

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Análise da presença de mutações no gene que codifica o receptor de androgênios
em tumores de próstata

Luiza Mezzomo Donatti

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre

2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Análise da presença de mutações no gene que codifica o receptor de androgênios
em tumores de próstata

Dissertação de Mestrado apresentada ao PPG
Ciências Biológicas: Fisiologia como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas: Fisiologia

Luiza Mezzomo Donatti

Orientadora: Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Mezzomo Donatti, Luiza

Análise da presença de mutações no gene que codifica o receptor de androgênios em tumores de próstata / Luiza Mezzomo Donatti. -- 2019.

87 f.

Orientador: Ilma Simoni Brum da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Câncer de próstata. 2. Hiperplasia prostática benigna. 3. Receptor de androgênio. 4. Mutação. 5. Rio Grande do Sul. I. Simoni Brum da Silva, Ilma, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus e ao meu Anjo da Guarda por, dia após dia, me abençoarem, iluminarem e permitirem que esse mestrado fosse concluído. Agradeço, também, por colocarem tantas pessoas especiais em minha vida, a quem eu devo minha eterna gratidão e carinho.

Agradeço imensamente aos meus pais, Cleci e Sonia, por confiarem em mim mais do que eu mesma, por sempre me incentivarem a buscar o conhecimento e, principalmente, por me ensinarem, de maneira prática e amorosa, os conceitos de caráter, ética, integridade, respeito, responsabilidade e dedicação. Aos meus irmãos, Vitor e Laura, não tenho palavras para agradecer o companheirismo e irmandade que só aumentam. A vocês quatro, agradeço a família que somos! Amo vocês!

Aos meus dindos, Evandro e Edimara, por tornarem tudo tão mais fácil. Sou muito feliz por poder contar com vocês, e com a companhia, o carinho, o cuidado e as comidinhas, em mais essa etapa da minha vida. Sou grata, também, à minha vó There por sempre se preocupar, na sua maneira, comigo e com meus estudos. Além de grata, sou feliz por ela poder presenciar mais essa conquista minha. Aos demais integrantes da família, tios e primos, agradeço a torcida, mesmo que à distância, e o carinho de sempre.

Ao meu namorado, Thobias, não existem palavras suficientes para agradecer. Ele, que sempre me apoiou, incentivou, foi paciente, compreendeu os momentos de ausência e torceu pelas conquistas, merece meu muito obrigada! Sou feliz e realizada por dividir minha vida com uma pessoa tão leve e tão boa quanto tu és. Te amo!

Àquelas pessoas que dão mais brilho à vida: os amigos. Listar todos seria inviável, então, em nome de Bruna M., Vanessa P. e Carolina A., agradeço a todos meus amigos (de Casca, Marau e Porto Alegre) por existirem na minha vida, compartilharem comigo bons momentos, boas risadas e, principalmente, por servirem de apoio quando necessário. Cada um tem um espaço muito especial em mim.

Não poderia deixar de agradecer toda equipe do LAB-FIV da Nilo Frantz Medicina Reprodutiva, Gerta, Norma, Caroline, Marcos Iuri, Carolina e Bárbara, pelo apoio e compreensão durante esses dois anos de mestrado.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Professora Ilma, por ter me

recebido de braços abertos e oferecido uma oportunidade tão grandiosa quanto esta. Foi um prazer trabalhar, aprender e crescer com uma Professora tão espetacular durante o mestrado. Agradeço a chance de integrar a equipe do LaBiMET e poder fazer amigos que levarei para sempre. Agradeço à Gabriela Pasqualim por toda ajuda dispensada, à Virgínia e ao Gabriel pela parceria, pelas ajudas e pela amizade criada. Aos demais integrantes do LaBiMET, agradeço por deixarem o laboratório um lugar bom e acolhedor de trabalhar.

Por fim, ao PPG Ciências Biológicas: Fisiologia da UFRGS, à CAPES, ao CNPq, à FAPERGS, ao FIPE e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo financiamento e disponibilização de estrutura física para realização do estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADT: terapia de privação androgênica

AR: receptor de androgênio

ARE: elemento responsivo a androgênio

CaP: câncer de próstata

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CRPC: câncer de próstata resistente à castração

DBD: domínio de ligação ao DNA

DHEA: desidroepiandrosterona

DHT: diidrotestosterona

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleotídeos

DST: doença sexualmente transmissível

FAPERGS: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

FIPE: Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos

gDNA: DNA genômico

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: hematoxilina e eosina

HPB: hiperplasia prostática benigna

HR: região de dobradiça

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

kDa: quilo-Dalton

LaBiMET: Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral

LBD: domínio de ligação ao ligante

LNCaP: Lymph Node Carcinoma of the Prostate

LUTS: sintomas do trato urinário inferior

NTD: domínio N-terminal

PEG: polietilenoglicol

PSA: antígeno prostático específico

qPCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real

RS: Rio Grande do Sul

RTU: ressecção transuretral

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

SUS: sistema único de saúde

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TP: tecido prostático

UAMP: unidade de análises moleculares e de proteínas

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Anatomia da próstata com representação das diferentes zonas. Retirado e adaptado de HAMMERICH; AYALA; WHEELER, 2009. | 17 |
| Figura 2. Padrões histológicos do adenocarcinoma de próstata. Grau 1 a 5, da esquerda para direita. Retirado e adaptado de HUMPHREY, 2017..... | 21 |
| Figura 3. Gene do receptor de androgênio (AR) com representação dos oito éxons codificantes e dos diferentes domínios funcionais. Retirado e adaptado de LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016. | 23 |
| Figura 4. Representação do mecanismo de ação dos androgênios em células prostáticas. Retirado e adaptados de (HILLEBRAND, 2018). | 24 |
| Figura 5. Estrutura proteica do AR-Q784* e sequenciamento indicando a mutação c.2350C>T. Retirado e adaptado de HAN <i>et al.</i> , 2017. | 27 |
| Figura 6. Fluxograma das amostras utilizadas para compor o grupo HPB e CaP do estudo. | 37 |
| Figura 7. Correlação entre escore de Gleason e presença de doença extra e intraprostática. Teste exato de Fisher ($p<0,0001$)..... | 41 |
| Figura 8. Genotipagem para LNCaP. Amostras em triplicata. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado. | 42 |
| Figura 9. Genotipagem para C4-2B. Amostras em duplicata. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado. | 43 |
| Figura 10. Sequenciamento pelo método de Sanger da linhagem celular LNCaP. Mutação na base 132 caracterizando a forma mutada AR-T878A..... | 44 |
| Figura 11. Sequenciamento pelo método de Sanger da linhagem celular C4-2B. Mutação na base 129 caracterizando a forma mutada AR-T878A..... | 45 |
| Figura 12. Genotipagem da amostra TP907 para mutação AR-T878A. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado. | 46 |
| Figura 13. Genotipagem do Heterozigoto-LNCaP construído a partir de gDNA da linhagem celular LNCaP e da amostra TP907. | 47 |
| Figura 14. Sequenciamento pelo método de Sanger do Heterozigoto-LNCaP construído a partir de gDNA da linhagem celular LNCaP e da amostra TP907. Presença de dois picos fluorescentes na base 112 indicam heterozigose da amostra. | 47 |
| Figura 15. Genotipagem do Heterozigoto-C4-2B construído a partir de gDNA da linhagem celular C4-2B e da amostra TP907..... | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Sequenciamento pelo método de Sanger do Heterozigoto-C4-2B construído a partir de gDNA da linhagem celular C4-2B e da amostra TP907. Presença de dois picos fluorescentes na base 117 indicam heterozigose da amostra. | 48 |
| Figura 17. Representação esquemática dos grupos amostrais avaliados no estudo para a genotipagem das mutações AR-T878A e AR-Q784*. | 50 |
| Figura 18. Genotipagem da amostra S1204 para mutação AR-T878A. Amostras em duplicata. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado. | 51 |
| Figura 19. Genotipagem da amostra S1204 para mutação AR-Q784*. Amostras em duplicata. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado. | 52 |
| Figura 20. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra S1204 para mutação AR-T878A. Presença de adenina na base 132 caracterizando a forma normal de AR-T878A..... | 52 |
| Figura 21. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra S1204 para mutação AR-Q784*. Presença de citosina na base 451 caracterizando a forma normal de AR-Q784*..... | 52 |
| Figura 22. Gráfico de discriminação alélica. Pontos azuis= genótipo mutado; pontos vermelhos= genótipo normal; pontos verdes= genótipos heterozigotos..... | 53 |
| Figura 23. Gráfico de distribuição alélica resultante da genotipagem para a mutação AR-T878A de 61 amostras. Pontos vermelhos= genótipo normal; pontos verdes= genótipo heterozigoto; pontos azuis= genótipo mutado. | 54 |
| Figura 24. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra TP920 para mutação AR-T878A. Presença de adenina na base 116 caracterizando a forma normal de AR-T878A..... | 55 |
| Figura 25. Gráfico de distribuição alélica resultante da genotipagem para a mutação AR-Q784* de 80 amostras. Pontos vermelhos= genótipo normal; pontos verdes= genótipo heterozigoto; pontos azuis= genótipo mutado. | 56 |
| Figura 26. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra TP755 para mutação AR-Q784*. Presença de citosina na base 450 caracterizando a forma normal de AR-Q784*..... | 57 |
| Figura 27. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra S1212 para mutação AR-Q784*. Presença de citosina na base 443 caracterizando a forma normal de AR-Q784*..... | 57 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Características dos pacientes. | 38 |
| Tabela 2. Caracterização do grupo CaP quanto ao escore de Gleason e invasão tumoral regional e metastática. | 39 |
| Tabela 3. Distribuição entre escore de Gleason e presença de doença extra e intraprostática. | 40 |

RESUMO

As doenças da próstata atingem cerca de 80% dos homens com idade superior a 50 anos, sendo que as duas formas mais comuns são a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP), ambas resultantes da proliferação celular anormal. O CaP é o segundo tipo de câncer mais incidente no Brasil, tendo o Rio Grande do Sul (RS) como o estado com a maior prevalência. É sabido que os androgênios possuem um papel crucial na glândula prostática e que suas ações são mediadas pelo receptor celular denominado receptor de androgênios (AR), um receptor nuclear que age como fator de transcrição dependente de ligante. Sendo assim, alterações no AR podem estar relacionadas com o desenvolvimento da HPB e do CaP. Visto que o crescimento de células do CaP é dependente da ação dos androgênios, a privação hormonal é a principal terapia utilizada, porém, alguns homens desenvolvem resistência e o tumor continua progredindo. Mutações do AR têm sido apontadas como fatores de resistência à terapia antiandrogênica e recidiva bioquímica em tumores avançados, mas, pouco se sabe de seu papel no tumor primário. Duas importantes mutações relacionadas à resistência terapêutica já foram descritas: NG_009014.2(AR_v001):c.2632A>G (AR-T878A) e NG_009014.2(AR_v001):c.2350C>T (AR-Q784*), porém outros fatores genéticos e ambientais também podem estar associados ao desfecho clínico desses pacientes. Objetivo: Descrever a frequência das mutações AR-T878A e AR-Q784* em uma amostra de pacientes do estado do Rio Grande do Sul e avaliar possível associação ao desenvolvimento, agressividade tumoral e recidiva bioquímica. Métodos: 237 pacientes atendidos no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e encaminhados à cirurgia por alteração prostática foram incluídos neste estudo. Foram coletados dados clínicos, além de amostras de sangue e de tecido prostático, durante o transoperatório, para extração de DNA genômico e análises moleculares. A genotipagem das mutações estudadas foi feita por PCR em tempo real (qPCR), utilizando sondas fluorescentes específicas, e o sequenciamento pelo método de Sanger. Resultados: A idade ao diagnóstico de HPB ou CaP não diferiu significativamente e ambos grupos foram homogêneos em relação à cor ou raça dos participantes. O nível de PSA sérico foi maior no grupo CaP (n=119) comparado ao grupo HPB (n=118) e a maioria dos pacientes com CaP apresentou tumor com escore de Gleason igual a 7(3+4) e não tinham diagnóstico

de doença extraprostática. Nenhum dos pacientes avaliados apresentou as mutações estudadas (AR-T878A e AR-Q784*) nas amostras de DNA genômico de sangue ou de tecido prostático. Conclusão: As mutações do receptor de androgênios AR-T878A e AR-Q784* não foram identificadas na amostra avaliada de pacientes do Rio Grande do Sul. Os resultados foram concordantes entre o genótipo das amostras avaliadas em leucócitos de sangue periférico e de tecido prostático.

Palavras-chave: câncer de próstata; hiperplasia prostática benigna; receptor de androgênio; mutação.

ABSTRACT

Prostate diseases affect about 80% of men over 50 years old, being that the two most common forms are benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa), both resulting from abnormal cellular proliferation. PCa is the second highest incident type of cancer in Brazil, and Rio Grande do Sul (RS) is the state with higher prevalence. It is known that androgens have an important role in the prostatic gland and their actions are mediated by a cellular receptor denominated androgen receptor (AR), a nuclear receptor that acts as ligand-dependent transcription factor. Therefore, AR alterations could be associated with BPH and PCa. Because PCa cell growth is androgen-dependent, hormonal deprivation is the most used therapeutic approach, however, some men develop resistance to such treatment and the tumor keeps advancing. AR mutations are being pointed as antiandrogenic therapy resistance factors and biochemical recurrence in advanced tumors, but little is known about their role in primary tumors. Two important mutations related to therapeutic resistance have been described: NG_009014.2(AR_v001):c.2632A>G (AR-T878A) and NG_009014.2(AR_v001):c.2350C>T (AR-Q784*), and other genetic and environmental factors can also be associated to disease outcome in these patients. Objectives: To describe the frequency of AR-T878A and AR-Q784* mutations in a sample of patients from RS and to evaluate their associations with tumoral aggressiveness and development, with biochemical recurrence. Methods: 237 patients treated at the Urology Service of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) and referred for surgery for prostate alterations were included in this study. Clinical data was obtained, and blood and prostate tissue samples were collected, during the surgery, for genomic DNA extraction and molecular analysis. Genotyping was performed by real-time PCR (qPCR) using specific fluorescent probes and sequencing was done by the Sanger method. Results: Age at diagnosis of BPH or PCa did not differ significantly between groups and both groups presented a homogeneous composition considering the color or race of participants. Serum PSA levels were higher in the PCa (n=119) group compared to the BPH (n=118) group, most patients with PCa had a Gleason score 7 (3 +4) and had no diagnosis of extraprostatic disease. None of the patients evaluated carried the mutations (AR-T878A and AR-Q784*) in blood genomic DNA or prostatic tissues samples. Conclusion: Androgen receptor mutations AR-T878A and AR-Q784* were not

identified in the evaluated sample of patients from Rio Grande do Sul. The results were consistent between the genotype of the peripheral blood leukocytes sample and prostate tissue samples.

Key words: Prostate cancer; benign prostatic hyperplasia; androgen receptor; mutation.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 5 |
| LISTA DE FIGURAS | 7 |
| LISTA DE TABELAS | 9 |
| RESUMO | 10 |
| ABSTRACT | 12 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 PRÓSTATA..... | 16 |
| 1.2 DOENÇAS DA PRÓSTATA | 17 |
| 1.2.1 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) | 17 |
| 1.2.2 Câncer de Próstata (CaP)..... | 19 |
| 1.3 SINALIZAÇÃO ANDROGÊNICA | 22 |
| 1.4 MUTAÇÕES NO GENE QUE CODIFICA O RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS (AR) | 24 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 28 |
| 3. HIPÓTESE | 29 |
| 4. OBJETIVOS..... | 29 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL | 29 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 30 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 30 |
| 5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO | 30 |
| 5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E TAMANHO AMOSTRAL | 30 |
| 5.3 ASPECTOS ÉTICOS | 31 |
| 5.4 EXTRAÇÃO DO DNA | 32 |
| 5.5 GENOTIPAGEM DAS MUTAÇÕES AR-T878A E AR-Q784* | 33 |
| 5.6 SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO DE SANGER | 34 |
| 5.7 CONSTRUÇÃO DE HETEROZIGOTOS ARTIFICIAIS | 35 |
| 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 35 |
| 5.9 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO | 35 |
| 5.10 FONTES DE FINANCIAMENTO..... | 36 |
| 5.11 DESCARTE DE RESÍDUOS | 36 |
| 6. RESULTADOS | 36 |
| 6.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES | 36 |
| 6.2 GENOTIPAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS LINHAGENS CELULARES LNCaP E C4-2B | 41 |
| 6.3 CONSTRUÇÃO DE HETEROZIGOTOS ARTIFICIAIS PARA AR-T878A..... | 45 |
| 6.4 GENOTIPAGEM E SEQUENCIAMENTO PARA AS MUTAÇÕES AR-T878A E AR-Q784*..... | 49 |

| | |
|-------------------|----|
| 7. DISCUSSÃO..... | 58 |
| 8. CONCLUSÃO..... | 66 |
| REFERÊNCIAS | 67 |
| ANEXO I..... | 74 |
| ANEXO II | 76 |
| ANEXO III..... | 79 |
| ANEXO IV | 81 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 PRÓSTATA

A próstata é a maior glândula acessória do trato reprodutivo masculino. Ela é formada por um aglomerado de glândulas tubuloalveolares ramificadas que têm como principal função secretar o fluido prostático, rico em proteínas e íons, o qual compõe o sêmen e tem grande importância nas funções reprodutivas (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008; GUYTON; HALL; GUYTON, 2006; HAYWARD; CUNHA, 2000; MOTRICH *et al.*, 2018).

Localizada abaixo da bexiga e anterior ao reto, a próstata envolve a região proximal da uretra e é formada por dois compartimentos celulares com funções diferenciadas. As células epiteliais são responsáveis pela secreção glandular, o antígeno prostático específico (PSA) e expressam os receptores de androgênios (AR), enquanto o estroma fornece um tecido de suporte para as glândulas tubuloalveolares e garante a homeostase do ambiente, uma vez que secretam fatores de crescimento, a enzima 5- α -redutase, receptores de estrogênios e, também, AR. O bom funcionamento da próstata depende de uma correta relação entre esses dois compartimentos celulares (DANIYAL *et al.*, 2014; MOTRICH *et al.*, 2018; NIU; XIA, 2009; WADHWA; DUMBRE, 2016).

Apesar da próstata ser dividida em lobos, eles não são facilmente identificados em humanos, logo, a divisão dessa glândula se dá por zonas (Figura 1). A zona central tem formato de cone e envolve a uretra e os ductos seminiais. A zona periférica compreende o tecido que forma o ápice da próstata e, também, o tecido posterior existente próximo à cápsula fibrosa. A zona de transição consiste em duas porções iguais em torno da uretra, na região central da próstata. As doenças proliferativas da próstata, como o câncer de próstata (CaP) e a hiperplasia prostática benigna (HPB) afetam, na maioria das vezes, zonas distintas. Enquanto a maioria dos casos de CaP se desenvolvem na zona periférica, os nódulos característicos da HPB costumam surgir na zona de transição (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2008; HAMMERICH; AYALA; WHEELER, 2009).

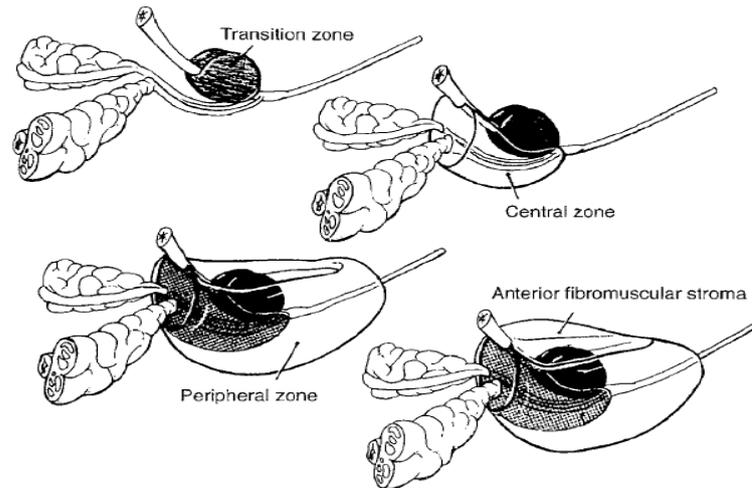


Figura 1. Anatomia da próstata com representação das diferentes zonas. Retirado e adaptado de HAMMERICH; AYALA; WHEELER, 2009.

1.2 DOENÇAS DA PRÓSTATA

Atualmente, as doenças prostáticas atingem elevada parcela de homens acima de 50 anos de idade e um dos possíveis fatores associados à alta frequência dessas alterações é o aumento da expectativa de vida. As duas formas mais incidentes das doenças da próstata são a HPB e o CaP, ambas causadas pela proliferação celular anormal dessa glândula (CRIPPA *et al.*, 2010; ILIC; MISSO, 2012).

Devido à longevidade da população do Rio Grande do Sul (RS), cujo índice de envelhecimento calculado para 2020 é de 71,98, e a alta prevalência acima da quinta década de vida, as doenças prostáticas são problemas de saúde pública (CHATTERJEE, 2003; IBGE, 2019).

1.2.1 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A HPB é uma doença proliferativa, progressiva e não maligna associada com a senescência. É a doença urológica não maligna mais comum entre os homens adultos, sendo que a incidência sobre homens na faixa dos 50 anos de idade é de, aproximadamente, 50% e aumenta para 80% em homens com 70 anos de idade ou

mais (ILIC; MISSO, 2012; KIRBY, 2000; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016). Segundo dados disponibilizados recentemente pelo Ministério da Saúde do Brasil, o país teve 21.260 internações por conta de HPB no último ano (período de setembro de 2018 a setembro de 2019), sendo que o RS contribuiu com 1.623 internações e é o terceiro estado da Federação com maior número de internações, ficando atrás somente de São Paulo e Minas Gerais (5.817 e 2.100 internações, respectivamente) (Ministério da Saúde, 2019).

A patogênese da HPB está associada, além da idade, à ativação hormonal dos AR. A ação da testosterona e da diidrotestosterona (DHT) sobre o AR resulta na proliferação e diferenciação do tecido epitelial e do estroma fibromuscular da glândula. Alguns estudos já revelam a genética como sendo um outro importante fator no desenvolvimento desse tumor benigno, visto que homens que possuem parentes diretos com diagnóstico de HPB têm entre quatro e seis vezes mais chances de também serem submetidos a uma cirurgia por HPB (CUNHA *et al.*, 2019; HELFAND *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2016; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; ZAMBRA *et al.*, 2013).

A proliferação descontrolada das células epiteliais, fibrosas e musculares afeta, em maior grau, a zona de transição da próstata, região localizada em torno da uretra. A formação de nódulos e o aumento do tônus da musculatura lisa nesse local podem afetar a uretra e causar sintomas do trato urinário inferior (LUTS, do inglês *lower urinary tract symptoms*), gerando bastante desconforto e diminuição da qualidade de vida em alguns pacientes. Dependendo do grau de avanço da HPB, os sintomas podem variar, entretanto, os mais comumente apresentados pelos pacientes são: mudança no ritmo miccional, dor ou dificuldade para urinar, esvaziamento incompleto da bexiga, jato fraco de urina, e, até mesmo, disfunções sexuais (FIBBI *et al.*, 2010; ILIC; MISSO, 2012; LAWRENTSCHUK; PERERA, 2016; LEE *et al.*, 2016; MEIKLE *et al.*, 1999). O peso médio da próstata é, em média, de 20g ao final da puberdade e se mantém constante até que o processo de crescimento estimulado por androgênios durante a HPB faça com que o peso da glândula aumente significativamente e ultrapasse os 30g (BERRY *et al.*, 1984; HAYWARD; CUNHA, 2000).

Sabendo do papel mandatório da estimulação androgênica no desenvolvimento e progressão da HPB e que a DHT é formada intracelularmente a

partir da conversão da testosterona pela enzima 5- α -redutase tipo 2, a primeira opção terapêutica para manejo da HPB é a redução do crescimento celular dependente de androgênios através da utilização de fármacos, como a finasterida, que são capazes de inibir a atividade da enzima 5- α -redutase. Essa terapia medicamentosa é efetiva para a maioria dos pacientes, entretanto, se a abordagem farmacológica não apresentar resultados satisfatórios em relação à melhora dos sintomas e diminuição da progressão da HPB, existem opções cirúrgicas a serem consideradas. A principal técnica cirúrgica utilizada para tratar pacientes com HPB é a ressecção transuretral da próstata (RTU). Nessa forma de tratamento, pequenos fragmentos da próstata, que está aumentada, são removidos e, imediatamente após a cirurgia, o paciente apresenta melhora significativa dos sintomas, principalmente pela desobstrução da uretra. Assim como o tratamento farmacológico, a cirurgia é bastante eficaz para o manejo da HPB, porém, pode apresentar alguns efeitos adversos importantes, como incontinência urinária e disfunção sexual (CHATTERJEE, 2003; HUANG *et al.*, 2019; ILIC; MISSO, 2012; LEE *et al.*, 2016).

1.2.2 Câncer de Próstata (CaP)

Desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o CaP é o tipo de câncer mais incidente no Brasil e a segunda principal causa de morte por câncer entre os homens, representando 13,4% da mortalidade por neoplasias no país. O RS é o estado da Federação que apresenta a maior incidência de CaP (111,50 casos para cada 100.000 homens) em todo o território nacional, enquanto o estado do Amapá apresenta a menor taxa no país (22,74 casos/100.000 homens). Entre setembro de 2017 e setembro de 2019, ocorreram 3.988 internações por CaP no RS, das 68.723 internações por CaP registradas no Brasil durante esse período, com taxa de mortalidade de 9,75%, superior à média Nacional, que é 9,47% (INCA, 2019; Ministério da Saúde, 2019).

CaP é utilizado como sinônimo de adenocarcinoma de próstata por conta da predominância (95% dos casos) do desenvolvimento de tumores nos ácinos dos ductos prostáticos. Além da hereditariedade, influências hormonais, fatores ambientais e dietéticos, aumento da idade e raça são importantes fatores de risco

para o desenvolvimento de CaP. Afroamericanos e homens com pai e/ou irmãos diagnosticados com CaP compõem o grupo da população com maior risco de serem afetados por essa neoplasia (DANIYAL *et al.*, 2014; REITER; DE KERNION, 2002; UDENSI; TCHOUNWOU, 2016; ZAMBRA *et al.*, 2016). A patogênese do CaP ainda não é totalmente compreendida, mas, sabe-se que a ativação dos AR por androgênios, testosterona e DHT, especialmente, apresentam importante papel uma vez que o crescimento das células prostáticas é androgênio-dependente. Durante o desenvolvimento e progressão do CaP, há a formação de novas estruturas ducto-acinares na glândula (CUNHA *et al.*, 2019; HILLEBRAND *et al.*, 2018a; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016).

Em seu estágio inicial, o CaP é assintomático e limita-se à próstata, embora alguns pacientes possam apresentar LUTS e, até mesmo, retenção urinária. Com a evolução, invade órgãos próximos (vesículas seminais, uretra e bexiga) e as metástases do CaP podem espalhar-se para órgãos mais distantes (ossos e linfonodos em um primeiro momento e fígado, pulmões e cérebro mais tardiamente), provocando sérias consequências (LEFORT; ALMEIDA, 2004; RHODEN, 2010; ROJAS-MANRIQUE *et al.*, 2019).

O diagnóstico do CaP, geralmente, é feito associando dosagem de PSA sérico, exame de toque retal e biópsia da próstata. O PSA é uma glicoproteína secretada pelas células epiteliais e suas funções são exercidas no âmbito da fertilização, visto que a secreção prostática compõe o fluido seminal liberado durante a ejaculação. O uso do PSA como biomarcador para CaP foi descrito em 1991, porém, sua utilização, atualmente, é bastante controversa, uma vez que os níveis de PSA podem aumentar devido ao avanço da idade, HPB, prostatite ou infecções prostáticas. Logo, a falta de especificidade desse biomarcador para detectar e diferenciar os tumores malignos exige que o resultado do teste seja avaliado conjuntamente com outros aspectos clínicos (CATALONA *et al.*, 1991; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; PEZARO; WOO; DAVIS, 2014).

O fragmento de tecido oriundo da biópsia é avaliado quanto aos seus aspectos histológicos estruturais, através de coloração com hematoxilina e eosina (HE), e classificado em cinco diferentes graus (1 a 5), de acordo com o grau de diferenciação das células tumorais, conforme estabelecido em 1974 e mostrado na Figura 2 (GLEASON; MELLINGER, 1974; HUMPHREY, 2017). O score de Gleason

do tumor é o resultado da soma do grau aplicado para os dois grupos de células tumorais mais prevalentes no fragmento analisado, ou seja, esse escore varia de 2(1+1), representando tumores menos agressivos e formados por células tumorais mais diferenciadas, a 10(5+5), tumores agressivos compostos por células malignas indiferenciadas e pouca formação glandular (CALVETE *et al.*, 2003; GLEASON; MELLINGER, 1974; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; RHODEN, 2010).

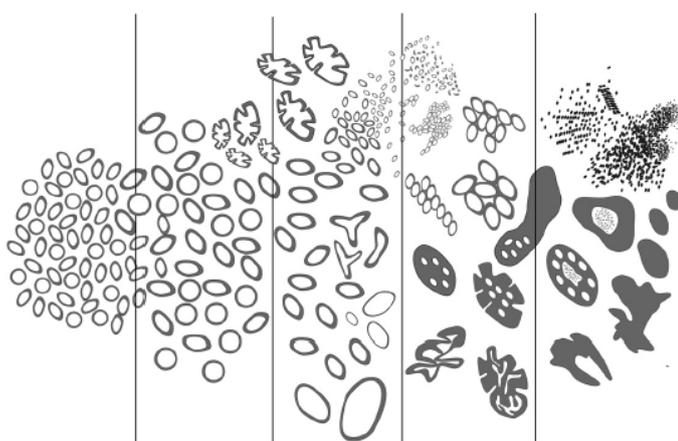


Figura 2. Padrões histológicos do adenocarcinoma de próstata. Grau 1 a 5, da esquerda para direita. Retirado e adaptado de HUMPHREY, 2017.

Se diagnosticado e tratado precocemente, é considerado um câncer de bom prognóstico. O tratamento para CaP localizado, geralmente, é feito através da remoção cirúrgica da próstata, podendo incluir vesículas seminais e linfonodos, ou não, sem utilização de terapia medicamentosa. Sessões de radioterapia podem fazer parte do protocolo para o tratamento de tumores localizados. Visto que o crescimento de células do CaP é dependente da ação dos androgênios, a terapia de privação hormonal (ADT, do inglês *androgenic deprivation therapy*) é o principal tratamento realizado em pacientes com CaP metastático. Os medicamentos utilizados na ADT incluem antagonistas do AR, como a enzatulamida, ou inibidores da enzima CYP17A1, participante da rota de biossíntese dos androgênios, como o acetato de abiraterona (LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; RHODEN, 2010; ROJAS-MANRIQUE *et al.*, 2019; WADHWA; DUMBRE, 2016). A ablação androgênica é, inicialmente, eficaz e reduz os sintomas da doença em 70 a 80% dos pacientes. Porém, alguns homens desenvolvem resistência à terapia e a evolução

do tumor permanece, caracterizando o CaP refratário ao tratamento hormonal ou castração (CRPC, do inglês *castration-resistant prostate cancer*) (CAFFO *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2004; EDWARDS *et al.*, 2001).

1.3 SINALIZAÇÃO ANDROGÊNICA

Testosterona, DHT, androstenediol e androstenediona são exemplos de androgênios, hormônios esteroides que possuem papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e regulação do fenótipo e fisiologia reprodutiva masculina. Sabe-se que a sinalização androgênica exerce papel fundamental no controle e desenvolvimento da próstata, além da diferenciação e maturação sexual masculina, através do AR e um desbalanço na função ou nos níveis de androgênios pode causar a proliferação excessiva da glândula, levando ao desenvolvimento de HPB e CaP (CARSON; RITTMASER, 2003; DUTT; GAO, 2009; MUNKLEY *et al.*, 2019).

O AR é um membro da superfamília de receptores nucleares de hormônios esteroides que age como fator de transcrição, regulando a expressão de genes-alvo, dependente de ligante. O gene do AR está localizado no cromossomo X, na posição Xq11-12, e possui oito éxons, sendo que todos eles contribuem para a codificação completa da proteína de 110kDa que é o AR (Figura 3). Igualmente a outros receptores de hormônios esteroides, o AR é dividido em três principais domínios funcionalmente distintos: domínio de transativação amino-terminal (NTD), que contém várias regiões de sequência repetitiva do DNA e é altamente variável; domínio de ligação ao DNA (DBD), codificado pelos éxons 2 e 3, é bem conservado e apresenta dois domínios dedo de zinco para ligar-se ao DNA; domínio de ligação ao ligante (LBD), codificado pelos éxons 4 a 8 na região carboxi-terminal. O AR apresenta dois domínios de transativação, AF-1 e AF-2, sendo que o primeiro localiza-se no NTD e o segundo, no LBD (AZOITEI *et al.*, 2016; BRUM; SPRITZER; BRENTANI, 2005; KOOCHKEPOUR, 2010; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016). Entre os domínios DBD e LBD existe uma região de dobradiça (HR, do inglês *hinge region*) que apresenta vários sítios de metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação do AR. Além disso, a HR apresenta um sinal de localização nuclear

que está envolvido na translocação do AR do citoplasma para o núcleo e é ativado pela ligação de androgênios ao AR (AZOITEI *et al.*, 2016; BERREVOETS *et al.*, 1998; GOBINET; POUJOL; SULTAN, 2002).

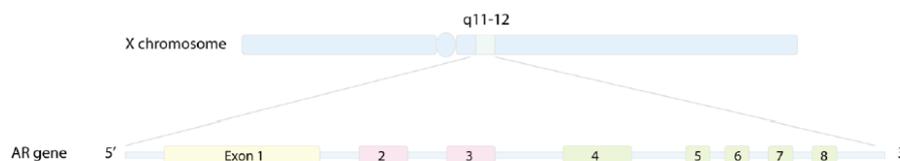


Figura 3. Gene do receptor de androgênio (AR) com representação dos oito éxons codificantes e dos diferentes domínios funcionais. Retirado e adaptado de LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016.

Inativo, o AR encontra-se associado a proteínas de choque térmico no citoplasma das células epiteliais prostáticas. Embora a próstata seja altamente controlada pelo eixo de sinalização androgênica, algumas células da glândula, como as células basais, células neuroendócrinas e células tronco, são AR-negativas, ou seja, não expressam o AR (AZOITEI *et al.*, 2016; BALK; KNUDSEN, 2008; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; LU; TSAI; TSAI, 1997). Quando a testosterona entra no citoplasma das células prostáticas, é convertida em DHT, que é o ligante mais potente do AR, pela enzima 5- α -redutase. A ligação da DHT ao AR induz a mudanças conformacionais e translocação do complexo hormônio-receptor para o núcleo da célula, onde irá ligar-se a regiões específicas do DNA, conhecidas como elemento responsivo aos androgênios (ARE) e localizadas nas regiões promotoras dos gene-alvos (Figura 4). Complexado com o DNA, o AR regula a transcrição desses genes, os quais estão envolvidos com os processos de diferenciação e proliferação celular (GUO *et al.*, 2009; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; MOSTAGHEL; PLYMATE; MONTGOMERY, 2013).

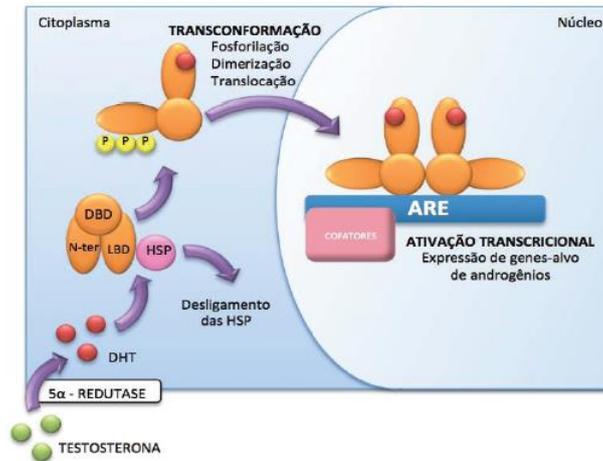


Figura 4. Representação do mecanismo de ação dos androgênios em células prostáticas. Retirado e adaptados de (HILLEBRAND, 2018).

Sabendo que a testosterona é o principal androgênio masculino e sua ação é mediada por AR, Huggins e Hodges demonstraram a associação entre os androgênios e o CaP e que, após a remoção dos androgênios (via castração ou administração de estrogênios), ocorre uma regressão e controle do potencial metastático do CaP (HUGGINS; HODGES, 1941). Entretanto, muitos pacientes que se submetem à deprivação androgênica desenvolvem tumores independentes de androgênios que são resistentes ao tratamento. A habilidade das células tumorais de crescer em condições de privação hormonal está relacionada com a reativação do eixo de sinalização androgênica, provocada por mutações do AR, aumento da afinidade à DHT, elevada expressão do AR, síntese de androgênios pelas células do CaP ou transativação do AR independente de ligante (HILLEBRAND *et al.*, 2018a; LOCKE *et al.*, 2008; NACUSI; TINDALL, 2009).

1.4 MUTAÇÕES NO GENE QUE CODIFICA O RECEPTOR DE ANDROGÊNIOS (AR)

O CaP, assim como os demais cânceres, tem origem multifatorial, incluindo mutações germinativas ou somáticas, induzidas por fatores externos como poluentes ambientais, hábitos alimentares, desbalanço hormonal, idade e uso de medicamentos, em genes associados com a patogênese. Devido à sua importância

no crescimento e desenvolvimento da glândula prostática, incluindo em situações patológicas, o AR está envolvido na carcinogênese prostática, visto que sua forma funcional é expressa durante todos estágios do CaP (KOOCHKPOUR *et al.*, 2014; SRIBUDIANI *et al.*, 2018).

Mutações no AR são raras em pacientes com CaP localizado, entretanto, são encontradas em até 30% dos tumores de câncer de próstata resistente à castração (CRPC). Dentre as mutações do AR envolvidas com o CaP já descritas, a maioria consiste em mutações pontuais de nucleotídeos resultantes de alterações somáticas no gene, diferentemente da Síndrome de Insensibilidade a Andrógenos, onde 70% dos casos são resultados de mutações germinativas do AR (EISERMANN *et al.*, 2013; GOTTLIEB *et al.*, 2012; KO *et al.*, 2005; KOOCHKPOUR *et al.*, 2014). Estudos demonstram que, dentre os quatro domínios funcionais codificados pelo gene do AR (NTD, DBD, LBD e HR), a maioria das mutações de substituição (51%) ocorrem no domínio de ligação ao ligante (LBD). Essas mutações resultam em funções defeituosas do AR, por perda ou ganho de função do receptor, e têm sido apontadas como fatores de resistência à terapia antiandrogênica e recidiva bioquímica do tumor (JERNBERG *et al.*, 2017; KITA *et al.*, 2018; KOOCHKPOUR *et al.*, 2014; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016).

O surgimento de mutações somáticas no gene do AR pode estar associado à terapia de deprivação de androgênios (ADT) utilizada em pacientes com CaP metastático. As mutações de ganho de função resultam em maior atividade do AR em condições de baixas concentrações androgênicas, reativando o eixo de sinalização entre androgênios e AR e induzindo os pacientes à resistência ao tratamento utilizado, uma vez que o tecido prostático segue proliferando e as células tumorais, instalando novos focos metastáticos independentemente da ablação hormonal (EISERMANN *et al.*, 2013; GOTTLIEB *et al.*, 2012; TILKI *et al.*, 2016).

A principal abordagem terapêutica para tratamento de pacientes com CaP metastático envolve a utilização de fármacos antagonistas do AR ou inibidores da enzima CYP17A1, porém, estudos mostram que mutações no LBD são desenvolvidas após certo tempo de tratamento, podendo tornar os AR suscetíveis à ativação pelos próprios fármacos antagonistas ou por outros hormônios endógenos, como progesterona, DHEA (do inglês, *dehydroepiandrosterone*) e estrogênios, que não seriam capazes de ativar o AR em situações fisiológicas. Ou seja, as mutações

somáticas induzidas pela ADT garantem uma rota de escape ao bloqueio androgênico causado pelo tratamento e permitem que o CaP siga desenvolvendo-se (EISERMANN *et al.*, 2013; LALLOUS *et al.*, 2016; PREKOVIC *et al.*, 2016).

Duas importantes mutações relacionadas com a resistência ao tratamento com antagonistas do AR e inibidores da enzima CYP17A1 (importante enzima na biossíntese de androgênios) já foram descritas: NG_009014.2(AR_v001):c.2632A>G (AR-T878A) e NG_009014.2(AR_v001):c.2350C>T (AR-Q784*), ambas no domínio de ligação ao ligante e resultantes de uma simples troca de nucleotídeo (CHEN *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2017).

A primeira mutação pontual descrita no CaP foi a substituição da base nitrogenada adenina por uma guanina na posição c.2632 do éxon 8 do gene do AR no cromossomo X, alterando, portanto, o LBD do AR e caracterizando a mutação NG_009014.2(AR_v001):c.2632A>G (AR-T878A) (GADDIPATI *et al.*, 1994; GOTTLIEB, 2013; PREKOVIC *et al.*, 2016; V FIANDALO; WU; L MOHLER, 2013). Inicialmente descrita na linhagem celular LNCaP, essa mutação tem origem somática e é encontrada com bastante frequência em pacientes com CaP resistente à castração, geralmente naqueles que foram tratados com inibidores da enzima CYP17A1, como o acetato de abiraterona e antagonistas do AR, como a flutamida (CHEN *et al.*, 2015; EISERMANN *et al.*, 2013; GOTTLIEB, 2013; PREKOVIC *et al.*, 2016).

A forma mutada do AR-T878A possui uma alteração no tamanho do LBD, devido à substituição do aminoácido treonina pela alanina, permitindo que o AR altere sua afinidade e estabeleça ligações com diferentes ligantes. Mutações no códon 878 do AR tornam-no estimulável pela progesterona, que é fraca agonista de receptores não-mutados, e estrogênios. Antiandrogênios, como a hidroxiflutamida, também atuam como ligantes e ativam essa forma mutada do AR (CHEN *et al.*, 2015; JERNBERG *et al.*, 2017; MALKIN *et al.*, 1990; PREKOVIC *et al.*, 2016; V FIANDALO; WU; L MOHLER, 2013). A seleção de células tumorais que expressam a mutação AR-T878A faz com que os pacientes voltem a desenvolver o tumor, apesar do tratamento, uma vez que a atividade do AR está mantida, resultando em uma resistência adquirida à ADT (CHEN *et al.*, 2015).

A mutação NG_009014.2(AR_v001):c.2350C>T (AR-Q784*) foi descrita por Han *et al.* (2017) em estudo recente avaliando homens com CaP resistentes ao

tratamento com cetoconazol, fármaco que inibe a conversão de esteroides pela ação da enzima CYP17A1 e diminui os níveis séricos de testosterona e DHT, e dutasterida, inibidor da enzima 5- α -redutase, conversora da testosterona em DHT (CHEN *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2017). É uma mutação pontual na posição c.2350 do éxon 6 no gene do AR com a substituição de uma base nitrogenada citosina por uma timina, o que resulta na conversão do aminoácido 784, originalmente glutamina, em um *stop codon* e cria uma forma truncada do AR, com apenas uma fração do domínio de ligação ao ligante (Figura 5). Em sua forma selvagem, o AR é uma proteína com, aproximadamente, 110kDa, porém, AR que expressam a mutação Q784* têm menor tamanho, em torno de 75kDa (HAN *et al.*, 2017).

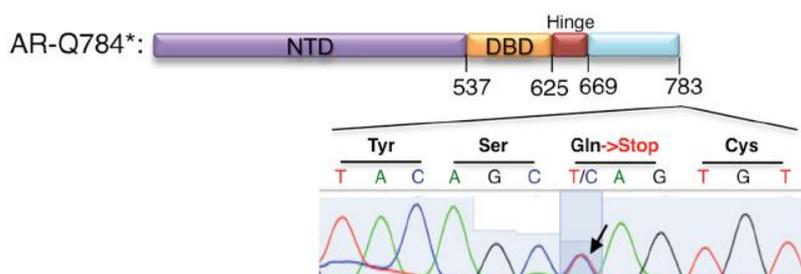


Figura 5. Estrutura proteica do AR-Q784* e sequenciamento indicando a mutação c.2350C>T. Retirado e adaptado de HAN *et al.*, 2017.

O estudo de Han *et al.* (2017) demonstrou que, apesar da capacidade de ligar-se à cromatina, uma vez que possui o domínio de ligação ao DNA íntegro, o mutante AR-Q784* não possui atividade transcricional, devido ao domínio de ligação ao ligante truncado que é expresso. Por isso, receptores que apresentam a mutação AR-Q784* são constitutivamente expressos no núcleo e, independentemente da ativação por androgênios, como DHT, ligam-se aos AREs. A principal função do AR-Q784* é a correção da atividade transcricional do AR não-mutado, pois, o AR-Q784* dimeriza com a forma selvagem do AR e, então, ativa-o, aumentando sua atividade de transcrição gênica, mesmo sob baixos níveis de androgênios, e reativa o eixo de sinalização do AR em pacientes sob tratamento, induzindo à resistência do CaP (HAN *et al.*, 2017).

2. JUSTIFICATIVA

As doenças da próstata atingem cerca de 80% dos homens com idade entre 40 e 90 anos, o que equivale a 14 milhões de brasileiros. Dentre elas, estão a HPB e o CaP, alterações do crescimento prostático que apresentam uma prevalência aumentada com o avanço da idade.

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CaP é o mais incidente entre os homens em todas as regiões do país. Segundo dados do DATASUS, o Brasil teve, nos últimos dois anos (setembro de 2017 a setembro de 2019), R\$ 210.004.717,30 de gastos com 68.723 internações por CaP, e uma taxa média de mortalidade de 9,47% das internações. No Rio Grande do Sul (RS), nesse mesmo período, foram investidos R\$ 11.863.574,59 em 3.988 internações por CaP e o estado apresentou taxa de mortalidade de 9,75%, um pouco superior à média Nacional.

O Ministério da Saúde do Brasil, assim como acontece em outros países (Austrália, Canadá e Reino Unido), não incentiva programas de rastreamento de CaP, pois ainda existe considerável incerteza sobre os benefícios associados. Portanto, ações de controle da doença focam, principalmente, no diagnóstico precoce. Para propor novas estratégias no controle dos tumores prostáticos, HPB e CaP, é preciso conhecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desses tumores.

É sabido que os androgênios possuem um papel crucial no desenvolvimento, na manutenção e na regulação da glândula prostática e que suas ações são mediadas pelo receptor celular denominado receptor de androgênios. Sendo assim, alterações no AR podem estar relacionadas com o desenvolvimento da HPB e do CaP, porém, a implicação dessas isoformas na doença benigna da próstata e no carcinoma primário ainda é pouco conhecida. Em tumores avançados, as isoformas do AR têm sido associadas a tumores resistentes às terapias farmacológicas utilizadas atualmente.

Desta forma, a elucidação dos mecanismos envolvidos neste processo é necessária para que seja possível diferenciar tumores indolentes daqueles com alto potencial de malignidade e/ou propor novas alternativas para o controle da HPB e do CaP, levando à redução de custos para o Sistema Único de Saúde (SUS). Além

disso, é importante estabelecer metodologias menos invasivas que possam indicar um perfil genético do tumor, ferramenta crucial que poderá direcionar a conduta clínica a ser seguida. Para substituir as biópsias tumorais por testes minimamente invasivos, é imprescindível a confirmação da equivalência do genótipo tumoral encontrado em amostras de biópsias e em amostras de sangue.

3. HIPÓTESE

Mutações genóticas no gene que codifica o receptor de androgênios têm sido consideradas como fatores de resistência ao tratamento de deprivação androgênica, por isso, as hipóteses desse estudo são:

H0: As mutações AR-T878A e AR-Q784* não estão presentes em pacientes com HPB.

H1: As mutações AR-T878A e AR-Q784* estão presentes em pacientes com HPB.

H0: Expressão de AR mutados, AR-T878A e AR-Q784*, em pacientes com CaP primário está relacionada com a agressividade tumoral, resistência terapêutica de ablação hormonal e capacidade de recidiva bioquímica.

H1: Expressão de AR mutados, AR-T878A e AR-Q784*, em pacientes com CaP primário não está relacionada com a agressividade tumoral, resistência terapêutica de ablação hormonal e capacidade de recidiva bioquímica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a frequência das mutações de receptores de androgênio, AR-T878A e AR-Q784*, em uma amostra de pacientes do Rio Grande do Sul submetidos à cirurgia de próstata, por hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata, no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e avaliar sua possível implicação no desenvolvimento, agressividade tumoral e recidiva bioquímica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença das mutações do AR, AR-T878A e AR-Q784*, nos grupos HPB e CaP e descrever suas frequências.
- Avaliar o risco de desenvolvimento de CaP em pacientes com a presença das mutações em análise.
- Avaliar a concordância da presença das mutações em análise no DNA genômico de amostras de sangue e de tecido prostático derivadas de pacientes com CaP e HPB.
- Avaliar se as variantes AR-T878A e AR-Q784* apresentam efeito modificador de fenótipo no grupo de pacientes com CaP, considerando as seguintes manifestações clínicas: idade ao diagnóstico, agressividade tumoral, desenvolvimento de resistência à deprivação androgênica e recidiva bioquímica;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal para análise de mutações do AR em amostras de sangue e de tecido prostático provenientes de pacientes com CaP ou HPB recrutados do Serviço de Urologia do HCPA.

5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E TAMANHO AMOSTRAL

Foram incluídos pacientes em acompanhamento no Serviço de Urologia do HCPA que concordaram em participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) e que passaram por alguma das seguintes interferências cirúrgicas: ressecção transuretral prostática, prostatectomia radical, prostatectomia simples ou prostatovesiculectomia.

Os pacientes que apresentavam qualquer doença sexualmente transmissível (DST), tuberculose, que estivessem recebendo tratamento quimioterápico ou

possuísem o diagnóstico de outra neoplasia concomitante no momento da coleta das amostras foram excluídos do estudo.

O cálculo de tamanho amostral foi baseado nos resultados de frequência da mutação AR-T878A de Chen *et al.* (2015), considerado um nível de confiança igual a 95%, diferença aceitável de 0,05. Utilizando o software WINPEPI, versão 3.85, o tamanho amostral ideal calculado para este estudo foi de 237 participantes.

Algumas amostras utilizadas neste estudo foram obtidas de estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, cujo TCLE já previa o armazenamento do material biológico coletado para análises futuras (Anexo 2). Quando possível, um TCLE específico foi aplicado a esses pacientes que haviam doado o material previamente (Anexo 3).

5.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e aprovado, em seus aspectos éticos e científicos, sob o número 2019-0170.

Todos pacientes foram consultados antes da cirurgia quanto à utilização do material biológico coletado e assinaram o TCLE. Aos participantes, foi garantido sigilo em relação às informações obtidas e uso exclusivo do material para fins de pesquisa científica.

O tecido prostático (TP) coletado é proveniente de material de descarte. Os fragmentos de tumores prostáticos coletados foram divididos em duas partes, sendo que uma das partes foi enviada ao Serviço de Patologia do HCPA, para confirmar ou não a presença de câncer de próstata no fragmento coletado para a pesquisa. As amostras biológicas (sangue e tecido prostático) foram coletadas durante o transoperatório e transportadas ao Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram devidamente armazenadas até a extração do DNA.

O Serviço de Patologia do HCPA realizou o exame anatomopatológico dos espécimes cirúrgicos através de microscopia óptica e utilização de coloração hematoxilina-eosina (HE). A classificação histológica da agressividade dos tumores de próstata seguiu o escore de Gleason, descrito em 1974, o qual se baseia no

padrão arquitetural de cada espécime, variando de 2 a 10 (GLEASON DF, 1974).

Os dados referentes às variáveis idade, PSA pré-operatório, cor ou raça, resultado da análise anatomopatológica da peça cirúrgica e dos fragmentos coletados, escore de Gleason e demais dados clínicos pertinentes foram obtidos a partir de registros contidos no sistema AGHUse do HCPA.

Como o estudo é uma análise preliminar da frequência destas mutações na população de homens do Rio Grande do Sul, não foi oferecido aconselhamento genético, pois, até o momento, não existem tratamentos disponíveis para caso de identificação de alguma dessas mutações.

5.4 EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 4mL apropriados, contendo EDTA, logo após a estabilização do acesso anestésico. Pequenos fragmentos de tecido prostático tumoral ou hiperplásico foram coletados ao final da cirurgia e armazenados em criotubos com 0,5mL de RNAlater® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, USA). As amostras foram transportadas ao LaBiMET e armazenadas em geladeira convencional ou freezer -80°C, de acordo com a necessidade, até o momento do processamento das amostras.

O DNA genômico (gDNA) dos leucócitos periféricos foi extraído através da adaptação do protocolo de extração de DNA com cloreto de sódio descrito por Miller e seus colaboradores (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). A extração de gDNA do tecido prostático foi realizada utilizando kit comercial (ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System, Promega, WI, USA) de acordo com as orientações do fabricante.

A concentração de DNA presente nas amostras de sangue e de tecido prostático foi determinada através do espectrofotômetro Nanodrop® (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), avaliada nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. A pureza do DNA na amostra foi considerada satisfatória quando a razão entre as absorbâncias a 260 e 280nm ficou entre 1,8 e 2,0. Todas amostras de gDNA foram ajustadas para uma concentração final de 20ng/μL.

5.5 GENOTIPAGEM DAS MUTAÇÕES AR-T878A E AR-Q784*

A genotipagem do AR-T878A e AR-Q784* em amostras de gDNA, extraídas de pacientes com CaP e HPB, foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) com sistema de discriminação alélica TaqMan® (Applied Biosystems). Quatro diferentes linhagens celulares, LNCaP, C4-2B, DU145 e CWR22RV1, também foram avaliadas para as mutações AR-T878A e AR-Q784*.

As linhagens celulares foram obtidas da *American Type Culture Colection* (ATCC) (Manassas, Virgínia, EUA). O equipamento utilizado foi o PCR real time StepOne Plus® (Applied Biosystems), localizado no Departamento de Fisiologia do ICBS.

Os ensaios de genotipagem por TaqMan® (SNP Genotyping Analysis) consistem em um par de sondas (fragmentos de DNA) marcadas com fluoróforos distintos para cada alelo (VIC™ ou FAN™) na extremidade 5' e um *quencher* não fluorescente (NFQ) na extremidade 3'. O aumento da fluorescência emitida pelo(s) fluoróforo(s) durante as etapas da qPCR indica a presença do alelo 1 ou do alelo 2 no gDNA da amostra. Além disso, é utilizado um par de *primers* não marcados que flanqueiam a região polimórfica de interesse e permitem a sua amplificação.

As condições da qPCR foram: 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 90 segundos. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar (*threshold cycle* (Ct)), onde o aumento do sinal fluorescente foi associado com um aumento exponencial do produto da qPCR que pôde ser detectado.

Para cada reação de genotipagem do AR-T878A foi utilizado 5µL de TaqMan™ Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems Inc.), 0,5µL de sondas alelo-discriminantes pré-projetadas (20X) (C_175239649_10 - Taqman SNP Genotyping assay – Applied Biosystems), 20ng de gDNA (1µL) e 3,5µL de água livre de nucleases, totalizando reações de 10µL. A genotipagem do AR-Q784* foi feita em reações de 20µL que continham 10µL de TaqMan™ Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems Inc.), 0,5µL de sondas alelo-discriminantes customizadas (20X) (ID CUSTOM ANU7AWE - Taqman SNP Genotyping assay – Applied Biosystems), 40ng de gDNA (2µL) e 7,5µL de água livre de nucleases.

5.6 SEQUENCIAMENTO PELO MÉTODO DE SANGER

Para confirmação do genótipo detectado através dos ensaios de qPCR por TaqMan®, foi realizado o sequenciamento das regiões de interesse do AR no gDNA de amostras de sangue e tecido prostático selecionadas, a partir de produtos de PCR purificados. O sequenciamento das amostras foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) utilizando o equipamento ABI 3500 Genetic Analyzer com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems).

Os produtos da PCR foram marcados utilizando-se 5,0 pmol do primer 5'-GGAGGACCAAGGAAGTACG-3', para a mutação AR-T878A, e do primer 5'-GCTGACTACTGGGGCTTC-3', para a mutação AR-Q784* e 1 µL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) e eletroinjetadas no analisador genético.

As condições de reação da PCR para AR-T878A foram as seguintes: ativação da polimerase por 5 minutos a 95°C; 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos à 61°C e 45 segundos à 72°C; 10 minutos a 72°C. Para a mutação AR-Q784* foi empregada PCR *touchdown* com etapas de 30 segundos, de 66°C a 61,5°C. As condições da reação foram: 5 minutos a 95°C; 15 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos seguindo o programa de *touchdown* conforme já descrito, e extensão por 60 segundos a 72°C. Na sequência da reação, ocorriam 20 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 61°C e 60 segundos a 72°C. Os produtos de PCR utilizados para o sequenciamento foram purificados através do protocolo de polietilenoglicol (PEG) 20%, o que causa a precipitação de *primers* e dNTPs não incorporados durante a PCR.

5.7 CONSTRUÇÃO DE HETEROZIGOTOS ARTIFICIAIS

A construção de heterozigotos artificiais permite sua utilização como controle positivo heterozigoto durante os ensaios de genotipagem das amostras para a mutação em análise, uma vez que tecidos tumorais podem apresentar um cariótipo totalmente alterado, contendo várias cópias do cromossomo X. Além disso, o controle heterozigoto serve para validar o ensaio de genotipagem realizado.

Tendo em vista que o ensaio de genotipagem por TaqMan foi padronizado utilizando 20ng de gDNA das amostras, os heterozigotos artificiais foram construídos por 10ng de gDNA da amostra normal selecionada (TP907) e 10ng de gDNA de amostras mutadas.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O perfil da amostra estudada foi analisado através de tabelas de frequência de variáveis descritivas. Os resultados de idade apresentaram distribuição normal, portanto, foi utilizado o teste T de Student para análise estatística. Por outro lado, valores de PSA foram analisados pelo teste de Mann Whitney para amostras independentes entre os grupos, pois não obedeceram a uma distribuição paramétrica.

A distribuição da cor ou raça dos pacientes entres dois grupos foi analisada pelo teste estatístico de ANOVA de duas vias. A análise categórica de presença de doença extraprostática foi realizada pelo teste exato de Fisher.

O banco de dados foi realizado no Programa SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA) e as análises estatísticas, no GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $\alpha < 0.05$.

5.9 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

Os experimentos foram executados no Laboratório de Biologia Molecular

Endócrina e Tumoral (LaBiMET), localizado no Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), instalado no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, e no Serviço de Urologia do HCPA. Todos os laboratórios dispõem de infraestrutura adequada para a execução de todos os procedimentos e análises moleculares realizados neste projeto.

5.10 FONTES DE FINANCIAMENTO

Este projeto obteve recursos financeiros das seguintes agências de fomento: FIPE-HCPA, CNPq, CAPES e FAPERGS.

5.11 DESCARTE DE RESÍDUOS

Os tecidos oriundos dos pacientes e outros resíduos biológicos, como materiais contaminados e luvas, foram depositados em sacos plásticos brancos especiais para transporte de material infectante e recolhidos pela empresa terceirizada competente licitada pela UFRGS. Os resíduos químicos foram acondicionados em embalagens adequadas, identificados com todas informações requeridas e encaminhados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos, no Instituto de Química da UFRGS.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES

Para compor o grupo HPB foram selecionados 118 pacientes entre 43 e 89 anos, com o diagnóstico de HPB, com volume prostático estimado por ecografia abdominal acima de 30g e que foram submetidos à cirurgia de HPB no HCPA. O grupo CaP inclui 119 pacientes com idades entre 50 e 85 anos, com diagnóstico de câncer de próstata comprovado por exame anatomopatológico e que foram

submetidos à cirurgia por CaP no HCPA. Dentre os pacientes do grupo CaP, 81 possuíam diagnóstico de câncer de próstata confirmado na peça cirúrgica e no fragmento utilizado neste estudo e 38 pacientes possuíam diagnóstico confirmado apenas na peça cirúrgica. As amostras incluídas em cada um dos grupos foram selecionadas conforme ilustrado na Figura 6.

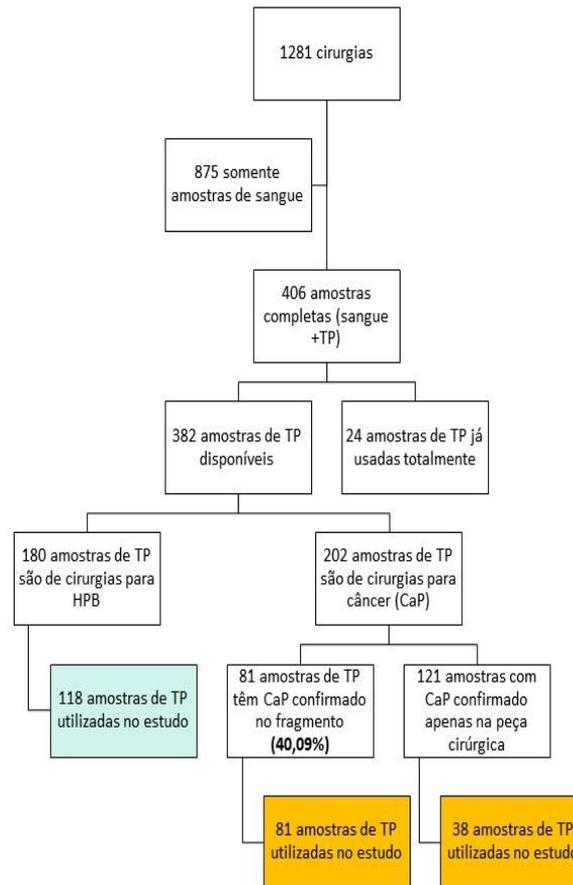


Figura 6. Fluxograma das amostras utilizadas para compor o grupo HPB e CaP do estudo.

As características da população estudada estão descritas na Tabela 1. Resultados referentes à idade e aos níveis de PSA pré-operatório dos pacientes estão demonstrados como mediana e intervalo interquartil. Informações acerca da cor ou raça e uso de terapias medicamentosas para tratamento de sintomas e progressão de HPB ou CaP previamente à data da cirurgia são descritas em sua frequência absoluta e relativa para cada um dos grupos.

A cor ou raça dos participantes foi obtida através da autodeclaração, de acordo com o sistema classificatório proposto pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em uma das cinco categorias existentes: branca, preta, parda,

amarela ou indígena (PETRUCCELLI; SABOIA, 2013).

Tabela 1. Características dos pacientes.

| | CaP (n=119) | HPB (n=118) | p |
|--|-----------------------|--------------------|----------|
| Idade (anos) | 67 (62 – 71) | 69 (63 – 73) | 0,0904 |
| PSA (ng/dL) | 9,60 (5,95 – 17,40) * | 4,34 (1,97 – 7,02) | < 0,0001 |
| Cor ou raça (nº de pacientes e %) | | | |
| Branca | 96 (80,7%) | 105 (89,0%) | 0,7358 |
| Preta | 12 (10,1%) | 7 (5,9%) | 0,9473 |
| Parda | 11 (9,2%) | 5 (4,2%) | 0,9074 |
| Amarela | - | 1 (0,9%) | 0,9999 |
| Indígena | - | - | - |
| Tratamento pré-operatório (nº de pacientes e %) | | | |
| Sim | 37 (31,0%) | 80 (67,8%) | |
| Não | 70 (58,8%) | 35 (29,7%) | |
| Sem informações | 12 (10,2%) | 3 (2,5%) | |

Idade e PSA estão representados como mediana e intervalo interquartil; O nível sérico de PSA foi avaliado pelo teste de Mann-Whitney para amostras independentes e foi considerado diferença significativa quando $p < 0,05$.

*Grupo CaP diferiu significativamente do grupo HPB.

Os níveis de PSA antes da cirurgia foram significativamente maiores ($p < 0,0001$) no grupo CaP quando comparados ao grupo HPB. Apesar da mediana de idade ser um pouco maior no grupo HPB (69 anos *versus* 67 anos no grupo CaP), não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,0904$).

O grupo CaP e o grupo HPB são formados, majoritariamente, por homens autodeclarados brancos (80,7% e 89,0%, respectivamente). Na segunda posição encontram-se os homens autodeclarados de cor ou raça preta, seguidos pela população parda de pacientes. Apenas um paciente, pertencente ao grupo HPB, autodeclarou-se pertencente à cor ou raça amarela e, em nenhum dos dois grupos, houve participantes autodeclarados indígenas. A distribuição dos pacientes por cor ou raça não apresentou diferença significativa entre os grupos para nenhuma das cinco categorias.

A realização de terapia medicamentosa previamente à cirurgia foi mais frequente no grupo de pacientes com HPB em relação ao grupo CaP. A maioria dos pacientes (67,8%) que compõem o grupo HPB fazia, anteriormente à cirurgia, tratamento farmacológico para os sintomas e prevenção da progressão da doença hiperplásica benigna. Dentre as possibilidades de tratamento para HPB, a combinação entre doxazosina e finasterida foi o protocolo mais utilizado pelos pacientes (51,3%) que fizeram algum tipo de tratamento pré-operatório. O uso de doxazosina ou finasterida isoladamente ficou como segunda e terceira opções terapêuticas, respectivamente (33,8% e 5%), para tratamento da HPB. Apenas um integrante do grupo CaP utilizou acetato de abiraterona, clássica terapia de supressão androgênica, enquanto os demais, considerando os pacientes que realizavam algum tipo de tratamento previamente à cirurgia, fizeram uso de doxazosina.

O tipo histológico do tumor apresentado por todos os pacientes do grupo CaP foi adenocarcinoma. A caracterização do grupo CaP (Tabela 2) também considerou o escore de Gleason dos fragmentos coletados, ou da peça cirúrgica principal, e a presença de doença extraprostática, visto que há vários estudos demonstrando correlação entre o escore de Gleason e doença intra e extraprostática (CALVETE *et al.*, 2003; CASTER *et al.*, 2015; NISHIMOTO *et al.*, 2008).

Tabela 2. Caracterização do grupo CaP quanto ao escore de Gleason e invasão tumoral regional e metastática.

| | Nº de pacientes (%) (n=119) |
|-------------------------------|--------------------------------|
| Escore de Gleason | |
| 6 (3+3) | 30 (25,2%) |
| 7 (3+4) | 39 (32,8%) |
| 7 (4+3) | 26 (21,8%) |
| 8 (4+4) | 10 (8,4%) |
| 9 (4+5) | 11 (9,2%) |
| 9 (5+4) | 3 (2,5%) |
| Doença extraprostática | |
| Sim | 49 (41,2%) |
| Não | 66 (55,2%) |
| Não informado | 4 (3,4%) |

Dentre os pacientes do grupo CaP, o escore de Gleason 7(3+4) foi o mais prevalente, seguido pelos escores de Gleason 6(3+3) e 7(4+3) (32,8%, 25,2% e 21,8% respectivamente). Somente 24 pacientes (20,2%), dentre os 119 que compõem o grupo CaP, apresentaram tumor prostático de alto grau, ou seja, tumores com escore de Gleason entre 8 e 10, os quais são considerados pouco diferenciados e bastante agressivos. Carcinomas classificados nessa faixa da escala de Gleason apresentam 75% de chances de se disseminarem para além da próstata em 10 anos, afetando demais órgãos e a sobrevivência do paciente acometido (INCA, 2002; LEKSHMY; PREMA, 2019).

A relação entre o escore de Gleason e a presença de doenças extraprostática ou intraprostática foi avaliada em 115 dos 119 pacientes do grupo CaP e evidenciou interação significativa ($p < 0,0001$). Os pacientes com tumores prostáticos classificados com escores de Gleason 7(4+3) foram os mais afetados por tumores que não são confinados à próstata (Tabela 3 e Figura 7). Por doença extraprostática considerou-se a invasão regional do tumor e metástase à distância. Três, dos 49 pacientes com doença extraprostática, apresentaram metástase óssea, sendo que, em um deles, o diagnóstico da metástase ocorreu um ano após a cirurgia por CaP. O escore de Gleason desses pacientes era 7(4+3), 8(4+4) e 9(4+5).

Tabela 3. Distribuição entre escore de Gleason e presença de doença extra e intraprostática nos pacientes do grupo CaP.

| Escore de Gleason | Doença extraprostática N de pacientes (%^a) | Doença intraprostática N de pacientes (%^b) |
|--------------------------|--|--|
| 6 (3+3) | 6 (12,2%) | 24 (36,4%) |
| 7 (3+4) | 8 (16,3%) | 31 (47%) |
| 7 (4+3) | 18 (36,7%) | 7 (10,6%) |
| 8 (4+4) | 6 (12,2%) | 3 (4,5%) |
| 9 (4+5) | 9 (18,4%) | 1 (1,5%) |

^a Porcentagem em relação ao total de pacientes com doença extraprostática (n=49);

^b Porcentagem em relação ao total de pacientes com doença intraprostática (n=66);

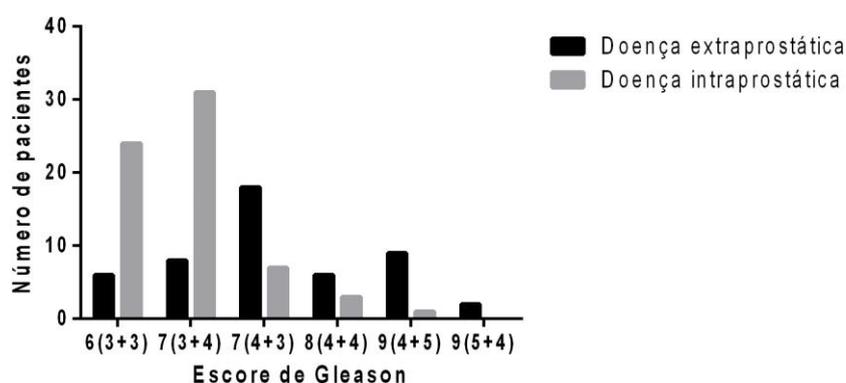


Figura 7. Correlação entre escore de Gleason e presença de doença extra e intraprostática. Teste exato de Fisher ($p < 0,0001$).

6.2 GENOTIPAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS LINHAGENS CELULARES LNCaP E C4-2B

A linhagem celular LNCaP já é um modelo alternativo para estudo de CaP metastático bem estabelecido sendo relatada, primeiramente, por Horoszewicz *et al.* (1980). Isolada a partir de um linfonodo supraclavicular de homem caucasiano, essas células de CaP metastático sensíveis a androgênios são bem descritas na literatura como portadoras da mutação AR-T878A (GADDIPATI *et al.*, 1994; MILLER *et al.*, 1992; SEIM *et al.*, 2017; SPANS *et al.*, 2014). A linhagem celular C4-2B é derivada, indiretamente, de células LNCaP. Oriunda de metástase óssea, as células da linhagem C4-2B são altamente metastáticas e independentes de androgênios (KATTA *et al.*, 2019; SPANS *et al.*, 2014; THALMANN *et al.*, 1994).

A genotipagem da mutação AR-T878A no gDNA das linhagens celulares foi realizada conforme descrito previamente, através do sistema de discriminação alélica TaqMan. Para a mutação AR-T878A, o alelo 1 correspondia à sequência normal do gene e foi marcado com o fluoróforo VIC, enquanto o alelo mutado, correspondente ao alelo 2, identificado com o fluoróforo FAM.

A análise da genotipagem foi feita através da verificação do sinal fluorescente para cada marcador (VIC ou FAM) ao final do experimento. Devido à atividade 5'-exonuclease da polimerase durante cada ciclo de amplificação de PCR, é possível inferir qual alelo está presente no gDNA de cada uma das amostras analisadas, uma vez que, de acordo com o sinal fluorescente gerado, pode-se distinguir se ocorreu

amplificação do alelo normal (amostra normal) ou do alelo mutado (mutada).

A genotipagem da mutação AR-T878A através do sistema TaqMan para as linhagens LNCaP e C4-2B indicou o aumento da fluorescência para o marcador FAM, somente. Logo, pode-se dizer que as linhagens celulares LNCaP e C4-2B analisadas neste estudo apresentam genótipo mutado para AR-T878A, conforme mostrado na Figura 8 e 9.



Figura 8. Genotipagem para LNCaP. Amostras em triplicata. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado.

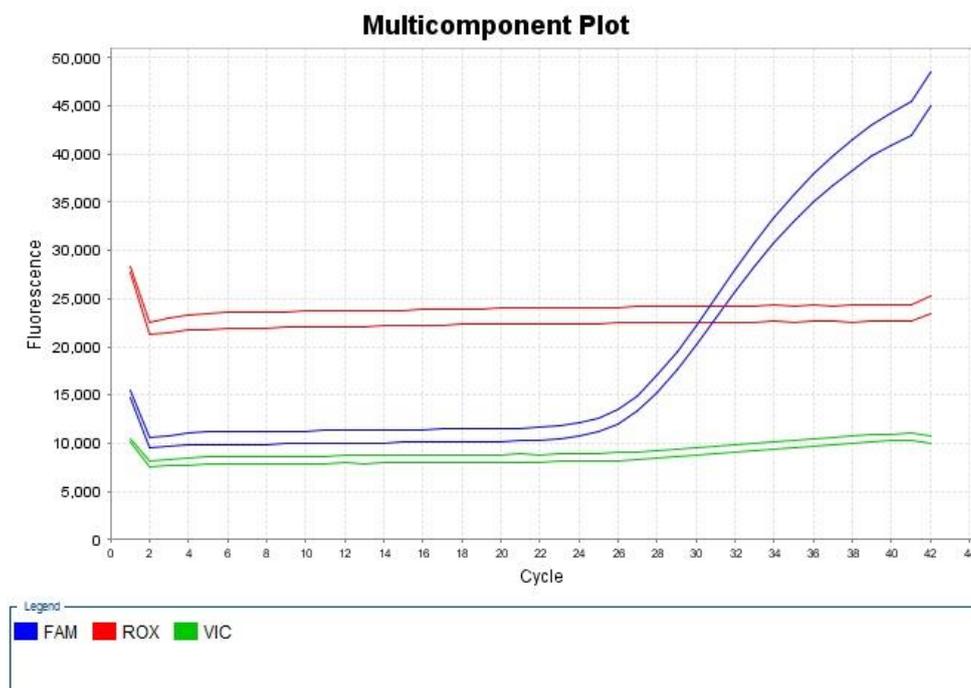


Figura 9. Genotipagem para C4-2B. Amostras em duplicata. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado.

Como é possível observar nas figuras 8 e 9, houve aumento apenas na fluorescência do marcador FAM para a triplicata de LNCaP utilizada e, também, para a linhagem C4-2B. O aumento do sinal fluorescente pode ser visto através do eixo Y do gráfico e relacionado a cada um dos ciclos que compõem a PCR (eixo X). Os resultados são obtidos durante a fase exponencial de amplificação da qPCR e, o aumento exclusivo do sinal do fluoróforo FAM nas genotipagens em questão permite concluir que o alelo presente no gDNA das linhagens celulares LNCaP e C4-2B é mutado para AR-T878A, caracterizando as amostras como mutadas.

Com o intuito de confirmar o resultado obtido através da genotipagem por TaqMan e poder utilizar o gDNA dessas linhagens celulares como controle positivo mutado para a mutação AR-T878A nos ensaios de genotipagem, foi realizado o sequenciamento pelo método de Sanger de produtos purificados de PCR do gDNA de LNCaP e de C4-2B, conforme descrito anteriormente.

O resultado do sequenciamento indicou que tanto a linhagem celular LNCaP, quanto a C4-2B são mutadas para AR-T878A, concordando com o resultado obtido pela genotipagem.

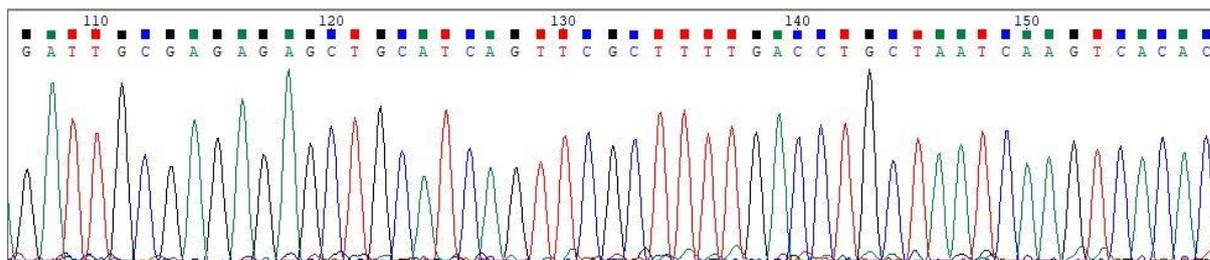


Figura 10. Sequenciamento pelo método de Sanger da linhagem celular LNCaP. Mutação na base 132 caracterizando a forma mutada AR-T878A.

A representação gráfica do sequenciamento do gDNA da linhagem celular LNCaP (Figura 10) evidencia a substituição da base A (adenina), na posição 132 do sequenciamento, por uma base G (guanina). Essa substituição pontual de bases nitrogenadas no éxon 8 do gene do receptor de androgênio caracteriza a mutação NG_009014.2 (AR_v001):c.2632 A>G, a qual afeta o aminoácido 878 e é comumente identificada como AR-T878A. Tendo a presença do alelo mutado no gDNA da linhagem LNCaP confirmada tanto pela genotipagem, quanto pelo sequenciamento, essa amostra foi utilizada como controle positivo mutado para AR-T878A nos demais ensaios de genotipagem por TaqMan realizados neste trabalho.

Da mesma forma, o sequenciamento da linhagem celular C4-2B (Figura 11) foi ao encontro do resultado obtido pela genotipagem previamente realizada. A substituição, na posição 129 do sequenciamento, da adenina por uma guanina indica a presença do alelo mutado no gDNA dessa linhagem celular. Logo, a existência desse SNP comprovado em ambos testes, genotipagem e sequenciamento, caracterizou a mutação AR-T878A e permitiu que amostras de gDNA da linhagem C4-2B também fossem utilizadas como controle positivo mutado, alternativamente às amostras de LNCaP, para ensaios de genotipagem de AR-T878A por TaqMan nas amostras de gDNA de leucócitos periféricos e de tecidos prostáticos avaliados.

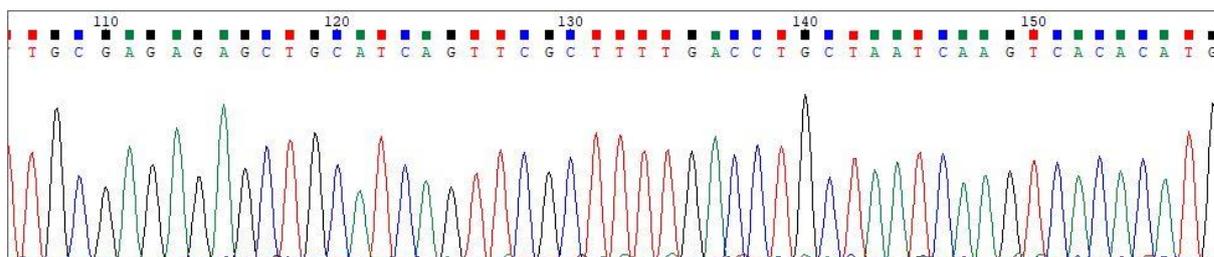


Figura 11. Sequenciamento pelo método de Sanger da linhagem celular C4-2B. Mutação na base 129 caracterizando a forma mutada AR-T878A.

6.3 CONSTRUÇÃO DE HETEROZIGOTOS ARTIFICIAIS PARA AR-T878A

A construção de heterozigotos artificiais para a mutação AR-T878A permite sua utilização como controle positivo durante os ensaios de genotipagem das amostras para a mutação em questão. Para tanto, utilizou-se o gDNA de amostras comprovadamente mutadas (LNCaP e C4-2B) e de uma amostra normal (TP907), conforme descrito previamente. Os resultados de sequenciamento das amostras mutadas utilizadas na construção do heterozigoto artificial para a mutação AR-T878A estão representados nas Figuras 10 e 11.

A amostra TP907 é gDNA extraído do tecido prostático de um participante do estudo que compõe o grupo CaP e tem o tumor classificado com o escore de Gleason 7(4+3). Essa amostra passou pelo ensaio de genotipagem sob as condições estabelecidas para a mutação AR-T878A e apresentou aumento do sinal fluorescente apenas para o alelo normal (sinalizado com o fluoróforo VIC), caracterizando-se como uma amostra normal para a mutação (Figura 12).

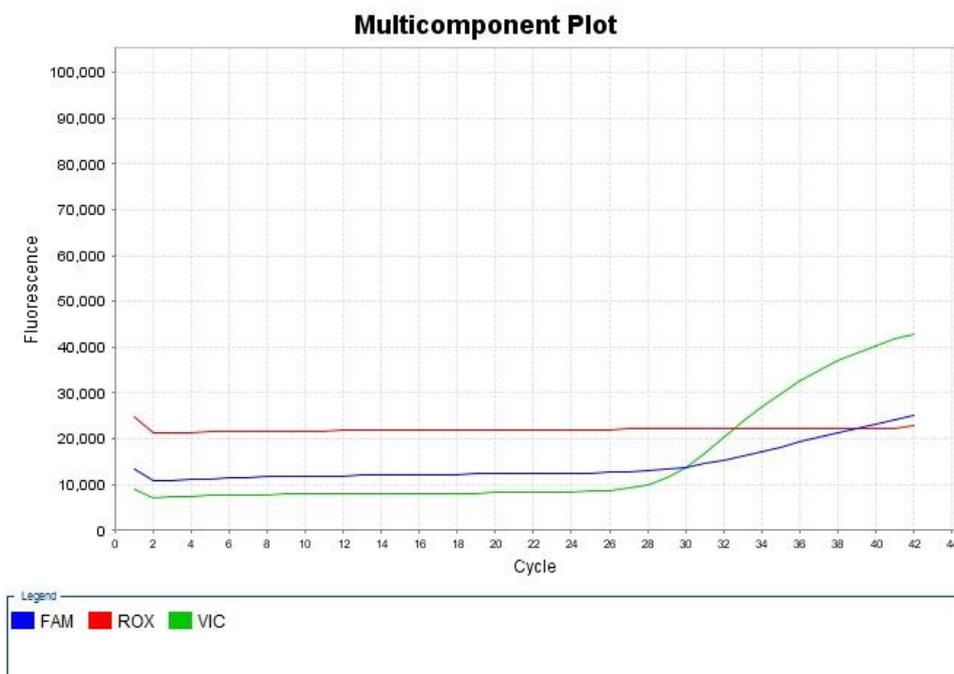


Figura 12. Genotipagem da amostra TP907 para mutação AR-T878A. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado.

Foram produzidos dois heterozigotos diferentes para a mutação AR-T878A, cada um deles empregando uma das linhagens celulares, resultando nos produtos 'Heterozigoto-LNCaP' e 'Heterozigoto-C4-2B'. A validação desses heterozigotos artificiais foi realizada, primeiramente, pela genotipagem por TaqMan e seguida por sequenciamento pelo método de Sanger

A genotipagem do Heterozigoto-LNCaP (Figura 13) resultou no aumento do sinal fluorescente tanto para o fluoróforo VIC, marcador do alelo normal, quanto para o fluoróforo FAM, marcador do alelo mutado do gene. Portanto, com base no ensaio de genotipagem por discriminação alélica, pode-se concluir que a construção do heterozigoto artificial utilizando gDNA da linhagem celular LNCaP e gDNA da amostra TP907 foi bem-sucedida e resultou em uma amostra heterozigota.

A validação do resultado obtido pela genotipagem para o Heterozigoto-LNCaP foi realizada através do sequenciamento pelo método de Sanger. O resultado do sequenciamento indicou que, na base 112, há a presença da base guanina e, também, da base adenina, conforme pode ser visto pelos dois picos de fluorescência correspondentes às bases nessa posição no cromatograma (Figura 14). Esse resultado indica a presença de ambos alelos, normal e mutado, no DNA e confirmou o genótipo do Heterozigoto-LNCaP encontrado pelo ensaio de TaqMan.

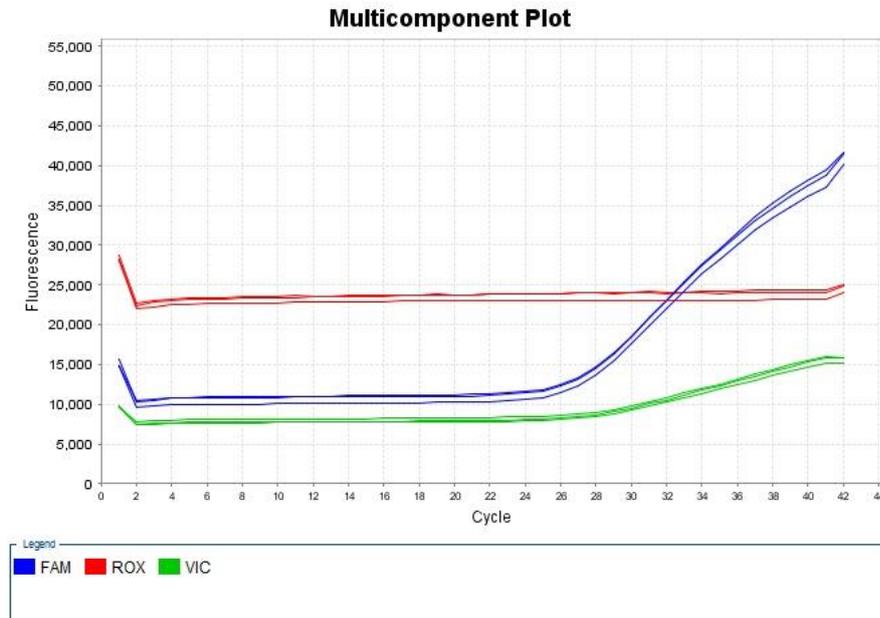


Figura 13. Genotipagem do Heterozigoto-LNCaP construído a partir de gDNA da linhagem celular LNCaP e da amostra TP907.

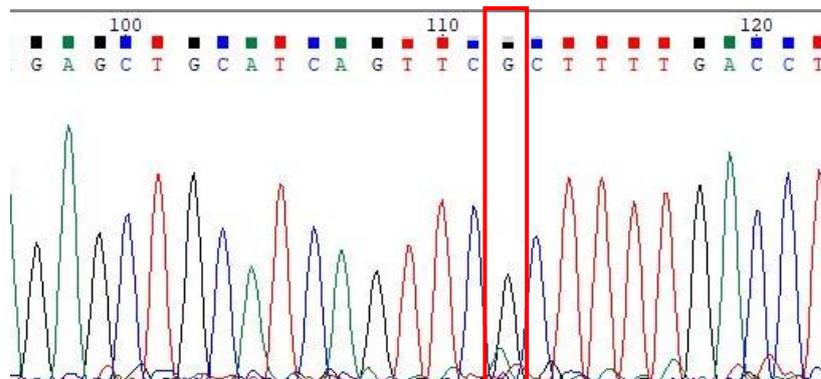


Figura 14. Sequenciamento pelo método de Sanger do Heterozigoto-LNCaP construído a partir de gDNA da linhagem celular LNCaP e da amostra TP907. Presença de dois picos fluorescentes na base 112 indicam heterozigose da amostra.

Heterozigoto-C4-2B, formado pelo gDNA da linhagem celular C4-2B e pelo gDNA da amostra TP907, passou pelas mesmas análises do Heterozigoto-LNCaP para confirmar o sucesso da construção deste segundo heterozigoto artificial. A reação de genotipagem feita pelo protocolo estabelecido para a mutação AR-T878A resultou em uma amostra heterozigota, uma vez que os sinais emitidos pelos fluoróforos VIC e FAM aumentaram consideravelmente ao longo dos ciclos do

ensaio (Figura 15). A confirmação deste genótipo foi feita pelo sequenciamento de Sanger, conforme demonstrado na Figura 16.

O resultado obtido pelo sequenciamento do Heterozigoto-C4-2B comprovou que a sequência elaborada com o gDNA da linhagem C4-2B e o gDNA da amostra TP907 é, de fato, heterozigota para a mutação AR-T878A, visto que na posição 117 do cromatograma há dois picos existentes: um que corresponde à base adenina (alelo normal) e outro correspondente à base guanina (alelo mutado).



Figura 15. Genotipagem do Heterozigoto-C4-2B construído a partir de gDNA da linhagem celular C4-2B e da amostra TP907.

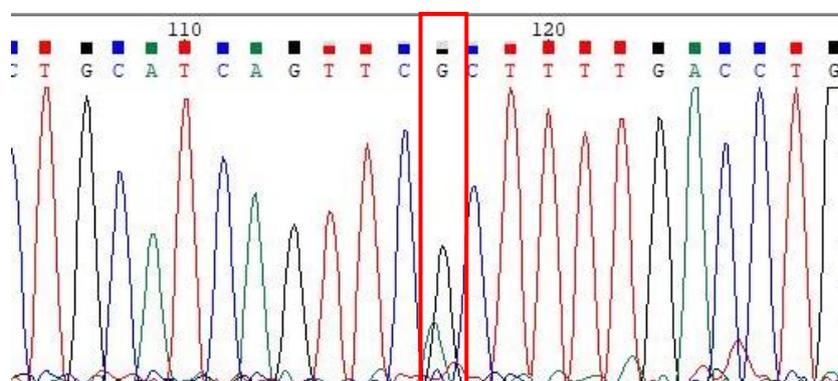


Figura 16. Sequenciamento pelo método de Sanger do Heterozigoto-C4-2B construído a partir de gDNA da linhagem celular C4-2B e da amostra TP907. Presença de dois picos fluorescentes na base 117 indicam heterozigose da amostra.

Embasado nos resultados obtidos, podemos dizer que a construção do Heterozigoto-LNCaP e do Heterozigoto-C4-2B foi efetiva para a obtenção de genótipos heterozigotos para a mutação AR-T878A, uma vez que ambos heterozigotos artificiais construídos tiveram seu genótipo comprovado e validado por ensaios de discriminação alélica TaqMan e sequenciamento pelo método de Sanger. Dessa forma, os heterozigotos artificiais construídos a partir de gDNA mutado e gDNA normal podem ser seguramente utilizados como controle positivo heterozigoto para a mutação AR-T878A nos ensaios de genotipagem das amostras desse estudo, fornecendo um importante padrão de comparação para os experimentos.

6.4 GENOTIPAGEM E SEQUENCIAMENTO PARA AS MUTAÇÕES AR-T878A E AR-Q784*

O presente trabalho envolveu 237 pacientes divididos em dois grandes grupos, HPB (n=118) e CaP (n=119). O gDNA extraído das amostras de sangue e de tecido prostático dos participantes foram genotipados para as duas mutações de interesse através de qPCR utilizando sondas TaqMan para discriminação alélica, conforme os protocolos específicos para cada mutação descritos anteriormente.

Os grupos amostrais foram compostos de acordo com a Figura 6, sendo que todos pacientes do grupo HPB possuíam amostras de TP e de sangue coletadas, enquanto apenas 68 integrantes do grupo CaP apresentaram os dois tipos de amostras. Ademais, 38 fragmentos de TP, inicialmente alocados no grupo CaP, tiveram o diagnóstico de CaP confirmado apenas na peça cirúrgica principal, e não no fragmento tumoral coletado para este estudo. Desse modo, o grupo “TP sem diagnóstico de CaP” foi estabelecido para diferenciar essas 38 amostras do grupo CaP, o qual todos fragmentos de TP utilizados tinham diagnóstico positivo para CaP. No total, o gDNA de 423 amostras, sendo 237 TPs e 186 amostras de sangue, foram processadas para genotipagem das mutações AR-T878A e AR-Q784*. A Figura 17 apresenta um esquema das amostras utilizadas na genotipagem.

Dentre essas amostras, houve quatro amostras de sangue que não amplificaram para nenhuma das duas mutações e uma amostra de TP e outras duas

de sangue não amplificaram para a mutação AR-T878A. Isso, provavelmente, se deve a degradações nas regiões do DNA que são específicas ao anelamento das sondas marcadas com fluoróforos e/ou dos primers durante a qPCR. Sendo assim, foi possível genotipar 416 amostras (236 TP e 180 sangue) para a mutação AR-T878A e 419 amostras (237 TP e 182 sangue) para a mutação AR-Q784*.

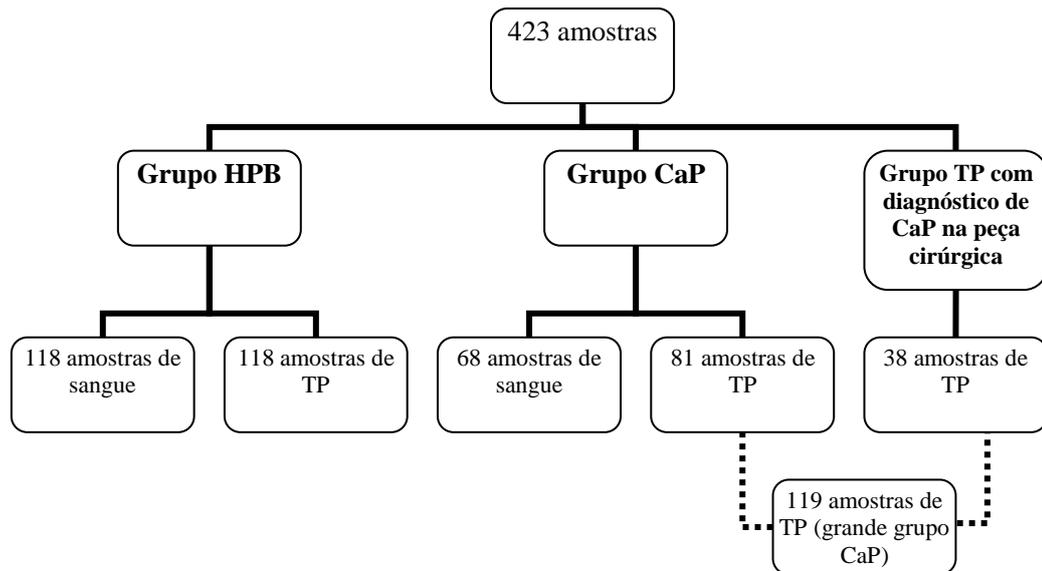


Figura 17. Representação esquemática dos grupos amostrais avaliados no estudo para a genotipagem das mutações AR-T878A e AR-Q784*.

Pela necessidade de possuir um controle positivo que apresentasse genótipo normal para ambas mutações estudadas, a amostra S1204 foi genotipada e apresentou as regiões do DNA envolvidas com as formas AR-T878A e AR-Q784* sequenciadas pelo método de Sanger. O gDNA da amostra S1204 foi extraído de leucócitos periféricos de um paciente, de 70 anos de idade e autodeclarado branco, do grupo HPB.

As genotipagens por TaqMan da amostra S1204 para as mutações AR-T878A e AR-Q784* indicaram a existência de genótipo normal para ambos SNPs, pois, houve aumento do sinal fluorescente apenas para o fluoróforo VIC, o qual corresponde ao alelo normal das mutações AR-T878A e AR-Q784* (Figura 18 e 19). O sequenciamento pelo método de Sanger foi realizado para certificar os resultados das genotipagens e garantir o uso dessa amostra como controle positivo normal nos ensaios TaqMan de discriminação alélica.

O resultado do sequenciamento da amostra S1204 para a mutação AR-

T878A, apresenta a base nitrogenada adenina (base 132 do sequenciamento) na posição c.2632 do gene do receptor de androgênio (Figura 20). Logo, o resultado do sequenciamento é concordante com o resultado da genotipagem e conclui-se que a amostra S1204 é normal para a mutação AR-T878A, podendo ser empregada como controle positivo normal nas reações de genotipagem por TaqMan para essa mutação.

Da mesma forma, os resultados de genotipagem e sequenciamento da amostra S1204 para a mutação AR-Q784* corroboraram entre si e revelaram o genótipo normal da amostra. O resultado do sequenciamento ratificou o resultado da genotipagem por discriminação alélica (Figura 19) quando comprovou a presença da base nitrogenada citosina na posição c.2350 do gene do receptor de androgênio, representada pela base de número 451 no cromatograma (Figura 21). Por conseguinte, a amostra S1204 também serve como controle positivo normal para ensaios de genotipagem para a mutação AR-Q784*.



Figura 18. Genotipagem da amostra S1204 para mutação AR-T878A. Amostras em duplicata. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado.



Figura 19. Genotipagem da amostra S1204 para mutação AR-Q784*. Amostras em duplicata. VIC= alelo normal. FAM= alelo mutado.

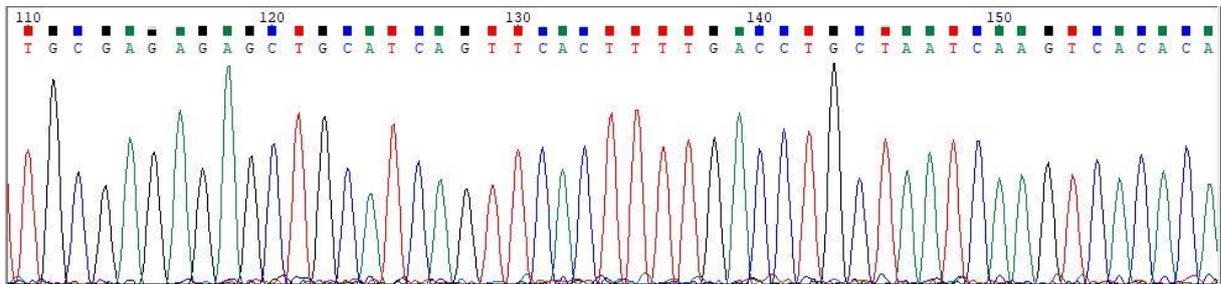


Figura 20. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra S1204 para mutação AR-T878A. Presença de adenina na base 132 caracterizando a forma normal de AR-T878A.

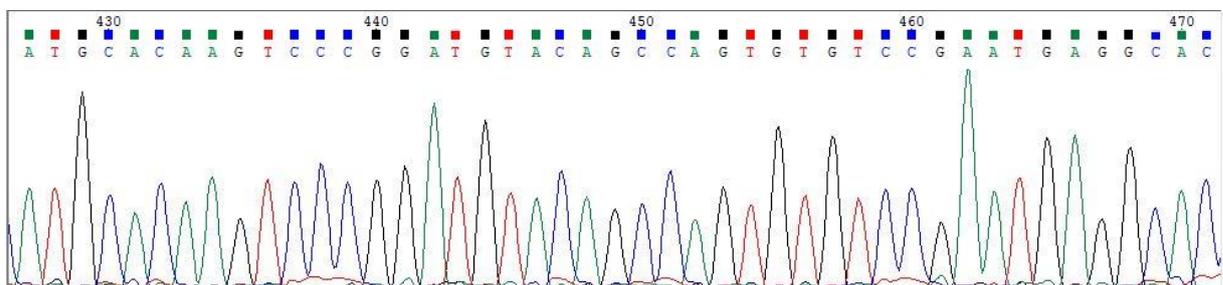


Figura 21. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra S1204 para mutação AR-Q784*. Presença de citosina na base 451 caracterizando a forma normal de AR-Q784*.

O gráfico de distribuição alélica gerado após ensaios de genotipagem por discriminação alélica utilizando sondas TaqMan é formado, em seu eixo Y, por valores correspondentes ao sinal fluorescente emitido pelo fluoróforo FAM, ao passo

que o eixo X apresenta valores relacionados ao sinal emitido pelo fluoróforo VIC. Dessa maneira, amostras que são distribuídas na região inferior e à direita do gráfico apresentam um genótipo normal, visto que apenas o alelo marcado com VIC é amplificado e, conseqüentemente, aumentando a fluorescência associada. Amostras distribuídas no canto superior esquerdo do gráfico de distribuição alélica são compostas por alelos mutados, já que não há sinal fluorescente para VIC, à medida que amostras heterozigotas são representadas na região intermediária entre o canto inferior direito e superior esquerdo, porque há aumento da fluorescência para o alelo VIC e para o alelo FAM também (Figura 22).

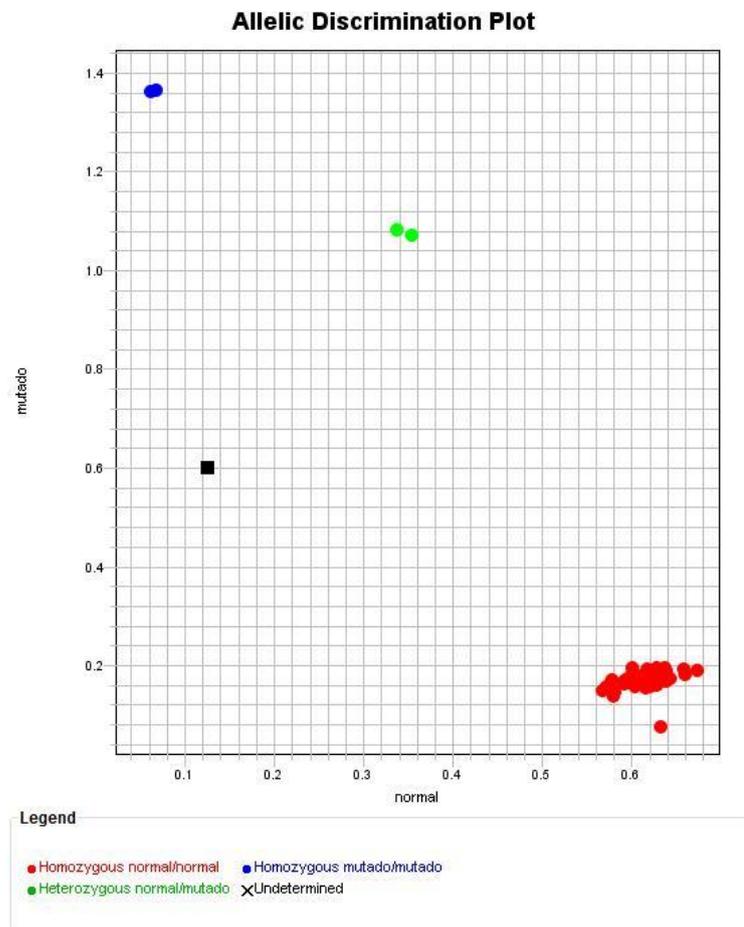


Figura 22. Gráfico de discriminação alélica. Pontos azuis= genótipo mutado; pontos vermelhos= genótipo normal; pontos verdes= genótipos heterozigotos.

Os ensaios de genotipagem para a mutação AR-T878A contavam com dois controles positivos mutados, os gDNAs das linhagens celulares LNCaP e C4-2B, e dois diferentes controles positivos heterozigotos (Heterozigoto-LNCaP e

Heterozigoto-C4-2B), construídos artificialmente como relatado precedentemente. Isto posto, somado à utilização do controle positivo normal fornecido pela amostra S1204, as 416 amostras testadas para o genótipo da mutação AR-T878A eram facilmente distribuídas no gráfico de distribuição alélica, baseado nos resultados de aumento do sinal fluorescente durante a reação.

Todas as amostras de tecido prostático (n=236) e de sangue (n=180) avaliadas nos ensaios de genotipagem pelo sistema TaqMan apresentaram genótipo normal para a mutação AR-T878A, independentemente de pertencer ao grupo HPB, CaP ou TP oriundo de peça cirúrgica com diagnóstico de CaP. Os resultados obtidos nas reações de genotipagem das amostras testadas mostraram amplificação apenas do sinal fluorescente emitido pelo fluoróforo VIC, similar ao perfil de amplificação da amostra S1204, e, no gráfico de distribuição alélica, as amostras agruparam-se na região inferior direita (Figura 23).

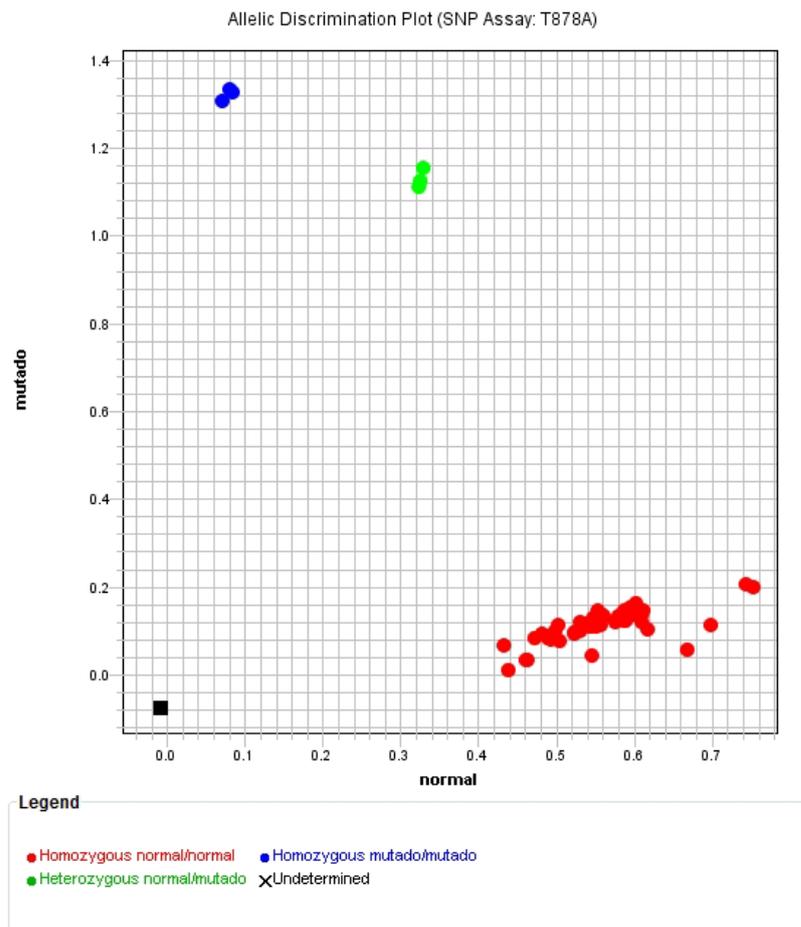


Figura 23. Gráfico de distribuição alélica resultante da genotipagem para a mutação AR-T878A de 61 amostras. Pontos vermelhos= genótipo normal; pontos verdes= genótipo heterozigoto; pontos azuis= genótipo mutado.

Em cada ensaio foi utilizada triplicata de controle positivo normal (S1204), para a mutação (LNCaP ou C4-2B) e controle heterozigoto (Heterozigoto-LNCaP ou Heterozigoto-C4-2B). Na Figura 23 pode-se perceber que apenas as amostras utilizadas como controle positivo mutado e positivo heterozigoto foram classificadas com genótipo mutado (pontos azuis no gráfico de discriminação alélica) e com genótipo heterozigoto normal/mutado (pontos verdes indicados no gráfico abaixo), respectivamente.

A fim de validar os resultados obtidos através dos ensaios de genotipagem, a amostra TP920 foi purificada e sequenciada pelo método de Sanger. Essa amostra é originada de um paciente diagnosticado com HPB, autodeclarado preto e que fazia tratamento medicamentoso com doxazosina e finasterida anteriormente à cirurgia. O resultado do sequenciamento, mais uma vez, ratificou o genótipo normal encontrado no ensaio de genotipagem para a mutação AR-T878A. A presença da base adenina na base 116 do cromatograma (Figura 24) comprova o genótipo normal (sequência selvagem ACT) para a mutação AR-T878A da amostra TP920.

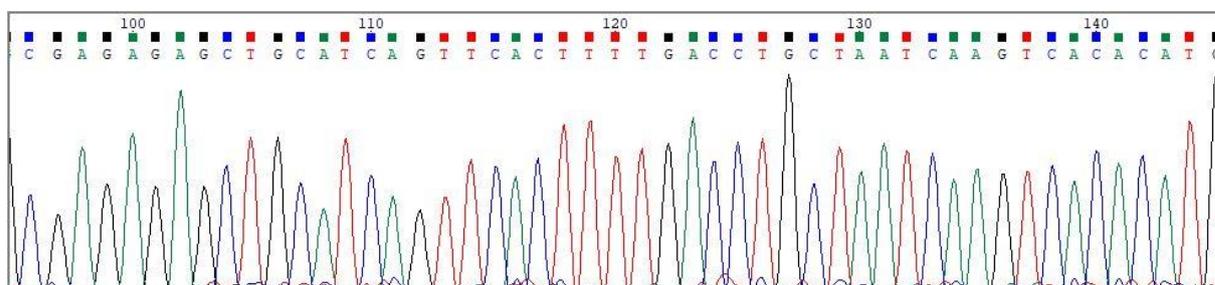


Figura 24. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra TP920 para mutação AR-T878A. Presença de adenina na base 116 caracterizando a forma normal de AR-T878A.

Para servir como controle positivo mutado da forma AR-Q784*, quatro diferentes linhagens celulares (LNCaP, C4-2B, DU145 e CWR22RV1) foram testadas nos ensaios de genotipagem por TaqMan, porém, todas apresentaram genótipo normal. Portanto, a genotipagem das 419 amostras para a mutação AR-Q784* contou apenas com um controle positivo normal, formado pela amostra S1204 que, como já exposto, teve seu genótipo confirmado tanto por genotipagem quanto por sequenciamento.

Os resultados da genotipagem da mutação AR-Q784* nas amostras de TP (n=237) e de sangue (n=182) demonstraram que todas amostras possuem alelos normais, ou seja, possuem o genótipo normal, independente do grupo ao qual as

amostras pertenciam (HPB, CaP ou TP sem diagnóstico de CaP). Para todas elas, o aumento da fluorescência foi visto somente para o fluoróforo VIC ao longo da qPCR. O mesmo padrão de sinal fluorescente apresentado pelas amostras foi visto na amostra S1204, utilizada como controle positivo normal. No gráfico de distribuição alélica, as amostras de TP e de sangue genotipadas para AR-Q784* dispuseram-se no canto inferior direito, em torno da amostra S1204, uma vez que apenas a fluorescência do VIC foi detectada (Figura 25).

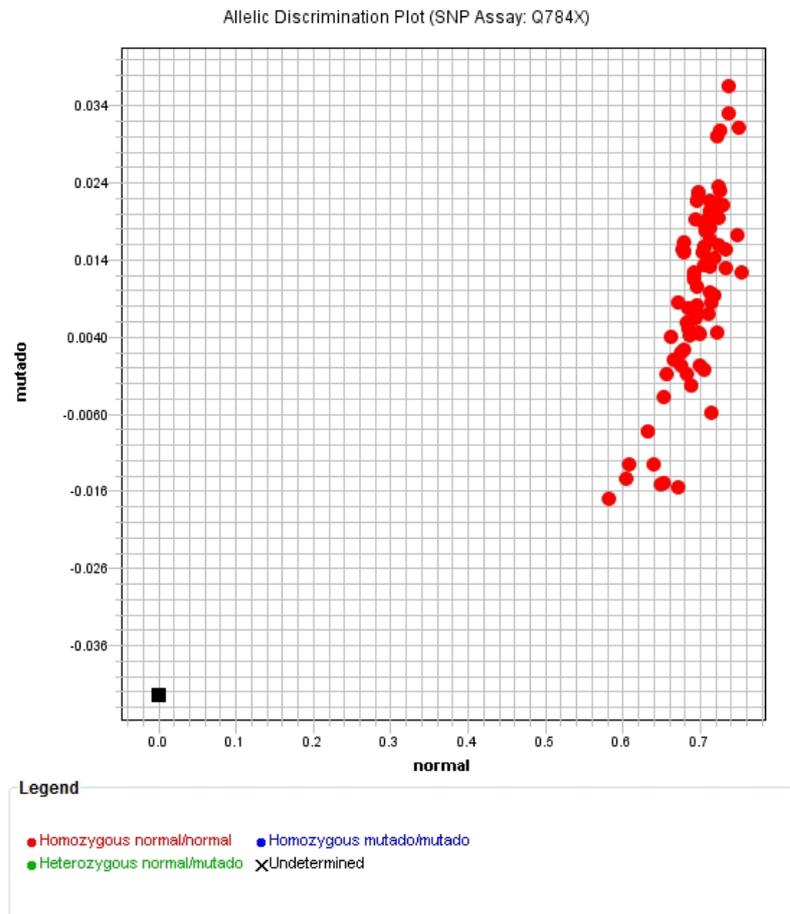


Figura 25. Gráfico de distribuição alélica resultante da genotipagem para a mutação AR-Q784* de 80 amostras. Pontos vermelhos= genótipo normal; pontos verdes= genótipo heterozigoto; pontos azuis= genótipo mutado.

O sequenciamento pelo método de Sanger foi realizado para a mutação AR-Q784* em duas amostras genotipadas pelo sistema TaqMan para confirmar o genótipo detectado. Uma amostra era TP755, gDNA oriundo de tecido prostático de um paciente pertencente ao grupo HPB, com 66 anos de idade no momento da

cirurgia, autodeclarado branco e que não utilizava nenhum tipo de tratamento prévio. A outra amostra escolhida para ser sequenciada foi a S1212, uma amostra de sangue coletada de paciente com CaP Gleason 7(3+4), 65 anos, autodeclarado branco e que não realizava nenhum tratamento farmacológico anteriormente à cirurgia.

O sequenciamento confirmou, para ambas amostras, o genótipo normal, visto que foi detectada a presença da base citosina na base 450 do cromatograma da amostra TP755 (Figura 26) e na base de número 443 da amostra S1212 (Figura 27). A presença da citosina na posição c.2350 dessas amostras corresponde ao alelo selvagem (sequência CAG) da mutação AR-Q784*. Assim sendo, o resultado do teste de genotipagem por sistema TaqMan, que detectou o genótipo normal nas 419 amostras analisadas para a mutação AR-Q784*, foi validado pelo resultado do sequenciamento pelo método de Sanger.

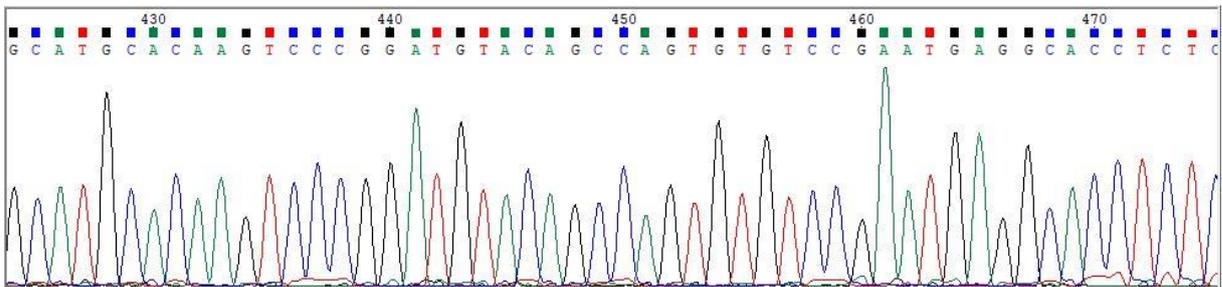


Figura 26. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra TP755 para mutação AR-Q784*. Presença de citosina na base 450 caracterizando a forma normal de AR-Q784*.

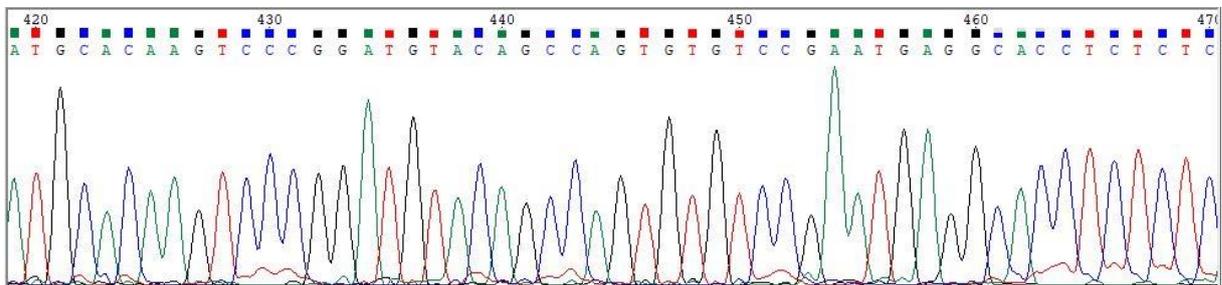


Figura 27. Sequenciamento pelo método de Sanger da amostra S1212 para mutação AR-Q784*. Presença de citosina na base 443 caracterizando a forma normal de AR-Q784*.

7. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de doenças da próstata está altamente relacionado com o avanço da idade do paciente e com o eixo de sinalização androgênica. Cerca de 80% dos homens acima dos 50 anos de idade apresentam algum tipo de doença prostática, sendo que as duas mais comuns são o CaP e a HPB. Segundo dados do Datasus, no último ano foram registradas 58.280 internações hospitalares para o manejo de doenças da próstata, sendo que a maioria dessas internações (37.020) são para atendimento de pacientes com CaP (Ministério da Saúde, 2019). O presente trabalho busca contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de tumores primários de próstata através da descrição da frequência de duas mutações no receptor de androgênio, AR-T878A e AR-Q784*, em uma amostra de pacientes do Rio Grande do Sul. Mutações no receptor de androgênio têm sido descritas como importantes fatores no desenvolvimento de resistência tumoral ao tratamento, principalmente, antiandrogênico (JERNBERG *et al.*, 2017), mas, até o momento, a literatura não traz informações sobre a presença dessas mutações em tumores primários e HPB.

Os participantes foram recrutados do Serviço de Urologia do HCPA e divididos entre o grupo CaP ou HPB, de acordo com o diagnóstico clínico. A idade dos pacientes ao momento do diagnóstico não diferiu significativamente entre os grupos e foi superior a 65 anos de idade, corroborando com dados epidemiológicos que indicam maior incidência de tumores prostáticos em homens da terceira idade. A pequena diferença de idade entre pacientes do grupo HPB e do grupo CaP, embora não significativa, pode estar relacionada ao fato de que a intervenção cirúrgica para HPB não é a primeira opção de tratamento, ou seja, só é realizada após tentativas de tratamentos farmacológicos que não apresentaram resultados satisfatórios (DANIYAL *et al.*, 2014; HILLEBRAND *et al.*, 2018b; HUANG *et al.*, 2019; INCA, 2019; MEIKLE *et al.*, 1999).

O PSA é uma glicoproteína secretada pela próstata e é utilizado como importante marcador na detecção e monitorização de tumores prostáticos. Muitos casos de CaP são diagnosticados precocemente graças à utilização da dosagem de PSA como teste de triagem e, também, há evidências da correlação entre níveis mais elevados de PSA e existência de câncer extraprostático (CALVETE *et al.*,

2003; DANİYAL *et al.*, 2014; PEZARO; WOO; DAVIS, 2014; RHODEN, 2010; TILKI *et al.*, 2016). Apesar dos níveis de PSA poderem estar elevados ($>4,0$ ng/dL) em condições não neoplásicas, como HPB e prostatites, o nível do PSA pré-operatório dos pacientes que pertenciam ao grupo CaP mostrou-se significativamente maior quando comparado ao grupo HPB, igualmente ao que já foi relatado por outros trabalhos (BIOLCHI; KOFF; BRUM, 2012; HILLEBRAND *et al.*, 2018b; ZAMBRA *et al.*, 2016).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de próstata, a origem étnica dos pacientes tem-se mostrado um aspecto bastante relevante. É bem descrito que homens afro-americanos possuem maior susceptibilidade ao CaP e, também, a tumores mais agressivos e de maior volume. Evidências apontam que mutações somáticas no receptor de androgênio durante CaP primário acometem mais frequentemente os pacientes afrodescendentes, e essa poderia ser a explicação da incidência desigual do CaP entre as raças (DANIYAL *et al.*, 2014; KOOCHKPOUR, 2010; ZHOU *et al.*, 2016). Nosso estudo demonstrou o predomínio de homens autodeclarados brancos em ambos grupos e que os indivíduos categorizados como pretos ou pardos estavam homoganeamente distribuídos entre o grupo CaP e o grupo HPB. A estruturação dos grupos avaliados em relação à cor ou raça dos pacientes representa a população do Rio Grande do Sul, composta majoritariamente por habitantes brancos de ancestralidade europeia, sendo que, algumas comunidades do estado podem apresentar até 97% de contribuição europeia na formação de sua população (MARRERO *et al.*, 2005; PENA *et al.*, 2011).

A fisiopatologia das doenças proliferativas da próstata, como CaP e HPB, está associada à atividade de hormônios androgênicos e ao seu receptor nuclear específico, o AR. A ligação dos androgênios ao seu receptor induz alterações na transcrição de genes envolvidos no crescimento e sobrevivências das células prostáticas e na produção do PSA. Isso se deve ao fato do AR ser um fator de transcrição que, quando ativado pelos androgênios, sofre uma série de alterações conformacionais que permitem a sua translocação para o núcleo. Então, o AR ativado se liga aos elementos responsivos a androgênios (ARE) e desencadeia seus efeitos como fator de transcrição (BRUM; SPRITZER; BRENTANI, 2005; JERNBERG *et al.*, 2017; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016).

A DHT é o androgênio que apresenta maior afinidade de ligação ao AR, logo, tem papel fundamental no desenvolvimento normal e patológico da próstata. Esse hormônio é formado a partir da conversão da testosterona pela enzima 5- α -redutase, localizada nos tecidos que compõem a glândula prostática, e tem importante papel na virilização da genitália externa masculina e desenvolvimento das características sexuais secundárias. Apesar de menos potente, a testosterona também é capaz de se ligar ao AR e controlar a transcrição de genes envolvidos no ciclo celular e metabolismo das células prostáticas. Por isso, é convencionalizado que a progressão do CaP e da HPB são controlados, principalmente, pela testosterona e DHT (CUNHA *et al.*, 2019; HACKEL *et al.*, 2005; MUNKLEY *et al.*, 2019; RAJAN *et al.*, 2011).

Embasados nos mecanismos biológicos e moleculares da patogênese da HPB, tratamentos farmacológicos foram desenvolvidos e são utilizados como primeira opção terapêutica, uma vez que a cirurgia para remoção de nódulos prostáticos benignos é indicada após falhas de terapias medicamentosas. Existem, atualmente, diversos fármacos para tratamento da sintomatologia e progressão da HPB, como, por exemplo: alfabloqueadores, inibidores da enzima 5- α -redutase, antimuscarínicos, agonistas β_3 , inibidores da fosfodiesterase tipo 5 e opções de terapia combinada entre duas das classes listadas (DORNAS; DAMIÃO; CARRERETTE, 2010; HUANG *et al.*, 2019; SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2016).

Nossos resultados mostraram que 67,8% dos pacientes diagnosticados com HPB faziam uso de terapia medicamentosa antes de submeterem-se à cirurgia. A maioria desses pacientes realizava uma terapia combinada entre fármaco alfabloqueador (doxazosina) e inibidor da enzima 5- α -redutase (finasterida). Essa abordagem medicamentosa é bastante efetiva e utilizada mundialmente, pois, a ação alfabloqueadora reduz significativamente os sintomas relacionados à HPB enquanto a inibição da enzima 5- α -redutase evita a proliferação de células epiteliais prostáticas e, conseqüentemente, a progressão da doença. A terapia combinada é mais efetiva para o tratamento da HPB do que qualquer outra terapia isolada, visto que o uso isolado de alfabloqueadores, como a doxazosina, não impede o crescimento contínuo da próstata e, por outro lado, a administração de inibidor da enzima 5- α -redutase, isoladamente, necessita um longo período terapêutico para

apresentar melhoras nos sintomas dos pacientes, o que reflete na qualidade de vida desses homens (BAIG *et al.*, 2019; HELFAND *et al.*, 2013; HUANG *et al.*, 2019; PALMA; CAICEDO, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2016).

Enquanto a maioria dos pacientes do grupo HPB realizavam algum tipo de terapia medicamentosa, menos de 30% dos integrantes do grupo CaP faziam uso de medicamentos previamente à cirurgia. Isso pode ser devido ao fato de que as opções atuais de tratamento para CaP localizado ou com invasão regional priorizam a intervenção cirúrgica, geralmente associada com radioterapia, enquanto que tratamentos com fármacos antiandrogênicos são restritos para uso em pacientes com CaP metastático avançado, tendo em vista o risco de progressão do tumor para o estado resistente à castração (INCA, 2019; JERNBERG *et al.*, 2017; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; SUZUKI *et al.*, 2019). A maior parte dos pacientes que compõem o grupo CaP possuem tumores com escore de Gleason 7(3+4) e não apresentam doença extraprostática, achados que corroboram com dados já publicados, uma vez que a presença de invasão extraprostática parece estar relacionada com tumores de alto grau (CALVETE *et al.*, 2003; INCA, 2002).

As técnicas cirúrgicas disponíveis para tratamento de CaP incluem a RTU, prostatectomia (simples ou radical) e prostatovesiculectomia. O maior objetivo é a remoção da próstata, ou parte dela, das vesículas seminais e margens glandulares que possam estar afetadas pelas células tumorais, além da melhora dos sintomas do trato urinário inferior que, geralmente, afetam os pacientes. Essa abordagem terapêutica mostra-se efetiva na redução dos níveis de PSA e apresenta baixa taxa de complicações ou mortalidade associada, consolidando-se como principal opção de tratamento para pacientes com tumor prostático localizado ou regionalmente avançado, características presentes em grande parte da população avaliada nesse estudo (DANIYAL *et al.*, 2014; ROJAS-MANRIQUE *et al.*, 2019). Apenas um paciente do grupo CaP realizava terapia de ablação androgênica com o uso de acetato de abiraterona previamente à cirurgia. Entretanto, os dados clínicos desse paciente eram peculiares, pois ele era diagnosticado com metástase óssea e tumor de alto grau (escore de Gleason 8), e condizentes com a abordagem terapêutica utilizada.

A terapia de privação androgênica é o tratamento de escolha para pacientes com CaP metastático avançado, principalmente quando a metástase atinge os

ossos, ou com recidiva bioquímica do tumor. A castração química induzida pelos fármacos utilizados em ADT é resultado da diminuição nos níveis séricos de testosterona e visa diminuir o crescimento do tecido tumoral prostático regulado pela atividade do AR, uma vez que os hormônios androgênicos (DHT e testosterona, principalmente) e seu receptor são peça central no desenvolvimento e progressão do CaP. O mecanismo de ação responsável por suprimir a ação do AR nesses pacientes depende do fármaco utilizado, sendo que os mais usados são antagonistas do AR, a enzatulamida, por exemplo, ou inibidores da enzima CYP17A1 (envolvida na síntese de testosterona), como o acetato de abiraterona (JERNBERG *et al.*, 2017; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016; MUNKLEY *et al.*, 2018; SUZUKI *et al.*, 2019; TILKI *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2019).

Inicialmente os pacientes respondem bem à ADT e há uma remissão significativa do CaP, entretanto, depois de 2 a 3 anos, as células tumorais progredem para o estágio de resistência à castração química, definido como CRPC, e não respondem mais ao tratamento antiandrogênico. Essa forma do CaP é altamente letal e ocorre, entre demais razões, por mutações desenvolvidas no gene do AR que permitem sua ativação independentemente dos baixos níveis de androgênios presente nesses pacientes tratados. A mutação AR-T878A é a primeira, e mais frequente, mutação pontual originada pelo uso de fármacos antiandrogênicos descrita (GADDIPATI *et al.*, 1994; JERNBERG *et al.*, 2017; MUNKLEY *et al.*, 2019; SHIM *et al.*, 2019).

Entre as 168 mutações no gene do AR que estão associadas ao CaP, a mutação AR-T878A tem origem somática e grande relevância clínica pois é encontrada em, aproximadamente, um terço dos pacientes CRPC. Essa forma do AR é resultado de uma mutação *missense* em que há a troca de um aminoácido treonina por uma alanina no códon 878 no gene do AR, afetando a conformação do domínio de ligação ao ligante do receptor (GOTTLIEB, 2013; KITA *et al.*, 2018; LIVERMORE; MUNKLEY; ELLIOTT, 2016). Estudos indicam que a mutação AR-T878A aparece após um certo período de tratamento com flutamida, enzatulamida e acetato de abiraterona, sendo que os dois primeiros são fármacos antagonistas de AR enquanto o último é inibidor da biossíntese de androgênios, medicamentos largamente utilizados em ADT. A modificação no tamanho do domínio de ligação ao ligante causada pela mutação T878A torna o AR estimulável por outros ligantes,

como a progesterona e estrogênio, que em condições fisiológicas teriam baixa afinidade pelo AR, e por fármacos que, originalmente, são antagonistas do AR, como flutamida, enzatulamida e apalutamida, mas, na forma mutada, apresentam ação agonista. Ou seja, a mutação AR-T878A oferece diversos mecanismos de reativação do eixo de sinalização do AR e, conseqüentemente, a resistência aos tratamentos de castração (CHEN *et al.*, 2015; JERNBERG *et al.*, 2017; PREKOVIC *et al.*, 2016; RATHKOPF *et al.*, 2017; V FIANDALO; WU; L MOHLER, 2013).

É sabido que a linhagem celular LNCaP carrega em seu genoma a mutação AR-T878A. LNCaP é uma linhagem celular de câncer de próstata metastático estabelecida como importante ferramenta para estudos do CaP por Horoszewicz *et al.* Essa linhagem é derivada de células tumorais metastáticas aspiradas de um linfonodo supraclavicular de paciente que desenvolveu resistência ao tratamento de ablação androgênica e seu crescimento é dependente de androgênios (GADDIPATI *et al.*, 1994; HOROSZEWICZ *et al.*, 1980; MILLER *et al.*, 1992; PREKOVIC *et al.*, 2016; SEIM *et al.*, 2017; SPANS *et al.*, 2014). A partir de células da linhagem LNCaP inoculadas em ratos castrados foi possível obter, indiretamente, a linhagem celular C4-2B derivada de metástases ósseas. Diferentemente da LNCaP, a linhagem C4-2B é independente de androgênios (KATTA *et al.*, 2019; SPANS *et al.*, 2014; THALMANN *et al.*, 1994). No presente estudo, ambas linhagens celulares foram avaliadas para verificar a presença das mutações AR-T878A e AR-Q784* através da genotipagem por discriminação alélica e sequenciamento pelo método de Sanger. Nosso resultado corroborou com a literatura já existente visto que encontramos a mutação AR-T878A na linhagem LNCaP e, além disso, a linhagem celular C4-2B também apresentou genótipo mutado para a forma T878A do AR. Não foi encontrada a mutação AR-Q784* nessas duas linhagens celulares e em nenhuma das outras duas testadas (DU145 e CWR22RV1). Com base nessas evidências, gDNA de LNCaP e de C4-2B foram utilizados como controles positivos para a mutação AR-T878A nos ensaios de genotipagem por TaqMan realizados neste estudo.

Considerando as evidências já apresentadas a respeito das mutações pontuais no AR, seus impactos na progressão e no prognóstico do CaP e o constante aumento da incidência dessa neoplasia na população brasileira, o presente estudo buscou descrever a frequências de duas mutações, AR-T878A e

AR-Q784*, em uma amostra da população masculina do estado do Rio Grande do Sul. Os participantes foram divididos nos grupos CaP e HPB, de acordo com o diagnóstico; ainda, o grupo CaP foi subdividido pela presença, ou não, de tumor maligno no fragmento coletado para uso nessa pesquisa. A genotipagem da população estudada para as mutações AR-T878A e AR-Q784* foi realizada através da discriminação alélica pelo sistema TaqMan. Embora pacientes com diagnóstico de CaP metastático e, um deles, em uso de acetato de abiraterona (fármaco inibidor da CYP17A1 utilizado em ADT) estivessem no rol de participantes, não foram encontradas as mutações AR-T878A e AR-Q784* no gDNA das amostras de sangue e de tecido prostático de nenhum dos integrantes dos grupos avaliados.

Esse tipo de estudo é pioneiro no estado e no País, pois, não existem ainda dados sobre a frequência de mutações no gene do AR em pacientes com CaP primário ou, com CRPC. Os resultados aqui apresentados podem indicar que as duas mutações testadas, principalmente a AR-T878A que já é mais bem descrita, são bastante raras na população do RS. A amostra de pacientes que utilizamos é proveniente de um hospital-escola referência para o tratamento do câncer, tendo uma boa representatividade, embora tenhamos uma maior frequência de pacientes da região metropolitana de Porto Alegre, capital do Estado (CHEN *et al.*, 2015; GADDIPATI *et al.*, 1994). Porém, é preciso cautela para interpretar os dados obtidos e considerar que a maioria dos pacientes com CaP apresentavam escore de Gleason igual ou inferior a 7(3+4), que está fracamente relacionado com doença extraprostática, e apenas um participante fazia tratamento para CaP com acetato de abiraterona, um importante indutor de mutações no AR que levam à resistência terapêutica (CALVETE *et al.*, 2003; KITA *et al.*, 2018; NISHIMOTO *et al.*, 2008; PREKOVIC *et al.*, 2016; SRIBUDIANI *et al.*, 2018). Estudos complementares, envolvendo diferentes regiões do Estado ou do País, no âmbito descritivo dessas frequências devem ser realizados, considerando a inclusão de mais pacientes com CaP metastático e/ou uso de ADT.

Por outro lado, deve-se considerar que os dados disponíveis sobre a frequência da mutação AR-T878A avaliam, principalmente, populações dos Estados Unidos, Canadá e Japão (CHEN *et al.*, 2015; GADDIPATI *et al.*, 1994; LALLOUS *et al.*, 2016; SUZUKI *et al.*, 1993). O estudo de Han *et al.*, único disponível na literatura que descreve a mutação AR-Q784*, também não inclui pacientes brasileiros (HAN *et*

al., 2017). O Brasil é um país bastante miscigenado e com uma das populações mais variadas do mundo, visto que resulta do cruzamento de três etnias diferentes, Europeus, Africanos e de povos Indígenas do Brasil, ao longo dos últimos 5 séculos e sabe-se que a predisposição das populações a doenças e frequências alélicas diferem de acordo com a ancestralidade genética e adaptações ao local e clima (PARRA *et al.*, 2003; PENA *et al.*, 2011; SCHWANKE *et al.*, 2007). Em vista disso, os resultados de nosso trabalho com pacientes do RS são pertinentes, contribuindo com a literatura que carece dessas informações. Outros estudos precisam ser realizados para que o perfil genotípico das principais mutações relacionadas ao desenvolvimento do câncer e resistência terapêutica em homens do RS com CaP seja descrito com maior precisão.

8. CONCLUSÃO

As mutações do receptor de androgênios AR-T878A e AR-Q784* não foram identificadas na amostra avaliada de pacientes do Rio Grande do Sul diagnosticados com hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata.

Os resultados foram concordantes entre o genótipo das amostras avaliadas em leucócitos de sangue periférico e de tecido prostático para ambas as mutações em pacientes com CaP e HPB.

REFERÊNCIAS

- AZOITEI, A. *et al.* C-terminally truncated constitutively active androgen receptor variants and their biologic and clinical significance in castration-resistant prostate cancer. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 166, p. 38-44, 2017.
- BAIG, M. S. *et al.* Finasteride-Induced Inhibition of 5 α -Reductase Type 2 Could Lead to Kidney Damage- Animal, Experimental Study. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 10, p. 1726, 2019.
- BALK, S. P.; KNUDSEN, K. E. AR, the cell cycle, and prostate cancer. **Nuclear receptor signaling**, v. 6, n. 1, 2008.
- BERREVOETS, C. A. *et al.* Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor 2). **Molecular Endocrinology**, v. 12, n. 8, p. 1172–1183, 1998.
- BERRY, S. J. *et al.* The development of human benign prostatic hyperplasia with age. **The Journal of urology**, v. 132, n. 3, p. 474–479, 1984.
- BIOLCHI, V.; KOFF, W.; BRUM, I. S. Androgen receptor CAG polymorphism and the risk of benign prostatic hyperplasia in a Brazilian population. **International braz j urol**, v. 38, n. 3, p. 373–379, 2012.
- BRUM, I. S.; SPRITZER, P. M.; BRENTANI, M. M. Biologia molecular das neoplasias de próstata. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia**. São Paulo. Vol. 49, n. 5 (2005), p. 797-804, 2005.
- CAFFO, O. *et al.* Splice variants of androgen receptor and prostate cancer. **Oncology reviews**, v. 10, n. 1, 2016.
- CALVETE, A. C. *et al.* Avaliação da extensão da neoplasia em câncer da próstata: valor do PSA, da percentagem de fragmentos positivos e da escala de Gleason. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 49, n. 3, p. 250–254, 2003.
- CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- CARSON, C.; RITTMASER, R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 61, n. 4, p. 2–7, 2003.
- CASTER, J. M. *et al.* Risk of pathologic upgrading or locally advanced disease in early prostate cancer patients based on biopsy Gleason score and PSA: a population-based study of modern patients. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 92, n. 2, p. 244–251, 2015.
- CATALONA, W. J. *et al.* Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 17, p. 1156–1161, 1991.
- CHATTERJEE, B. The role of the androgen receptor in the development of prostatic

hyperplasia and prostate cancer. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 253, n. 1-2, p. 89-101, 2003.

CHEN, C. D. *et al.* Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. **Nature medicine**, v. 10, n. 1, p. 33, 2004.

CHEN, E. J. *et al.* Abiraterone treatment in castration-resistant prostate cancer selects for progesterone responsive mutant androgen receptors. **Clinical cancer research**, v. 21, n. 6, p. 1273–1280, 2015.

CRIPPA, A. *et al.* Hiperplasia benigna da próstata. **Rev Bras Med**, v. 67, n. 1/2, 2010.

CUNHA, G. R. *et al.* Development of the human prostate. **Differentiation**, p. 24–45, 2019.

DANIYAL, M. *et al.* Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 22, p. 9575-8, 2014.

DORNAS, M. C.; DAMIÃO, R.; CARRERETTE, F. B. Tratamento contemporâneo não cirúrgico da hiperplasia prostática benigna. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, v. 9, n. 1, p. 48, 2010.

DUTT, S. S.; GAO, A. C. Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression. **Future oncology**, v. 5, n. 9, p. 1403–1413, 2009.

EDWARDS, J. *et al.* Amplification of the androgen receptor may not explain the development of androgen-independent prostate cancer. **BJU international**, v. 88, n. 6, p. 633–637, 2001.

EISERMANN, K. *et al.* Androgen receptor gene mutation, rearrangement, polymorphism. **Translational andrology and urology**, v. 2, n. 3, p. 137, 2013.

FIBBI, B. *et al.* Chronic inflammation in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. **International journal of andrology**, v. 33, n. 3, p. 475-488, 2010.

GADDIPATI, J. P. *et al.* Frequent detection of codon 877 mutation in the androgen receptor gene in advanced prostate cancers. **Cancer research**, v. 54, n. 11, p. 2861-2864, 1994.

GLEASON, D. F.; MELLINGER, G. T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. **The Journal of urology**, v. 111, n. 1, p. 58–64, 1974.

GOBINET, J.; POUJOL, N.; SULTAN, C. Molecular action of androgens. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 198, n. 1–2, p. 15–24, 2002.

GOTTLIEB, B. *et al.* The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. **Human mutation**, v. 33, n. 5, p. 887-894, 2012.

GOTTLIEB, C. B. Androgen receptor gene mutations database world wide web server. 2013. *Disponível em:* < <http://androgendb.mcgill.ca/>>.

GUO, Z. *et al.* A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. **Cancer research**, v. 69, n. 6,

p. 2305–2313, 2009.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. 11^a ed. Rio de Janeiro, Elsevier Ed., 2006.

HACKEL, C. *et al.* Deficiência de 5a-redutase tipo 2: experiências de Campinas (SP) e Salvador (BA). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** scielo, 2005.

HAMMERICH, K. H.; AYALA, G. E.; WHEELER, T. M. Anatomy of the prostate gland and surgical pathology of prostate cancer. **Cambridge University, Cambridge**, p. 1-10, 2009.

HAN, D. *et al.* A novel nonsense mutation in androgen receptor confers resistance to CYP17 inhibitor treatment in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 6796, 2017.

HAYWARD, S. W.; CUNHA, G. R. The prostate: development and physiology. **Radiologic Clinics of North America**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2000.

HELFAND, B. T. *et al.* Genetic sequence variants are associated with severity of lower urinary tract symptoms and prostate cancer susceptibility. **The Journal of urology**, v. 189, n. 3, p. 845-848, 2013.

HILLEBRAND, A. C. *et al.* Androgenic modulation of AR-Vs. **Endocrine**, v. 62, n. 2, p. 477–486, 2018a.

HILLEBRAND, A. C. *et al.* Androgen receptor isoforms expression in benign prostatic hyperplasia and primary prostate cancer. **PloS one**, p. 1–17, 2018b.

HILLEBRAND, A. C. **Análise da expressão gênica e proteica de isoformas do receptor de androgênios e sua modulação em hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.** Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

HOROSZEWICZ, J. S. *et al.* The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. **Progress in clinical and biological research**, v. 37, p. 115–132, 1980.

HUANG, S. *et al.* Comparative efficacy and safety of new surgical treatments for benign prostatic hyperplasia: systematic review and network meta-analysis. **bmj**, v. 367, 2019.

HUGGINS, C.; HODGES, C. V. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. **Cancer research**, v. 1, n. 4, p. 293–297, 1941.

HUMPHREY, P. A. Histopathology of Prostate Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, p. 1–21, 2017.

IBGE. **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação.** Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>.

ILIC, D.; MISSO, M. Lycopene for the prevention and treatment of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: a systematic review. **Maturitas**, v. 72, n. 4, p. 269–276, 2012.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Ministério da Saúde, Brasil. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>.

INCA. Programa Nacional de Controle do Câncer da Próstata: documento de consenso. Rio de Janeiro, 2002.

JERNBERG, E. *et al.* Clinical relevance of androgen receptor alterations in prostate cancer. **Endocrine connections**, v. 6, n. 8, p. R146-R161, 2017.

KATTA, S. *et al.* Curcumin-Gene Expression Response in Hormone Dependent and Independent Metastatic Prostate Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 4891, 2019.

KIRBY, R. S. The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? **Urology**, v. 56, n. 5, p. 3–6, 2000.

KITA, Y. *et al.* Castration-resistant prostate cancer refractory to second-generation androgen receptor axis-targeted agents: opportunities and challenges. **Cancers**, v. 10, n. 10, p. 345, 2018.

KO, B. *et al.* Androgen insensitivity syndrome: somatic mosaicism of the androgen receptor in seven families and consequences for sex assignment and genetic counseling. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 1, p. 106-111, 2005.

KOOCHEKPOUR, S. Androgen receptor signaling and mutations in prostate cancer. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 5, p. 639–657, 2010.

KOOCHEKPOUR, S. *et al.* Androgen receptor mutations and polymorphisms in African American prostate cancer. **International journal of biological sciences**, v. 10, n. 6, p. 643, 2014.

LALLOUS, N. *et al.* Functional analysis of androgen receptor mutations that confer anti-androgen resistance identified in circulating cell-free DNA from prostate cancer patients. **Genome Biology**, p. 1–15, 2016.

LAWRENTSCHUK, N.; PERERA, M. Benign prostate disorders. In: **Endotext [Internet]**. MDText. com, Inc., 2016.

LEE, C. L. *et al.* Combined effect of polymorphisms in type III 5- α reductase and androgen receptor gene with the risk of benign prostatic hyperplasia in Korea. **Journal of exercise rehabilitation**, v. 12, n. 5, p. 504, 2016.

LEFORT, A.; ALMEIDA, J. Câncer de próstata: a importância das campanhas de prevenção [Monografia]. **Belo Horizonte (MG): Centro Interdisciplinar de Assistência e Pesquisa em Envelhecimento**, 2004.

LEKSHMY, K. S.; PREMA, N. S. Study of Various Prognostic Factors in Prostate Cancer and its Correlation with Androgen Receptor Expression. **Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences**, v. 8, n. 34, p. 2687–2694, 2019.

LIVERMORE, K. E.; MUNKLEY, J.; ELLIOTT, D. J. Androgen receptor and prostate cancer. **AIMS Molecular Science**, v. 3, n. April, p. 280–299, 2016.

LOCKE, J. A. *et al.* Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer. **Cancer research**, v. 68, n. 15, p. 6407–6415, 2008.

LU, S.; TSAI, S. Y.; TSAI, M.-J. Regulation of androgen-dependent prostatic cancer cell growth: androgen regulation of CDK2, CDK4, and CKI p16 genes. **Cancer research**, v. 57, n. 20, p. 4511–4516, 1997.

MALKIN, D. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1233–1238, 1990.

MARRERO, A. R. *et al.* Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Association**, v. 17, n. 4, p. 496–506, 2005.

MEIKLE, A. W. *et al.* Heritability of the symptoms of benign prostatic hyperplasia and the roles of age and zonal prostate volumes in twins. **Urology**, v. 53, n. 4, p. 701-706, 1999.

MILLER, G. J. *et al.* The human prostatic carcinoma cell line LNCaP expresses biologically active, specific receptors for 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3. **Cancer Research**, v. 52, n. 3, p. 515-520, 1992.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

Ministério da Saúde - **Sistema de Informações Hospitalares do SUS**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/>>.

MOSTAGHEL, E. A.; PLYMATE, S. R.; MONTGOMERY, B. Molecular pathways: targeting resistance in the androgen receptor for therapeutic benefit. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 4, p. 791-798, 2014.

MOTRICH, R. D. *et al.* Implications of prostate inflammation on male fertility. **Andrologia**, v. 50, n. 11, p. e13093, 2018.

MUNKLEY, J. *et al.* Androgen-dependent alternative mRNA isoform expression in prostate cancer cells. **F1000Research**, v. 7, 2018.

MUNKLEY, J. *et al.* Androgen-regulated transcription of ESRP2 drives alternative splicing patterns in prostate cancer. **BioRxiv**, p. 629618, 2019.

NACUSI, L. P.; TINDALL, D. J. Androgen receptor abnormalities in castration-recurrent prostate cancer. **Expert review of endocrinology & metabolism**, v. 4, n. 5, p. 417–422, 2009.

NISHIMOTO, K. *et al.* Prediction of extraprostatic extension by prostate specific antigen velocity, endorectal MRI, and biopsy Gleason score in clinically localized prostate cancer. **International journal of urology**, v. 15, n. 6, p. 520–523, 2008.

NIU, Y.-N.; XIA, S.-J. Stroma–epithelium crosstalk in prostate cancer. **Asian journal of andrology**, v. 11, n. 1, p. 28, 2009.

PALMA, R. A. D.; CAICEDO, J. I. The long term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. **Revista Urología Colombiana**, v. 20, n. 1, p. 95–96, 2011.

PARRA, F. C. *et al.* Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 1, p. 177–182, 2003.

PENA, D. J. *et al.* The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e17063, 2011.

PETRUCCELLI, J. L.; SABOIA, A. L. Características étnico-raciais da população: classificações e identidades. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**, 2013.

PEZARO, C.; WOO, H. H.; DAVIS, I. D. Prostate cancer: measuring PSA. **Internal medicine journal**, v. 44, n. 5, p. 433-440, 2014.

PREKOVIC, S. *et al.* The effect of F877L and T878A mutations on androgen receptor response to enzalutamide. **Molecular cancer therapeutics**, v. 15, n. 7, p. 1702-1712, 2016.

RAJAN, P. *et al.* Identification of novel androgen-regulated pathways and mRNA isoforms through genome-wide exon-specific profiling of the LNCaP transcriptome. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e29088, 2011.

RATHKOPF, D. E. *et al.* Androgen receptor mutations in patients with castration-resistant prostate cancer treated with apalutamide. **Annals of Oncology**, v. 28, n. 9, p. 2264-2271, 2017.

REITER, R. E.; DE KERNION, J. B. Epidemiology, etiology and prevention of prostate cancer. **Campbell's urology**, v. 4, p. 2489–2495, 2002.

RHODEN, E L; AVERBECK, M A. Câncer de próstata localizado. **Rev. AMRIGS**, v. 54, n. 1, p. 92-99, 2010.

ROJAS-MANRIQUE, J. P. *et al.* Clinical and Histopathological Characteristics of Prostate Cancer Patients Taken to Palliative Transurethral Prostate Resection. **Cureus**, v. 11, n. 9, 2019.

SCHWANKE, C. H. A. *et al.* Is there an association between T102C polymorphism of the serotonin receptor 2A gene and urinary incontinence? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 10, p. 1315–1322, 2007.

SEIM, I. *et al.* Whole-genome sequence of the metastatic PC3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 6, p. 1731-1741, 2017.

SHIM, M. *et al.* Taxane-based Chemotherapy Induced Androgen Receptor Splice Variant 7 in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer: A Tissue-based Analysis. **Scientific Reports**, p. 3–10, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. **Hiperplasia Prostática Benigna - Tratamento**. 2016.

SPANS, L. *et al.* Comparative genomic and transcriptomic analyses of LNCaP and C4-2B

prostate cancer cell lines. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e90002, 2014.

SRIBUDIANI, Y. *et al.* Germline Mutations and Polymorphisms of Androgen Receptor in Prostate Cancer Patients: Frequency and Results of in Silico Analysis. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 19, n. 8, p. 2241, 2018.

SUZUKI, H. *et al.* Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 46, n. 6, p. 759–765, 1993.

SUZUKI, K. *et al.* Identification of favorable subgroups for alternative anti-androgen therapy in castration-resistant prostate cancer. **Molecular and clinical oncology**, v. 11, n. 5, p. 523–530, 2019.

THALMANN, N. *et al.* Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. **Cancer research**, v. 54, n. 10, p. 2577–2581, 1994.

TILKI, D. *et al.* Understanding Mechanisms of Resistance in Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer : The Role of the Androgen Receptor. **European Urology Focus**, v. 2, n. 5, p. 499–505, 2016.

UDENSI, U. K.; TCHOUNWOU, P. B. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 139, 2016.

V FIANDALO, M.; WU, W.; L MOHLER, J. The role of intracrine androgen metabolism, androgen receptor and apoptosis in the survival and recurrence of prostate cancer during androgen deprivation therapy. **Current drug targets**, v. 14, n. 4, p. 420–440, 2013.

WADHWA, B.; DUMBRE, R. Achieving resistance specificity in prostate cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 260, p. 243–247, 2016.

ZAMBRA, F. M. B. *et al.* CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Human immunology**, v. 74, n. 8, p. 1003–1008, 2013.

ZAMBRA, F. M. B. *et al.* Immunogenetics of prostate cancer and benign hyperplasia—the potential use of an HLA-G variant as a tag SNP for prostate cancer risk. **Hla**, v. 87, n. 2, p. 79–88, 2016.

ZHENG, X. *et al.* Efficacy and safety of abiraterone and enzalutamide for castration-resistant prostate cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicine**, v. 98, n. 44, p. e17748, 2019.

ZHOU, C. K. *et al.* Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: an analysis of time trends overall and by age group. **International journal of cancer**, v. 138, n. 6, p. 1388–1400, 2016.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 2019-0170

Título do Projeto: **Associação Entre Mutações do Receptor de Androgênios em Tumores de Próstata e a Agressividade Tumoral**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é identificar características genéticas que possam estar associadas ao desenvolvimento de tumores prostáticos resistentes aos tratamentos oferecidos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode fazer com que o tratamento não seja eficaz e o tumor volte a desenvolver-se. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em parceria com o Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: permitir que após o término da cirurgia, dois pequenos fragmentos (10 mm x 5 mm, equivalente ao tamanho de um grão de ervilha) da peça cirúrgica retirada sejam encaminhados para estudo genético. O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. Além disso, será coletada uma amostra de sangue de 4mL (duas colheres de sopa, aproximadamente) pelo médico anestesista responsável pela cirurgia após o acesso venoso ser estabelecido. Essas amostras serão utilizadas para a análise de regiões específicas do DNA, relacionadas com o desenvolvimento e a agressividade de tumores na próstata. O prontuário será consultado para fins de verificação de possíveis fatores de exclusão e do diagnóstico anatomopatológico da peça retirada cirurgicamente. Se o senhor concordar, armazenaremos as amostras por até 5 (cinco) anos para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes projetos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e você poderá ser chamado para consentir com o uso do material armazenado).

Concordo que minhas amostras sejam armazenadas, após o uso, para estudos futuros.

Não concordo que minhas amostras sejam armazenadas, após o uso, para estudos futuros.

Em relação à coleta do fragmento da peça cirúrgica, não são conhecidos riscos associados aos procedimentos previstos além daqueles resultantes do processo cirúrgico ao qual o senhor será submetido. Os riscos envolvidos com a coleta sanguínea são aqueles inerentes ao procedimento, sendo a ocorrência de pequenos hematomas (manchas roxas) a alteração mais comum.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos para o senhor. Porém, no futuro, a identificação dessas características poderá auxiliar na identificação de

pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata resistentes aos tratamentos oferecidos atualmente e de tumores com alto potencial de malignidade.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, caso ocorra alguma intercorrência ou dano resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Profa Dra. Ilma Simoni Brum da Silva pelo telefone (51 999969044), com a pesquisadora Luiza Mezzomo Donatti, pelo telefone (54 999640174) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata.

Prezado Senhor

Estamos conduzindo um estudo identificar características genéticas que possam estar associadas ao surgimento e crescimento de tumores prostáticos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode alterar o tecido normal da próstata e levar a formação desses tumores.

Como o Sr. tem o diagnóstico de _____ (hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata) e lhe foi recomendado cirurgia para a retirada da glândula, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em uma coleta de amostra de sangue e a permitir que após retirada da peça cirúrgica três pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético. O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. O material será coletado após término da cirurgia. O material será coletado após o término da cirurgia, e este procedimento não apresenta nenhum risco para sua saúde.

Quanto à coleta sanguínea, o Sr. será submetido à coleta de 10 mL de sangue venoso, hoje, após lhe explicarmos este termo de compromisso e o senhor assiná-lo ou então no dia da cirurgia, com o objetivo de realizar dosagens hormonais. Os riscos envolvidos com essa coleta são os riscos inerentes ao procedimento, sendo a ocorrência de pequenos hematomas/equimoses a alteração mais comum.

Se o Sr. concordar, armazenaremos as amostras de sangue e de tecido por até cinco anos para que outras características possam ser analisadas no futuro,

em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação de características genéticas específicas de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

O Sr. é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Não haverá nenhuma despesa para sua participação neste projeto. O senhor receberá uma via deste termo de consentimento, sendo que a qualquer momento o seu consentimento em participar deste estudo poderá ser retirado. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto são Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva (51 33083559 ou 99969044), Prof. Dr. Milton Berger (51 33598286), Prof. Dr. Brasil Silva Neto (51 84070066) e a pós-graduanda Ana Caroline Hillebrand (51 33083559 ou 81531606). Caso o senhor tenha qualquer dúvida sobre o projeto poderá nos contatar nos telefones indicados acima. Tendo este projeto sido revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (51 33598304).

Eu, _____, fui informado dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue a que serei submetido e das determinações de características genéticas que serão feitas. Recebi uma via deste termo de consentimento e também a garantia de resposta a dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confidencialidade dos dados obtidos.

Local e data _____

Paciente ou responsável (nome legível): _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____

Hospital de Clínicas de Porto Alegre- Centro de Pesquisa Experimental
LaGOM (Laboratório 12106)

Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Bairro Rio Branco - Fone: 51 33597625

Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (Laboratório 09)

Rua Sarmiento Leite, 500 - Centro - Fone: 51 33083559

Porto Alegre

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 2019-0170

Título do Projeto: Associação Entre Mutações do Receptor de Androgênios em Tumores de Próstata e a Agressividade Tumoral

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é identificar características genéticas que possam estar associadas ao desenvolvimento de tumores prostáticos resistentes aos tratamentos oferecidos. Dentre as doenças prostáticas, a hiperplasia prostática benigna e o câncer de próstata apresentam alta incidência na população. A expressão modificada de alguns genes pode fazer com que o tratamento não seja eficaz e o tumor volte a desenvolver-se. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em parceria com o Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Sua participação na pesquisa envolve apenas o consentimento da utilização de amostras de sangue e fragmentos de próstata, retirados cirurgicamente, coletadas anteriormente mediante concordância e assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado pelo nosso grupo de pesquisa para a realização do trabalho intitulado "Identificação da presença de isoformas do receptor de androgênios (AR) em tumores da próstata", o qual foi realizado pela aluna Ana Caroline Hillebrand, sob orientação da Professora Dra. Ilma Simoni Brum da Silva. Como assinado no TCLE anterior, o senhor concordou em armazenar as amostras de sangue e de tecido prostático por até cinco anos para que outras características pudessem ser analisadas no futuro.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos para o senhor. Porém, no futuro, a identificação dessas características poderá auxiliar na identificação de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata resistentes aos tratamentos oferecidos atualmente e de tumores com alto potencial de malignidade.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Profa Dra. Ilma Simoni Brum da Silva pelo telefone (51 999969044), com a pesquisadora Luiza Mezzomo Donatti, pelo telefone (54 999640174) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO IV

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre mutações do receptor de androgênios em tumores de próstata

Pesquisador: Ilma Simoni Brum da Silva

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 09346919.9.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: HOSPITAL DE CLINICAS DE PORTO ALEGRE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.346.999

Apresentação do Projeto:

As doenças da próstata atingem cerca de 80% dos homens com idade superior a 50 anos, sendo que as duas formas mais comuns são a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP), ambas resultantes da proliferação celular anormal. O CaP é o segundo tipo de câncer mais incidente no Brasil, tendo o Rio Grande do Sul (RS) como o estado com a maior prevalência. É sabido que os androgênios possuem um papel crucial na glândula prostática e que suas ações são mediadas pelo receptor celular denominado receptor de androgênios (AR), um receptor nuclear que age como fator de transcrição dependente de ligante. Sendo assim, alterações no AR e no gene supressor tumoral TP53 podem estar relacionadas com o desenvolvimento da HPB e do CaP. Visto que o crescimento de células do CaP é dependente da ação dos androgênios, a privação hormonal é a principal terapia utilizada, porém, alguns homens desenvolvem resistência e o tumor continua progredindo, invadindo órgãos próximos (bexiga e uretra) e distantes (ossos, fígado e pulmões). Mutações do AR têm sido apontadas como fatores de resistência à terapia antiandrogênica e recidiva bioquímica em tumores avançados, mas, pouco se sabe de seu papel no tumor primário. Duas importantes mutações relacionadas à resistência terapêutica já foram descritas: AR-T878A e AR-Q784*. Além das mutações do AR, o gene TP53 também está associado ao desenvolvimento de tumores. A variante germinativa rara rs78378222 (A>C) do gene TP53 predispõe a uma ampla variedade de tumores em idade jovem, porém, o CaP não tem sido descrito como um tumor frequente em pacientes portadores de mutações germinativas em TP53. A

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.346.999

elucidação dos mecanismos envolvidos neste processo e o manejo de tumores primários são necessários para que seja possível diferenciar tumores indolentes daqueles com alto potencial de malignidade e/ou propor novas alternativas para o controle da HPB. Sendo assim, o Projeto “Associação entre mutações do receptor de androgênios em tumores de próstata e a agressividade tumoral” é um estudo transversal que tem como objetivo principal descrever a frequência das mutações AR-T878A, AR-Q784* e rs78378222 (A>C) em uma amostra de pacientes do RS e avaliar possível associação ao desenvolvimento, agressividade tumoral e recidiva bioquímica. Os resultados serão obtidos a partir de análises moleculares do DNA genômico extraído de amostras de sangue e tecido prostático de 237 pacientes atendidos no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

- Descrever a frequência das mutações de receptores de androgênio, AR-T878A e AR-Q784*, e da variante funcional rs78378222 em uma amostra de pacientes do Rio Grande do Sul submetidos à cirurgia de próstata, por hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata, no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e avaliar sua possível implicação no desenvolvimento, agressividade tumoral e recidiva bioquímica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença das mutações do AR, AR-T878A e AR-Q784*, nos grupos HPB e CaP e descrever suas frequências.
- Determinar a frequência da variante funcional rs78378222 em amostras de DNA genômico de pacientes com CaP e HPB.
- Avaliar o risco de desenvolvimento de CaP em pacientes com a presença das mutações em análise.
- Avaliar a concordância da presença das mutações em análise no DNA genômico de amostras de sangue e de tecido prostático derivadas de pacientes com CaP e HPB.
- Avaliar se as variantes AR-T878A, AR-Q784* e rs78378222 apresentam efeito modificador de fenótipo no mesmo grupo de pacientes com CaP, considerando as seguintes manifestações clínicas: idade ao diagnóstico, agressividade tumoral, desenvolvimento de resistência à deprivação androgênica e recidiva bioquímica;
- Verificar se existe associação entre o genótipo para a variante rs78378222 com os níveis de expressão de mRNA TP53 analisados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa em tecido

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.346.999

tumoral de pacientes com câncer de próstata.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores,

Riscos: Não são conhecidos riscos associados aos procedimentos previstos, visto que os fragmentos prostáticos e a amostra de sangue serão coletadas durante o transoperatório.

Benefícios: A identificação das características do genótipo de tumores prostáticos poderá auxiliar na identificação de pacientes sob risco de desenvolver tumores de próstata resistentes aos tratamentos oferecidos atualmente e de tumores com alto potencial de malignidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo experimental transversal para análise de mutações do AR e TP53 em amostras de sangue e tecido prostático de pacientes com CaP ou HPB recrutados do Serviço de Urologia do HCPA. Serão incluídos pacientes em acompanhamento no Serviço de Urologia do HCPA. As amostras biológicas serão coletadas durante o transoperatório e transportadas ao Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para serem devidamente armazenados até a extração do DNA. O grupo HPB será composto por pacientes com o diagnóstico de HPB, volume prostático estimado por ecografia acima de 30g e submetidos à cirurgia de HPB no HCPA. Para o grupo CaP, serão incluídos pacientes submetidos à cirurgia por CaP no HCPA, com diagnóstico comprovado por exame anatomopatológico. Pacientes serão excluídos do estudo quando apresentarem qualquer doença sexualmente transmissível (DST), tuberculose, que façam quimioterapia ou possuam o diagnóstico de outra neoplasia concomitante. Parte das amostras a serem analisadas neste estudo foram obtidas de estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, cujos TCLE já previam o armazenamento do material biológico coletado para análises futuras. Amostras de novos pacientes serão incluídas para este estudo, os quais assinarão o TCLE em questão. O cálculo de N amostral foi feito utilizando o software WINPEPI, versão 3.85, considerando um nível de confiança igual a 95%, diferença aceitável de 0,05 e assumindo proporção de frequência da mutação de 19%, conforme descrito previamente. O cálculo amostral determinou um N amostral ideal de 237 participantes para o estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Recomendações:

Os pesquisadores devem incluir no TCLE, versão re consentimento, que há riscos de quebra de confidencialidade em relação à manipulação de dados dos participantes e que esse risco será minimizado pelo uso de códigos, e não nomes dos participantes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.283.865 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 06/05/2019. Não apresenta novas pendências. Ver recomendações

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto 17/04/2019 TCLE 06/05/2019 (ver recomendação e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 237 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.346.999

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|-----------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1274860.pdf | 06/05/2019 14:43:14 | | Aceito |
| Outros | Respostas_versao2.docx | 06/05/2019 14:42:18 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Outros | Respostas_versao2assinada.pdf | 06/05/2019 14:41:33 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Outros | TCLE_reconsentimento.pdf | 06/05/2019 14:39:10 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_versao3.pdf | 06/05/2019 14:36:35 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Outros | TCLEprojeto140397.pdf | 17/04/2019 16:08:59 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projetoLuizaplataforma_VERSAO2.pdf | 17/04/2019 16:05:04 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEplataformaLuiza_VERSAO2.pdf | 17/04/2019 16:04:33 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Outros | respostaCEPassinado.pdf | 17/04/2019 16:02:27 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Outros | respostaspendenciasCEP.docx | 17/04/2019 16:01:55 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | declaracaomanuseiomaterialbiologico.pdf | 02/04/2019 13:15:50 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | delegacaodefuneso_FINALplataformaBR.pdf | 28/02/2019 22:20:08 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Orçamento | orcamentoLuiza_FINALplataformaBR.pdf | 28/02/2019 22:19:38 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Cronograma | cronogramaLuiza_FINALplataformaBR.pdf | 28/02/2019 22:19:24 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | projetoLuiza_FINALplataformaBR.pdf | 28/02/2019 22:18:58 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| Folha de Rosto | Folharostoplataformabr.pdf | 26/12/2018 17:17:15 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Termoconsentimentoplataforma.pdf | 18/12/2018 22:31:08 | Luiza Mezzomo Donatti | Aceito |

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.346.999

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 24 de Maio de 2019

Assinado por:

**Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br