulo determinam chances duas vezes maiores de desenvolver o câncer de próstata na Tunísia (p=0,018), Índia (p<0,0001) e associação a suscetibilidade em caucasianos (p<0,05) e leste asiáticos (p=0,007) (SOUIDEN et al., 2010; YANG; DU; YAO, 2013; JUNE et al., 2015) . Em contraste, meta-análises não relatam associação significativa desse polimorfismo com o câncer de próstata em grupos étnicos na

Ásia, Europa e África ( $p > 0,05$ ) (WANG et al., 2013; YANG; DU; YAO, 2013; MALIK et al., 2015).

O presente estudo demonstrou que os polimorfismos *\_MI* nulo e *\_TI* nulo combinados não apresentaram valores significativos com relação a associação a suscetibilidade ao câncer de próstata de alto risco ( $p = 0,263$ ;  $p^1 = 0,333$ ). Corroborando com outras pesquisas que não expressam associação significativa entre a combinação desses polimorfismos com o câncer de próstata em vários estágios tumorais, tanto no Brasil (ALMEIDA DE SÁ et al., 2014), como em populações caucasianas, asiáticas, africanas e afro-americanas (TEIXEIRA, 2009; ASHTIANI; HASHEMINASAB; AYATI, 2011; GONG et al., 2012; CAI et al., 2014). Porém, meta-análises constataam associação dupla dos polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo tanto para o câncer de próstata ( $p \leq 0,001$ ), fígado ( $p \leq 0,001$ ) e mama ( $p = 0,045$ ) em indivíduos de diferentes etnias: caucasianos, africanos, asiáticos e afro-americanos ( $p \leq 0,001$ ) (WANG et al., 2010; GONG et al., 2012);.

O alelo *MTHFR* 677T tem recebido maior atenção pelo seu envolvimento com doenças frequentes em idosos, entre elas, o câncer de próstata (SRIVASTAVA; THUKRAL; HASIJA, 2015). Entretanto, os efeitos desse polimorfismo na suscetibilidade ao câncer não são uniformes, devido às disparidades na relação entre os efeitos do folato em diferentes tipos de câncer, considerando as diferentes sensibilidades e etiologia distinta (KÜÇÜKHÜSEYİN et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

O presente estudo não revela associação significativa entre os modelos aditivos (*CC vs. CT* e *CC vs. TT*), dominante (*CC vs. CT+TT*), co-dominante (*CT vs. CC+TT*) e recessivo (*TT vs. CC+CT*) de *MTHFR* C677T a suscetibilidade ao câncer de próstata de alto risco ( $p > 0,05$ ). Pesquisas em populações de caucasianos, asiáticos, africanos e miscigenadas corroboram com esses resultados (COLLIN et al., 2009; FARD-ESFAHANI et al., 2012; LI; XU, 2012; ZHANG et al., 2012; GUO et al., 2015). Todavia, meta-análises e estudos de caso-controle expressam associação significativa entre esses modelos genéticos ( $p < 0,001$ ) com a suscetibilidade ao câncer de próstata em vários estágios tumorais em populações na Ásia e caucasianos no Equador (ZHANG et al., 2012; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013).

Algumas pesquisas têm associado o modelo genético recessivo (*TT vs. CC+CT*) com o efeito de proteção contra a suscetibilidade ao câncer de próstata em população de Taiwan ( $p = 0,001$ ) (WU et al., 2010), caucasianos ( $p = 0,016$ ) (BAI et al., 2009) e em população de



turcos portadoras do genótipo *MTHFR* C677T ( $p=0,025$ ) e 677TT ( $p=0,023$ ) (KUCUKHUSEYIN et al., 2011).

Este trabalho analisou a associação dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo, *\_M1* nulo/*\_T1* nulo combinados e modelos genéticos aditivos, dominantes, co-dominantes e recessivos de *MTHFR* C677T com o prognóstico do câncer de próstata de alto risco, utilizando variáveis clínicas categorizadas de forma binária: *PSA* ( $<20$  ng/mL ou  $\geq 20$  ng/mL), escore de Gleason ( $<8$  ou  $\geq 8$ ) e estágio TNM (localizado ou avançado).

As análises desta pesquisa não apontaram associação significativa entre os polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *\_M1* nulo/*\_T1* nulo combinados e as variáveis clínicas preditoras do prognóstico do câncer de próstata de alto risco (*PSA*, escore de Gleason e TNM) ( $p>0,05$ ). Pesquisas corroboram com esses resultados em populações na Inglaterra e no Brasil (TRAKA et al., 2008; M. M. LIMA-JR, et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011).

Em contraste, estudos exibem associações desses polimorfismos, sozinhos e combinados, com tumor de alta agressividade em pacientes iranianos ( $p<0,05$ ) (SHAFIEI; SAFARINEJAD, 2011), e associação de *GSTM1* nulo com o aumento do nível sérico de *PSA* em pacientes caucasianos ( $p<0,05$ ) (AGALLIU et al., 2006). Estudo com afro-americanos portadores de *GSTM1* nulo e caucasianos portadores de *GSTT1* nulo apresentaram associação significativa com o câncer de próstata de alto risco em pacientes que sofreram prostatectomia radical e recidiva bioquímica, ou seja, elevação posterior do nível sérico de *PSA* (NOCK et al., 2009).

Nesta pesquisa também não houve associação significativa entre os modelos genéticos do polimorfismo *MTHFR* C677T com o prognóstico do câncer de próstata de alto risco ( $p>0,05$ ). Estudos com pacientes dessa neoplasia que apresentavam níveis séricos de *PSA* $>20$  no Iran, escore de Gleason $>7$  nos Estados Unidos e Canadá e estágio T3-T4 na Turquia, corroboram com esses resultados (SAFARINEJAD et al., 2010; KUÇUKHSEYIN et al 2011; ABEDINZADEH et al., 2015). Em contraste, uma pesquisa demonstrou associação do modelo genético dominante (*CC* vs. *CT+TT*) desse polimorfismo com o escore de Gleason  $>8$  ( $p=0,007$ ) em pacientes com câncer de próstata de alto risco no Equador (LÓPEZ-CORTÉS et al., 2013a).

De acordo com os dados levantados nesta pesquisa, não há estudos de associação do polimorfismo *MTHFR* C677T com a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata de alto risco em pacientes no Brasil. Porém, há pesquisas sobre esse polimorfismo com a suscetibilidade ao câncer de mama e efeito de proteção contra o câncer oral no Brasil ( $P < 0,05$ ) (BATSCHAUER et al., 2011; BARBOSA et al., 2012;; CARVALHO BARBOSA et al., 2012; BARBOSA et al., 2015).

As frequências dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *\_M1* nulo/*\_T1* nulo combinados, não expressaram divergências entre as observadas em caucasianos e miscigenados em regiões da Bahia e São Paulo no Brasil ( $p > 0,05$ ) (GATTÁS et al., 2004), assim como em caucasianos em regiões do Oriente (SALEM et al., 2011), Europa (SIVONOVÁ et al., 2009; MANSOUR et al., 2015), asiáticos no Tehran (SAFARINEJAD et al., 2011) e descendentes africanos no Caribe ( $p > 0,05$ ) (MALICK et al., 2006; EMEVILLE et al., 2015) (Tabela 6).

As frequências alélicas do polimorfismo *MTHFR* C677T neste trabalho não apresentaram divergências quando comparadas com as frequências observadas em grupos miscigenados no Brasil (FERREIRA-FERNANDES et al., 2012; VIEIRA et al., 2015; ZANROSSO et al., 2005), caucasianos no Equador (LOPÉZ-CORTÉS et al., 2013) e asiáticos em Taiwan ( $p > 0,05$ ) (WU et al., 2010). No entanto, houve diferenças significativas entre as observadas em populações miscigenadas no México ( $p = 0,001$ ), afro-americanos em Atlanta ( $p = 0,027$ ) e asiáticos na China ( $p = 0,003$ ) (Tabela 7) (WILCKEN et al., 2003; WU et al., 2016).

Muitos estudos investigam a associação dos polimorfismos com a suscetibilidade ao câncer de próstata em populações não miscigenadas, buscando compreender os mecanismos desse câncer para futuras aplicações clínicas (BAI et al., 2009; LI et al., 2012; HU et al., 2013; CAI et al., 2014). No entanto, pouco se conhece sobre essas associações em populações como a do Piauí, composto por uma população miscigenada, predominantemente de descendência europeia (60%), seguida de africanos (21,5%) e nativos americanos (18,5%) (LOPES et al., 2014). Dessa forma, é importante compreender a configuração dessa população, levando em consideração as frequências desses polimorfismos comparadas a outras populações no Brasil e no mundo, e suas possíveis associações a suscetibilidade e prognóstico do câncer de próstata.

Este estudo apresentou limitações, que devem ser consideradas na interpretação dos resultados, quanto a sua população, amostra e procedimentos de análise dos polimorfismos genéticos. A população definida para este estudo apresentou uniformidade quanto à disposição de informações relevantes para as análises de associação dos polimorfismos com o prognóstico do câncer de próstata de alto risco, no entanto, afim de elucidar o papel dessas variações em outros estágios tumorais, são necessárias pesquisas posteriores que investiguem essa associação com todos os graus de agressividade, de acordo com a estratificação tumoral de D` Amico et al. (2011). O tamanho amostral deste estudo permite considerar os resultados encontrados apenas para a população em questão, entretanto, pesquisas semelhantes, que incluem pacientes com câncer de próstata de alto risco, como as de Safarinejad et al. (2011), López Cortés et al. (2013) e Mandal et al. (2012), com 103, 104 e 98 amostras de pacientes com câncer de próstata de alto risco, respectivamente, apresentam um número amostral menor.

Ainda como limitação desta pesquisa, não fora realizada subestratificação étnica dos grupos caso e controle, no entanto, presume-se que a estratificação étnica realizada por Lopes et al. (2013) no Piauí, que revelam a descendência europeia (60%) predominante, seguida de africanos (21,5%) e nativos americanos (18,5%), seja referência para a população em estudo, pois trata-se da mesma população. Dessa forma, como essa população não apresenta, em sua maioria, composta por descendentes africanos, grupo étnico descrito em muitos estudos com maior suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de próstata, as chances da etnia influenciar nos resultados desta pesquisa são diminuídas (JEMAL et al., 2009; WADHERA, 2013; CRAWFORD et al., 2015; SINGH et al., 2017a; SINGH et al., 2017b). Além disso, alguns trabalhos levam em consideração a sobreposição dos fatores ambientais sobre a etnia na suscetibilidade ao câncer de próstata (CENTER et al., 2012; KIMURA, 2012; FERLAY et al., 2015). Quanto a análise dos polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo, não foi possível separar heterozigotos de homozigotos selvagens, devido à impossibilidade do protocolo de *PCR* utilizado no presente estudo.

Os dados desta pesquisa levantam importantes questões sobre os mecanismos envolvidos com o câncer de próstata em situações de deleções dos genes *GSTM1* e *GSTT1* e reduzida atividade enzimática ocasionada por *MTHFR C677T*. Porém, estudos posteriores nessa população podem investigar sobre a interação desses polimorfismos com outros genes e com o ambiente, como os trabalhos desenvolvidos por Traka et al. (2008). Steinbrecher et al.

(2010), Kobayashi et al. (2012) e Fang et al., (2013) que levam em consideração fatores associados a alimentação, uso abusivo do álcool e hábitos fumantes dos grupos envolvidos na pesquisa.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que aborda análises da associação dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *MTHFR* C677T com a suscetibilidade ao câncer de próstata de alto risco, revelando frequências mais elevadas do genótipo *GSTM1* nulo entre os indivíduos saudáveis quando comparado com o grupo de pacientes com câncer de próstata, e uma prevalência aumentada do genótipo *GSTT1* nulo no grupo desses pacientes. Com base nestes dados, confirma-se a correlação entre esses polimorfismos e o câncer de próstata de alto risco, uma vez que a deficiência do gene *GSTM1* tanto pode ser compensada por outro gene, como pode representar uma vantagem quando envolvida nos mecanismos de apoptose celular, expondo alternativas que podem justificar a frequência aumentada do polimorfismo nos grupos controles. Assim como, a suscetibilidade do polimorfismo *GSTT1* nulo com o câncer de próstata, relacionando-o com o comprometimento da função de enzimas envolvidas no metabolismo de agentes quimioterápicos do câncer e subprodutos do estresse oxidativo. Portanto, os resultados desta pesquisa demonstram:

- Efeito de proteção do polimorfismo *GSTM1* nulo contra o câncer de próstata de alto risco e associação significativa de *GSTT1* nulo com essa neoplasia. Porém, não houve associação significativa entre o polimorfismo *MTHFR* C677T com esse subtipo tumoral;
- Não expressa associação significativa entre os polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *MTHFR* C677T com o prognóstico do câncer de próstata de alto risco.
- As frequências dos polimorfismos *GSTM1* nulo, *GSTT1* nulo e *MTHFR* C677T não expressam divergências entre as demais populações do mundo, com exceção das populações miscigenadas no México, afro-americanos em Atlanta e caucasianos no Equador para o último polimorfismo citado;
- Os resultados sugerem que os polimorfismos *GSTM1* nulo e *GSTT1* nulo podem ser potenciais biomarcadores para o câncer de próstata de alto risco e poderão contribuir, futuramente, para o entendimento da progressão e/ou recorrência da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDINZADEH, M. et al. Association between MTHFR C677T Polymorphism and Risk of Prostate Cancer: Evidence from 22 Studies with 10,832 Cases and 11,993 Controls. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 11, p. 4525–4530, 26 jun. 2015.
- AGALLIU, I. et al. Polymorphisms in the Glutathione S-T and P 1 Genes and Prostate Cancer Prognosis. **The Prostate**, p.1535-1541, n. 66, Agosto. 2006.
- ALMEIDA DE SÁ, R. et al. Human glutathione S-transferase polymorphisms associated with prostate cancer in the Brazilian population. **Int Braz J Urol**, v. 40, n. 4, p. 463–73, 2014.
- ASHTIANI, Z. O.; HASHEMINASAB, S.; AYATI, M. Are GSTM1 , GSTT1 and CAG Repeat Length of Androgen Receptor Gene Polymorphisms Associated with Risk of Prostate Cancer in Iranian Patients. **Pathol. Oncol. Res.** v. 17. p. 269–275, 2011.
- ATTARD, G. et al. Prostate cancer. **The Lancet**, p. 70–82, 2015.
- BAENA RUIZ, R.; SALINAS HERNÁNDEZ, P. Diet and cancer: Risk factors and epidemiological evidence. **Maturitas**, v. 77, n. 3, p. 202–208, 2014.
- BAI, J. L. et al. MTHFR C677T polymorphism contributes to prostate cancer risk among Caucasians: A meta-analysis of 3511 cases and 2762 controls. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 8, p. 1443–1449, 2009.
- BALASUBRAMANIAN, S. P. et al. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. **EJSO**, v. 30, p. 593–601, 2004.
- BAMBURY, R. M.; GALLAGHER, D. J. Prostate cancer: Germline prediction for a commonly variable malignancy. **BJU International**, v. 110, n. 11 C, 2012.
- BANERJEE, S.; KAVIANI, A. Worldwide Prostate Cancer Epidemiology : Differences Between Regions, Races, and Awareness Programs. **International Journal of Clinical and Experimental Medical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2016.
- BANSAL, V. K. et al. Prospective Case-Control Study to Evaluate the Role of Glutathione S Transferases (GSTT1 and GSTM1) Gene Deletion in Breast Carcinoma and Its Prognostic Significance. **The Indian journal of surgery**, v. 77, n. Suppl 3, p. 1067–72, 2015.
- BARBIERI, C. E.; DEMICHELIS, F.; RUBIN, M. A. Molecular genetics of prostate cancer: Emerging appreciation of genetic complexity. **Histopathology**, v. 60, n. 1, p. 187–198, 2012.
- BARBOSA, A. et al. Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and

cystathionine beta-synthase in oral cancer – a case–control study in southeastern Brazilians. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, n. xx, p. 9, dez. 2015.

BARBOSA, R. D. C. C. et al. Interaction of MTHFR C677T and A1298C, and MTR A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in Northeast Brazil. **Anticancer Research**, v. 32, n. 11, p. 4805–4812, 2012.

BARRY, M. J. PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN TESTING FOR EARLY DIAGNOSIS OF PROSTATE CANCER. **Clinical Practice**, v. 344, n. 18, p. 1373–1377, 2001.

BATSCHAUER, A. P. et al. HFE, MTHFR, and FGFR4 genes polymorphisms and breast cancer in Brazilian women. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 357, n. 1–2, p. 247–253, 2011.

BHATTACHARJEE, P. et al. Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2. **Scientific reports**, v. 3, 2013.

BRASIL. Estimativa Incidência de câncer no Brasil. **Estimativa | 2014 Incidência de Câncer no Brasil**, v. 1, n. 1, 2014, 124 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **ESTIMATIVA 2016 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015, 122p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Programa nacional de controle do câncer da próstata: documento de consenso**. Rio de Janeiro: INCA, 2002, 24p.

BRAY, F. et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1133–1145, 2013.

CAI, Q. et al. Association between glutathione S-transferases M1 and T1 gene polymorphisms and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **Tumor Biol.** p. 247–256, 2014.

CARVALHO BARBOSA RDE, C. et al. Associations of polymorphisms of folate cycle enzymes and risk of breast cancer in a Brazilian population are age dependent. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 4, p. 4899–4907, 2012.

CENTER, M. M. et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. **European Urology**, v. 61, n. 6, p. 1079–1092, 2012.

COLLIN, S. M. et al. Association of Folate-Pathway Gene Polymorphisms with the Risk of Prostate Cancer: a Population-Based Nested Case-Control Study, Systematic Review, and Meta-analysis. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 9, p. 2528–2539, 2009.

- CORDELL, H. J.; CLAYTON, D. G. Genetic association studies. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1121–1131, 2005.
- CRAWFORD, E. D. et al. Treating Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer: A Comprehensive Review of Available Therapies. **The Journal of urology**, v. 194, n. 6, p. 1537–47, 2015.
- D' AMICO, A. V et al. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 280, n. 11, p. 969–974, 1998.
- D' AMICO, A. V. D.; PH, D. Risk-Based Management of Prostate Cancer. **The New England Journal of Medicine**. 14 julho, p. 169–171, 2011.
- DHANASEKARAN, S. M. et al. Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. **Nature**, v. 412, n. 6849, p. 822–826, 2001.
- DORION, S.; LAMBERT, H.; LANDRY, J. Activation of the p38 Signaling Pathway by Heat Shock Involves the Dissociation of Glutathione S -Transferase Mu from Ask1. **The Journal Of Biological Chemistry**. v. 277, n. 34, p. 30792–30797, 2002.
- EMEVILLE, E. et al. Copy number variation of GSTT1 and GSTM1 and the risk of prostate cancer in a Caribbean population of African descent. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, 2014.
- ROBBINS, Stanley L.; COTRAN, R. S. Pathologic Basis of Disease. 8<sup>a</sup> ed: **Elsevier Editora LTDA**. v. 53, 2010.
- FANG, J. et al. Association of the glutathione S-transferase M1, T1 polymorphisms with cancer: Evidence from a meta-analysis. **PlosOne**, v. 8, n. 11, 2013.
- FARD-ESFAHANI, P. et al. Analysis of relation between C677T genotype in MTHFR gene and prostatic cancer in Iranian males. **Acta Medica Iranica**, v. 50, n. 10, p. 657–663, 2012.
- FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893–2917, 2010.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.
- FERREIRA-FERNANDES, H ; FERNANDES, H. F. ; ARAUJO-NETO, A. P. ; COSTA, P. N. ; YOSHIOKA, F. K. N. ; PINTO, G. R. Prevalência Do Polimorfismo C677T Do Gene MTHFR Em Uma População De Idosos Da Cidade De Parnaíba, Piauí. **Revista Paraense de Medicina**, v. 26, 2012.
- FILELLA, X.; FOJ, L. Prostate Cancer Detection and Prognosis : From Prostate Specific



Antigen ( PSA ) to Exosomal Biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**.v 1, n. 17, 2016.

FLESHNER, N. E.; LAWRENTSCHUK, N. Risk of Developing Prostate Cancer in the Future : Overview of Prognostic Biomarkers. **URL**, v. 73, n. 5, p. S21–S27, 2009.

FROSST, P. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nature genetics**, v. 10, n. 1, p. 111–3, 1995.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, v.23, n. 4, p. 149-169, 2006.

GLINA, S.; VIEIRA, M. Aspectos Básicos do Espermograma. **Manual de Urologia**, São Paulo: PlanMark, p. 29-38, 2010.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION et al. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA oncology**, v. 1, n. 4, p. 505–27, 2015.

GONG, M. et al. Genetic Polymorphisms of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 with Prostate Cancer Risk: A Meta-Analysis of 57 Studies. **PlosOne**, v. 7, n. 11, p. 1–12, 2012.

GOYETTE, P. et al. Human methylenetetrahydrofolate reductasa: isolation of cDNA, mapping and mutation identificación. **Nat Genet.**, v. 7, n. jun, p. 195–200, 1994.

GUO, S. et al. The protective effect of methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism against prostate cancer risk: Evidence from 23 case-control studies. **Gene**, v. 565, n. 1, p. 90–95, 2015a.

HATAGIMA, A. et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and oral cancer: A casecontrol study in Rio de Janeiro, Brazil. **Oral Oncology**, v. 44, n. 2, p. 200–207, 2008.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 51–88, 2004.

HAYES, J. D.; STRANGE, R. C. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. **Pharmacology**, v. 61, p. 154–166, 2000.

HUMPHREY, P. A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Modern Pathology**, v. 17, n. 3, p. 292–306, 2004.

INTERNATIONAL, T. et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1 and T1 and prostate cancer risk in a Tunisian population. **Cancer Epidemiology**, v. 34, n. 5, p. 598–603, 2010.

IZMIRLI, M. A literature review of MTHFR (C677T and A1298C polymorphisms) and cancer risk. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 1, p. 625–637, 2013.

- JAMIL, K. Clinical Implications of MTHFR Gene Polymorphism in Various Diseases. **Biol Med J**, v.6, p. 101–103, 2014.
- JUNE, M. et al. GSTM1 , GSTT1 and GSTP1 Genetic Variants in Multiple Urologic Cancers. **Chirurgia**, v. 110, n. 3, p. 254–261, 2015.
- KIMURA, T. East meets west: Ethnic differences in prostate cancer epidemiology between East Asians and Caucasians. **Chinese Journal of Cancer**, v. 31, n. 9, p. 421–429, 2012.
- KOBAYASHI, L. C. Folate intake, alcohol consumption, and the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T gene polymorphism: influence on prostate cancer risk and interactions. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. August, p. 100, 2012.
- KRUGER, M. et al. The impact of GSTM1/GSTT1 polymorphism for the risk of oral cancer. **Clinical Oral Investigations**, v. 19, n. 8, p. 1791–1797, 2015.
- KÜÇÜKHÜSEYİN, Ö. et al. Effects of the MTHFR C677T polymorphism on prostate specific antigen and prostate cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 12, p. 2275–8, 2011.
- LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: A review. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 463, n. 3, p. 247–283, 2000.
- LEMOS, M. C. et al. Combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes are associated with a lower risk of papillary thyroid cancer. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 31, n. 6, p. 542–545, 2008.
- LEWIS, C. M.; KNIGHT, J. Introduction to genetic association studies. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 7, n. 3, p. 297–306, 2012.
- LI, X.-L.; XU, J.-H. MTHFR polymorphism and the risk of prostate cancer: a meta-analysis of case-control studies. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 15, n. 3, p. 244–9, 2012.
- LILJA, H. Biology of prostate-specific antigen. **Urology**, v. 62, n. 5 SUPPL. 1, p. 27–33, 2003.
- LOHMUELLER, K. E. et al. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. **Nature genetics**, v. 33, n. 2, p. 177–182, 2003.
- LOPES, T. R. et al. Population data of the 46 insertion-deletion (INDEL) loci in population in Piau State, Northeastern Brazil. **Forensic Science International: Genetics**, v. 9, n. 1, p. 9–11, 2014.
- LÓPEZ-CORTÉS, A. et al. Genetic Polymorphisms in MTHFR (C677T, A1298C), MTR

(A2756G) and MTRR (A66G) Genes Associated With Pathological Characteristics of Prostate Cancer in the Ecuadorian Population. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 346, n. 6, p. 447–454, 2013a.

M. M. LIMA-JR, et al. Lack of Association of GSTT1, GSTM1, GSTO1, GSTP1 AND CYP1A1 Polymorphisms for Susceptibility and Outcome in Brazilian Prostate Cancer Patients. **Folia Biologica (Praha)**, n. 54, p. 102-108, 2008.

MALIK, S. S. et al. Case report : prostate cancer and glutathione s-transferase deletions. **EXCLI Journal**, n. 14, p. 1049–1054, 2015.

MALIK, S. S. et al. Genetic Polymorphism of GSTM1 and GSTT1 and Risk of Prostatic Carcinoma a Meta-analysis of 7, 281 Prostate Cancer Cases and 9,082 Healthy Controls. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 2629–2635, 2016.

MANDAIR, D. et al. Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review. **Nutrition & Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 30, 2014.

MANSOUR, A. A. et al. Frequency of glutathione- S -transferase null-M1 and null-T1 genotypes among the Turabah population in Saudi Arabia. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p.16863–16871, 2015.

MCILWAIN, C. C.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Glutathione S-transferase polymorphisms: cancer incidence and therapy. **Oncogene**, v. 25, n. 11, p. 1639–1648, 2006.

NEBERT, D. W.; VASILIOU, V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. **Human genomics**, v. 1, n. 6, p. 460–464, 2004.

NOCK, N. L. et al. Polymorphisms in glutathione S -transferase genes increase risk of prostate cancer biochemical recurrence differentially by ethnicity and disease severity. **Cancer Causes Control**, v.20, p. 1915–1926, 2009.

PARL, F. F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Letters**, v.221, n.2, p.123-129, 2005.

PARTIN, A. W. et al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. **The Journal of urology**, v. 150, n. 1, p. 110–114, 1993.

PIERORAZIO, P. M. et al. Prognostic Gleason grade grouping: Data based on the modified Gleason scoring system. **BJU International**, v. 111, n. 5, p. 753–760, 2013.

RODRIGUES, I. S. et al. Evaluation of the influence of polymorphic variants CYP1A1 \* 2B , CYP1B1 \* 2 , CYP3A4 \* 1B , GSTM1 \* 0 , and GSTT1 \* 0 in prostate cancer. **URO**, v. 29, n. 6, p. 654–663, 2011.

- ROODI, N. et al. Association of Homozygous Wild-Type Glutathione S-Transferase M1 Genotype with Increased Breast Cancer Risk. **Cancer Research**, v. 64, n. 4, p. 1233–1236, 2004.
- SALEM, A. et al. Genetic polymorphism of the glutathione S-transferase M1 and T1 genes in three distinct Arab populations. **Disease Markers**. v. 31, p. 311–316, 2011.
- SAVAS, S.; LIU, G.; XU, W. Special considerations in prognostic research in cancer involving genetic polymorphisms. **BMC medicine**, v. 11, n. 1, p. 149, 2013.
- SAVBLOM, C. et al. Association between polymorphisms in the prostate-specific antigen (PSA) promoter and release of PSA. **International Journal of Andrology**, v. 32, n. 5, p. 479–485, 2009.
- SCHULZ, W. A.; HATINA, J. Epigenetics of prostate cancer: Beyond DNA methylation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 1, p. 100-125, 2006.
- SCHWAHN, B.; ROZEN, R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. **Am J Pharmacogenomics**, v. 1, n. 3, p. 189–201, 2001.
- SHAFIEI, N.; SAFARINEJAD, S. H. Glutathione S-transferase gene polymorphisms ( GSTM1 , GSTT1 , GSTP1 ) and prostate cancer : a case-control study in Tehran , Iran. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 14, n. 2, p. 105–113, 2011.
- SHARMA, A. et al. GSTM1 and GSTT1 polymorphism and susceptibility to esophageal cancer in high- and low-risk regions of India. **Tumor Biology**, v. 34, n. 5, p. 3249–3257, 2013.
- SINGH, S. K. et al. Molecular basis for prostate cancer racial disparities. **Front Biosci (Landmark Ed.)**, v. 1, n. 22, 428-450, 2017a.
- SINGH, S. K. et al. Racial disparities: disruptive genes in prostate carcinogenesis. **Front Biosci (Schol Ed.)**, v.1, 244-253, 2017b.
- SIVONOVÁ, M. et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase M1, T1, P1 and the risk of prostate cancer: a case-control study. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 28, p. 32, 2009.
- SONAWANE, M. D. et al. Detection, quantification, and profiling of PSA: current microarray technologies and future directions. **RSC Adv.**, v. 6, n. 9, p. 7599–7609, 2016.
- SRIVASTAVA, I.; THUKRAL, N.; HASIJA, Y. GENETICS OF HUMAN AGE RELATED DISORDERS. Genetic of human age related disorders. **Advances in gerontology = Uspekhi gerontologii / Rossiiskaiā akademii a nauk, Gerontologicheskoe obshchestvo**, v. 28, n. 2, p. 228–47, 2015.

- STEINBRECHER, A. et al. Dietary Glucosinolate Intake, Polymorphisms in Selected Biotransformation Enzymes, and Risk of Prostate Cancer. **AACRJournal**, n. 8, p. 135–144, 2010.
- STRANGE, R. C. et al. Glutathione-S-transferase family of enzymes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 482, n. 1–2, p. 21–26, 2001.
- SUPIT, W. et al. Outcomes and predictors of localized or locally-advanced prostate cancer treated by radiotherapy in Indonesia. **Prostate International**, v. 1, n.1, p. 16–22, 2013.
- TAYLOR, B. S. et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. **Cancer Cell**, v. 18, n. 1, p. 11–22, 2010.
- TEIXEIRA, R. L. D. F. **Influência da variabilidade genética humana dos genes NAT2, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 na ocorrência de reações adversas hepáticas induzidas pela isoniazida em pacientes com tuberculose ativa.** Tese (Doutorado em Biologia Molecular e Celular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 29 de Abril de 2009, 106p.
- THOMPSON, M. D. ET AL. New England Journal. **Clinical Trials**, v. 350, p. 5–14, 2004.
- TRAKA, M. et al. Broccoli Consumption Interacts with GSTM1 to Perturb Oncogenic Signalling Pathways in the Prostate. **PlosOne**, v. 3, n. 7, 2008.
- VAN BLADEREN, P. J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. **ChemicoBiological Interactions**, v. 129, n. 1–2, p. 61–76, 2000.
- VIEIRA, P. C. M. et al. Population stratification effect on cancer susceptibility in an admixed population from Brazilian Amazon. **Anticancer Research**, v. 35, n. 4, p. 2009–2014, 2015.
- VISAKORPI, T. The molecular genetics of prostate cancer. **Urology**, v. 62, n. 5 SUPPL. 1, p. 3–10, 2003.
- WADHERA, P. An introduction to acinar pressures in BPH and prostate cancer. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 6, p. 358–366, 2013.
- WANG, B. et al. Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to hepatocellular carcinoma risk: Evidence from an updated meta-analysis. **Journal of Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 508–518, 2010.
- WANG, J. et al. Association of GSTT1 gene polymorphisms with the risk of prostate cancer : an updating meta-analysis. **Tumor Biol**, v.34, p. 1431–1440, 2013.
- WANG, Z.-Y. et al. GSTM1 Gene Polymorphism is Implicated in Increased Susceptibility to Prostate Cancer in Caucasians and Asians. **Technology in Cancer Research & Treatment**, 2015.

WEI, B. et al. Association of GSTM1 Null Allele with Prostate Cancer Risk: Evidence from 36 Case-Control Studies. **PlosOne**, v. 7, n. 10, 2012.

WILCKEN, B. et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. **Journal of medical genetics**, v. 40, n. 8, p. 619–25, 2003.

WU, H.-C. et al. Significant association of methylenetetrahydrofolate reductase single nucleotide polymorphisms with prostate cancer susceptibility in taiwan. **Anticancer research**, v. 30, p. 3573–3577, 2010.

WU, J.-L. et al. MTHFR C677C>T Inhibits Cell Proliferation and Decreases Prostate Cancer Susceptibility in the Han Chinese Population in Shanghai. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36290, 2016.

XIAO, Q. et al. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms predict treatment outcome for acute myeloid leukemia: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Hematology**, v. 93, n. 8, p. 1381–1390, 2014.

XIE, S.-Z. et al. Association between the MTHFR C677T polymorphism and risk of cancer: evidence from 446 case–control studies. **Tumor Biology**, p. 8953–8972, 2015.

XU, J.; SUN, J.; ZHENG, S. L. Prostate cancer risk-associated genetic markers and their potential clinical utility. **Asian journal of andrology**, v. 15, n. 3, p. 314–22, 2013.

YAN, S. et al. Glutathione S-transferase M1 null genotype related to poor prognosis of colorectal cancer. **Tumor Biology**, p. 10229–10234, 2016.

YANG, Q.; DU, J.; YAO, X. Significant Association of Glutathione S-Transferase T1 Null Genotype with Prostate Cancer Risk: A Meta-Analysis of 26,393 Subjects. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

ZANROSSO, C. W. et al. Influência da metileno-tetrahidrofolato redutase na patogênese das leucemias agudas infantis. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 289–295, 2005.

ZHANG, W. B. et al. The MTHFR C677T polymorphism and prostate cancer risk: New findings from a meta-analysis of 7306 cases and 8062 controls. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 6, p. 2597–2604, 2012.