

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA



VARIANTES GENÉTICAS DE RADIOTOXICIDADE EM PACIENTES COM
TUMORES PROSTÁTICOS TRATADOS COM RADIOTERAPIA

Hellen da Silva Cintra de Paula

Orientador (a): Profa Dra *Renata de Bastos Ascenço Soares*
Instituição: PUC-Goiás

Goiânia - GO
- Março 2012 -

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA



VARIANTES GENÉTICAS DE RADIOTOXICIDADE EM PACIENTES COM
TUMORES PROSTÁTICOS TRATADOS COM RADIOTERAPIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO PROGRAMA DE
MESTRADO EM GENÉTICA, DA PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA E EXTENSÃO,
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE GOIÁS COMO
REQUISITO PARCIAL À OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA.

Hellen da Silva Cintra de Paula
Orientador (a): Profa Dra *Renata de Bastos Ascenço Soares*
Instituição: PUC-Goiás

Goiânia - GO
- Março 2012 -

P324v Paula, Hellen da Silva Cintra de.

Variantes genéticas de radiotoxicidade em pacientes com tumores prostáticos tratados com radioterapia [manuscrito] / Hellen da Silva Cintra de Paula. – 2012.

82 f. : il.

Bibliografia

Orientadora: Prof^a. Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biologia, 2012.

Inclui lista de figuras, tabelas, abreviaturas e siglas.

Inclui Anexo.

1. Variantes genéticas. 2. Radiotoxicidade. 3. Próstata - câncer. I. Título.

CDU: 616.65-006.6 (043.3)

Fomento e Instituições

Fomento:

- Chamada Pública MCT/FINEP/AÇÃO TRANSVERSAL: REDE GENOPROT 08/2007, Convênio 01.07.0536.00.


- Bolsa PROSUP-CAPES.

Instituição participante:

Associação de Combate ao Câncer em Goiás, Instituto de Ensino e Pesquisa, Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia.

Banca examinadora

Goiânia, 14 de março de 2012.



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário
Caixa Postal 86 ● CEP 74605-010
Goiânia ● Goiás ● Brasil
Fone: (62) 3946.1070 ● Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br ● prope@pucgoias.edu.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DEFENDIDA EM 14 DE MARÇO DE 2012 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

100 (..... dez) (.....)

Renata BA Soares
.....
Prof^ª Dr^ª Renata de Bastos Ascenço Soares
(presidente-orientadora)

Vera Aparecida Saddi
.....
Prof^ª Dr^ª Vera Aparecida Saddi - PUC Goiás
(membro interno)

Yuri de Abreu Mendonça
.....
Prof. Dr. Yuri de Abreu Mendonça - ACCG
(membro externo)

Aos meus pais, José Luiz e Loane, minha irmã
Thais e ao meu esposo Carlos Henrique pela
confiança, incentivo e amor incondicional.

Agradecimentos

Para finalizar esta etapa tão importante da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos àqueles que me apoiaram nesta longa caminhada e contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter me concedido a oportunidade de iniciar e concluir este trabalho. O amor de Deus nos dá força para prosseguir mesmo em momentos difíceis. Este amor é o que dá sentido a minha vida e às minhas escolhas.

Quero expressar meus profundos agradecimentos a minha orientadora, Renata Soares, que foi além de seu papel em orientar uma mestranda, se tornando também uma grande amiga. Agradeço pela atenção e tempo dedicados, mesmo com vida corrida de hoje em dia. Agradeço à Dra Juliana Dourado pelas orientações sobre radioterapia, uma área totalmente desconhecida para mim no início deste trabalho. Obrigada a vocês duas por sempre acreditarem no meu potencial, pela oportunidade oferecida e principalmente pelo bom convívio nestes dois anos de trabalho.

Este trabalho só foi viabilizado pelo apoio de toda a equipe do laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da ACCG. De forma especial, agradeço a querida Vera Lúcia, secretária do laboratório que esteve disposta a ajudar no que fosse preciso, além de nos recepcionar sempre com um imenso sorriso no rosto. Também agradeço a todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório, especialmente João Paulo, Thalles Eduardo e Ricardo Marciano por ajudarem na etapa crucial de seqüenciamento das amostras.

Agradeço aos colegas do curso de mestrado em genética da PUC, em especial a querida Ana Terra, que além de colega, foi uma grande amiga e me auxiliou em quase todas as etapas deste trabalho. Também gostaria de agradecer ao secretário do MGene, Renato, que sempre esteve pronto a nos atender e facilitar nossa vida burocrática dentro do programa de mestrado.

Meus agradecimentos a Profa. Dra. Vera Saddi, um dos maiores exemplos que eu tenho de mestre. Obrigada por ter sido minha primeira

orientadora, durante a iniciação científica e por sempre incentivar seus alunos a trilhar este caminho belo da ciência.

Aos meus amigos e familiares agradeço pelo apoio. Em especial aos meus pais e irmã que sempre incentivaram minhas escolhas valorizando meus potenciais. É pelo amor, suporte e exemplo de vida deles que trilhei todos os meus caminhos até hoje. Sou grata pelo contínuo apoio em todos estes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção de meus próprios valores.

Gostaria de honrar aqui a vida do meu esposo, Carlos Henrique de Paula, que participou da maior mudança na minha vida durante o período deste mestrado, nosso casamento. Seu apoio e compreensão, neste início de vida juntos, fez meus dias mais produtivos e felizes.

Por fim não poderia me esquecer de agradecer a CAPES, que possibilitou a minha dedicação exclusiva a este trabalho por meio da bolsa do PROSUP. Sem este auxílio não seria possível realizar tudo o que fizemos em tempo hábil para defesa.

Índice

Agradecimentos	v
Lista de Figuras e Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	xi
Resumo	14
Abstract	15
I – Introdução	16
I.1 – Dados Gerais – Câncer de Próstata	16
I.2 – Radioterapia para câncer de próstata	18
I.2.1 – Braquiterapia	20
I.2.2 – Radioterapia Externa	20
I.2.2.1 – Radioterapia Convencional	20
I.2.2.2 – Radioterapia 3D	22
I.2.2.3 – Radioterapia de Intensidade Modulada	22
I.2.2.4 – Radioterapia Guiada por Imagem	24
I.3 – Dano ao DNA e Vias de Reparo	25
I.4 – Gene TP53	28
I.4.1 – Polimorfismos no gene TP53	31
I.5 – Gene ATM	32
I.5.1 – Polimorfismos no gene ATM	33
I.6 – Importância dos estudos em radiogenômica	34
II – Objetivos	36
III – Metodologia	37
III.1 – Seleção de Pacientes	37
III.2 – Classificação da Toxicidade	37
III.3 – Estimativa de Dose nos Órgãos de Risco	37
III.4 – Critérios de Inclusão	38
III.5 – Critérios de Exclusão	38
III.6 – Obtenção das Amostras	38
III.7 – Extração de DNA	39
III.8 – Amplificação das regiões de TP53 e ATM	39
III.9 – Reação de Seqüenciamento	41
III.10 – Análise estatística	42
III.11 – Aspectos Éticos	42
IV – Resultados	43

V – Discussão	59
VI – Perspectivas e Conclusões	67
VII – Bibliografia	70
VIII – Anexos	77

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1. Técnica “4-field box” para próstata e nódulos da pelve.	21
Figura 2. Técnica de radioterapia de intensidade modulada para câncer de próstata.	24
Figura 3. Estrutura da proteína p53 que consiste de 393 aminoácidos com 5 domínios bem definidos.	28
Figura 4. Localização Cromossômica do gene TP53.	28
Figura 5. Representação esquemática das 12 isoformas de p53 humanas identificadas, com seus domínios e nomenclatura.	29
Figura 6. Esquema mostrando as vias de sinalização de TP53 e suas conseqüências assim como os genes envolvidos.	30
Figura 7. Localização cromossômica do gene ATM.	32
Figura 8. Freqüência das comorbidades relatadas pelos pacientes incluídos no estudo	43
Figura 9. Análise eletroforética, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando a integridade do DNA genômico total extraído das amostras dos 50 pacientes incluídos no estudo.	45
Figura 10. Análise eletroforética, em gel de agarose 0,8% do fragmento amplificado do gene TP53 de 527 pares de bases.	46
Figura 11. Análise eletroforética, em gel de agarose 0,8% do fragmento amplificado do gene ATM de 317 pares de bases	46
Figura 12. Percentagens dos sintomas agudos apresentados no trato gastrointestinal pelos pacientes estudados.	48
Figura 13. Percentagens dos sintomas crônicos apresentados no trato gastrointestinal pelos pacientes estudados	49
Figura 14. Percentagens dos sintomas agudos apresentados no trato urinário pelos pacientes estudados	49
Figura 15. Percentagens dos sintomas crônicos apresentados no trato urinário pelos pacientes estudados	50
Figura 16. Gráfico de dispersão representando o número de pacientes que fizeram ou não hormonioterapia, em relação aos efeitos adversos agudos de pele após a radioterapia.	52
Figura 17. Gráfico de dispersão representando o número de pacientes que tinham ou não hipertensão, em relação aos efeitos adversos crônicos urinários de alto e baixo grau, após a radioterapia.	53
Tabela 1. Polimorfismos do gene TP53 descritos na região de 527 pares de bases amplificada por PCR.	42
Tabela 2. Freqüência das características clínicas dos pacientes e do tratamento.	44
Tabela 3. Morbidade aguda segundo RTOG (grau de toxicidade).	47

Tabela 4. Morbidade crônica segundo RTOG (grau de toxicidade).	47
Tabela 5. Distribuição de morbidade aguda de alto e baixo grau segundo RTOG.	48
Tabela 6. Distribuição de morbidade crônica de alto e baixo grau segundo RTOG.	48
Tabela 7. Frequência dos polimorfismos analisados em 50 pacientes.	51
Tabela 8. Associações entre as características clínicas e a dermatite aguda de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) para pele.	53
Tabela 9. Associações entre as características clínicas e a dermatite crônica de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) para pele.	54
Tabela 10. Associações entre as características clínicas e os efeitos colaterais do trato gastrointestinal agudos de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).	54
Tabela 11. Associações entre as características clínicas e os efeitos colaterais do trato gastrointestinal crônicos de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).	54
Tabela 12. Associações entre as características clínicas e os efeitos colaterais urinários agudos de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).	55
Tabela 13. Associações entre as características clínicas e os efeitos colaterais urinários crônicos de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)	55
Tabela 14. Associação entre os genótipos de TP53 e ATM e os efeitos adversos de alto grau agudos de pele (dermatite) segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)	56
Tabela 15. Associação entre os genótipos de TP53 e ATM e os efeitos adversos de alto grau crônicos de pele, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)	56
Tabela 16. Associação entre os genótipos de TP53 e ATM e os efeitos adversos de alto grau e agudos no trato gastrointestinal, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)	56
Tabela 17. Associação entre os genótipos de TP53 e ATM e os efeitos adversos de alto grau e crônicos no trato gastrointestinal, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)	57
Tabela 18. Associação entre os genótipos de TP53 e ATM e os efeitos adversos de alto grau e agudos no trato urinário, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)	57
Tabela 19. Associação entre os genótipos de TP53 e ATM e os efeitos adversos de alto grau e crônicos no trato urinário, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group)	57
Tabela 20. Correlações significativas entre as variáveis do estudo.	58

Lista de Abreviaturas e Siglas

3D-CRT: do inglês, *3D Conformal radiotherapy* (Radioterapia conformacional 3D)

ACCG: Associação de combate ao câncer em Goiás

Arg: Arginina

Asn: Asparagina

Asp: Ácido aspártico

ATM: *Ataxia telangiectasia mutated*

ATR: *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*

Chk1: *Checkpoint Kinase 1*

BED: *Biological effective dose* (Dose biológica efetiva)

BER: *Base Excision Repair* (Reparo por excisão de bases)

BR: *Basic region* (Região Básica)

BRCA1: *Breast cancer 1 gene*

CACON: Centro de atendimento de alta complexidade em oncologia

CEPACCG: Comitê de ética em pesquisa da associação de combate ao câncer em Goiás.

Chk2: *Checkpoint Kinase 2*

CYP2D6: *Cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6*

DBD: *DNA binding domain* (Domínio de ligação do DNA)

DNA: *Desoxiribonucleic acid* (ácido desoxiribonucleico)

dNTP: *Desoxiribonucleotide triphosphate* (desoxiribonucleotídeo trifosfato)

EPDR1: *Ependymin related protein 1*

ERCC2: *Excision repair cross-complementing 2*

FAT: *Focal Adhesion Targeting*

GWA: *Genome wide association* (associação genômica ampla)

Gy: Grays

HAJ: Hospital Araújo Jorge

HAS: Hipertensão arterial sistêmica

HR: *Homologous recombination* (Recombinação homóloga)

HT: Hormonioterapia

HUS1: *HUS1 checkpoint homolog (S. pombe)*

ID3: *Inhibitor of DNA binding 3*

IGRT: *Image guided radiotherapy* (Radioterapia Guiada por imagem)

IMRT: *Intensity modulated radiotherapy* (Radioterapia de intensidade modulada)

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LIG4: *ligase IV, DNA, ATP-dependent*

MAPK: *Mitogen activated protein kinase*

MDC1: *mediator of DNA-damage checkpoint 1*

MDM2: *Murine double minute 2*

miRISC: *Multiprotein RNA induced-silencing complex*

miRNA: *Micro RNA*

MMA: *MisMatch Repair* (Reparo de emparelhamento errôneo)

mRNA: *Messenger ribonucleic acid* (ácido ribonucléico mensageiro)

NER: *Nucleotide Excision Repair* (Reparo por excisão de nucleotídeos)

NHEJ: *Non-homologous recombination end-joining* (Reparo por junção de extremidades não homólogas)

NLS: *Nuclear localization sinalization* (sinal de localização nuclear)

OD: *Oligomerization domain* (Domínio de oligomerização)

P13: Proteína p13

P14: Proteína p14

P21: Proteína p21

P38: Proteína p38

P53: Proteína p53

PAH: *phenylalanine hydroxylase*

PCR: *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PIN3: Polimorfismo no íntron 3

Pro: Prolina

PSA: *Prostate specific antigen* (Antígeno prostático específico)

PUMA: *p53 up-regulated mediator of apoptoses gene*

RAD1: *RAS associated with diabetes 1 gene*

RAD17: *RAS associated with diabetes 17 gene*

RAD9: *RAS associated with diabetes 9 gene*

RNA: *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucléico)

RTOG: *Radiation Therapy Oncology Group*

SART1: *Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 1*

Ser: Serina

Sítio AP: Sítios apurínico/apirimidínico

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de base única)

SOD2: *superoxide dismutase 2 gene*

SUS: Sistema Único de Saúde

TAD: *Transactivation domain* (domínio de transativação)

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TGFB1: *transforming growth factor beta 1 gene*

TGI: Trato gastrointestinal

TP53: *tumor protein p53 gene*

TU: Trato Urinário

UV: Ultra-violeta

XRCC1: *X-ray repair cross-complementing protein 1 gene*

XRCC3: *X-ray repair cross-complementing protein 3 gene*

Resumo

O propósito deste estudo foi avaliar a associação entre polimorfismos de base única nos genes *ATM* e *TP53* em pacientes com câncer prostático e a morbidade na pele e nos sistemas urinário e gastrointestinal inferior após a radioterapia. Estes dois genes codificam proteínas importantes nas vias de reparo do DNA. Acredita-se que seus polimorfismos possam modificar a resposta do tecido normal a radioterapia. Foi selecionado um grupo de 50 pacientes do serviço de radioterapia do Hospital Araújo Jorge (Associação de Combate ao Câncer em Goiás). Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foi coletada a amostra de sangue periférico com subsequente extração de DNA e amplificação gênica por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar os fragmentos gênicos de *ATM* e *TP53*. Finalmente, os amplicons foram seqüenciados para verificar a presença da troca de G>A no códon 1853 do gene *ATM* e polimorfismos do gene *TP53* (C>G no códon 72, C>T no códon 47, C>A na posição 11299, C>T na posição 11322 e uma inserção de 16 pares de bases no intron 3). Os efeitos adversos foram classificados de acordo com o escore do *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG). Por meio de análise univariada, a hipertensão se associou fortemente ao baixo risco de desenvolvimento de toxicidade urinária crônica (OR=0,048, 95%IC 0,004 - 0,620; $p=0,022$). Pacientes que foram submetidos à hormonioterapia mostraram uma incidência significativa de toxicidade de pele aguda (RR = 1,286, 95%IC 0,907 – 1,823; $p=0,029$). A troca C>T na posição 11322 do gene *TP53* (intron 3) mostrou uma associação significativa com o risco de toxicidade aguda de pele (RR = 22,0, 95%IC 5,68 – 85,207; $p=0,006$). Não houve associação entre os outros polimorfismos de *TP53* e *ATM* analisados e a freqüência de efeitos adversos ($p>0,05$). Foi demonstrado que a presença de hipertensão parece ser protetora para o desenvolvimento de efeitos urinários tardios após a radioterapia. A hormonioterapia foi aparentemente determinante no surgimento de toxicidade aguda de pele. Nossos dados revelaram ainda que um polimorfismo intrônico de *TP53* (11322 C>T) também estava associado ao aumento de radiosensibilidade aguda de pele. Estas observações mostram a importância de se investigar o perfil genético para futuramente prever os efeitos adversos de pacientes em radioterapia.

Palavras-chave: câncer de próstata, radiotoxicidade, *ATM* e *TP53*.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the association of single nucleotide polymorphisms of *ATM* and *TP53* genes in prostate cancer patients with skin, urinary and lower gastrointestinal systems morbidity after radiotherapy. These two genes encode important proteins of the DNA repair pathways. It is believed that their polymorphisms are likely to modify the response of normal tissues to radiation. A group of 50 patients of the Radiotherapy Service at Araújo Jorge Hospital (Associação de Combate ao Câncer em Goiás) was selected. After signing the informed consent agreement, a sample of peripheral blood was collected for subsequent DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) for amplification of *ATM* and *TP53* gene fragments. Finally the amplified fragments were sequenced to verify the presence of an exchange G> A in the codon 1853 of the *ATM* gene and polymorphisms of *TP53* gene (C> G in the codon 72, C>T in the codon 47, C>A in the position 11299, C>T in the position 11322 and one insertion of 16 base pairs in intron 3). The side effects were classified according to the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) score. On univariate analysis, hypertension was strongly associated with a decreased risk of late urinary toxicities (OR= 0,048, 95% CI 0,004 - 0,620; $p= 0,022$). Patients receiving hormone therapy had a significantly higher incidence of acute skin toxicity (RR=1,286, 95% CI 0,907 - 1,823; $p = 0,029$). The exchange C>T in the position 11322 of the *TP53* gene (intron 3) was significantly associated with the risk of acute skin toxicity (RR=22,0, 95%CI 5,680 - 85,207; $p=0,006$). There wasn't association between the other *TP53* and *ATM* polymorphisms analysed and the frequency of side effects ($p>0,05$). In this study it has been shown that the presence of hypertension seemed to be protective for the development of urinary late effects after radiotherapy. Hormone therapy was apparently determinant for the development of acute skin toxicity. Our data also revealed that a *TP53* intronic polymorfism (11322 C>T) was associated to increased acute skin radiosensitivity. This observation corroborates the importance of investigating the genetic profile to predict adverse side effects in patients undergoing radiotherapy.

Keywords: prostate cancer, radiation toxicity, *ATM*, *TP53*.

I - INTRODUÇÃO

I.1 – Dados gerais - Câncer de próstata

A última estimativa mundial apontou o câncer de próstata como sendo o quinto tipo de câncer mais comum no mundo e o segundo mais freqüente em homens, com cerca de 899 mil novos casos no ano de 2008. Aproximadamente 75% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em países desenvolvidos, sendo que parte desse aumento pode ser reflexo das práticas de rastreamento por meio do teste do Antígeno Prostático Específico (PSA). Com a estimativa de 258 mil mortes em 2008, o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer que mais leva a óbitos entre homens ^[1].

No Brasil, segundo o INCA, para o ano de 2012, estimam-se 60.180 novos casos de câncer de próstata. Esses valores correspondem a um risco estimado de 62 novos casos diagnosticados a cada 100 mil homens, um aumento significativo, já que as estimativas para o ano de 2010 foram de 52.350 casos. Os maiores valores de incidência foram encontrados nas regiões Sudeste (78/100 mil homens) e Nordeste (43/100 mil homens). Sem considerar os tumores de pele não-melanoma, o câncer de próstata é o mais freqüente nas regiões Centro-Oeste (75/100 mil), Sul (68/100 mil) e Norte (30/100 mil). O aumento da expectativa de vida, a evolução dos métodos diagnósticos e a melhoria da qualidade dos sistemas de informação do país podem explicar o aumento da taxa de incidência ao longo dos anos ^[2].

Mais do que qualquer outro tipo, o câncer de próstata é considerado um câncer da terceira idade, já que aproximadamente 62% dos casos diagnosticados no mundo acometem homens com 65 anos ou mais. Com o crescimento da expectativa de vida mundial é esperado que o número de casos novos aumente cerca de 60% até o ano de 2015. Além disso, a raça/etnia e a história familiar da doença também são consideradas como fatores de risco para esse tipo de neoplasia. O câncer prostático é aproximadamente 1,6 vezes mais comum em homens negros do que em homens brancos. Alguns desses tumores podem crescer de forma rápida, espalhando-se para outros órgãos e podendo levar à morte. A grande maioria, porém, cresce de forma tão lenta

(leva cerca de 15 anos para atingir 1 cm³) que não chega a dar sinais durante a vida e nem a ameaçar a saúde do homem [3].

A comparação entre a incidência e mortalidade por câncer de próstata no mundo demonstra uma tendência para grandes aumentos de incidência acompanhados de declínio ou mesmo discreta elevação das taxas de mortalidade [4]. No Brasil a mortalidade por esse tipo de neoplasia apresenta um perfil ascendente, embora com uma magnitude menor que a incidência [3]. Considerando tratar-se de um câncer de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, programas de controle da doença são aplicáveis para a redução da mortalidade. Portanto, o aumento da incidência que vem ocorrendo nos últimos anos deve-se especialmente ao diagnóstico precoce, devido à maior divulgação pública e à medida que se discute essa doença mais abertamente. Outro fator que contribui para aumento da incidência de casos diagnosticados e pode diminuir a mortalidade, devido ao diagnóstico precoce, é a solicitação de testes de PSA, um marcador tumoral ideal para o câncer de próstata, importante para diagnóstico e estadiamento do tumor [5]. Além do PSA, outros dois exames são preconizados para o diagnóstico, o toque retal que tem alta especificidade para câncer de próstata, mas baixa sensibilidade [6] e a ultra-sonografia trans-retal, um exame de alto custo indicado após o toque retal e o PSA, para pacientes que serão encaminhados à biópsia [7].

O tratamento do câncer de próstata pode ser realizado a partir de três abordagens combinadas ou não: cirurgia, radioterapia e hormonioterapia. A cirurgia é conhecida como prostatectomia radical e tem como função remover a próstata, os tecidos periprostáticos e vesículas seminais. É indicada para tumores confinados ao órgão e está associada a uma maior mortalidade em pacientes acima de 80 anos [8].

A hormonioterapia é utilizada buscando reduzir o estímulo androgênico ao carcinoma de próstata pela ablação do tecido produtor de androgênio, inibição da síntese androgênica, supressão da liberação hipofisária de gonadotrofina ou interferência na ação androgênica nos tecidos-alvo. Existem duas abordagens neste tipo de tratamento, a hormonioterapia neoadjuvante, empregada com o intuito de reduzir o volume prostático para o planejamento da radioterapia e a hormonioterapia adjuvante utilizada em

pacientes com tumores de próstata localmente avançados juntamente com a radioterapia até três anos após o seu término ^[9].

I.2 - Radioterapia para câncer de próstata

Atualmente o tratamento mais usado em tumores prostáticos é a radioterapia. Por ser uma doença predominante em idosos e estes geralmente apresentam muitas comorbidades, uma parcela significativa não tem condições clínicas de se submeter à prostatectomia, por esse motivo a radioterapia é a mais indicada ^[3].

A radioterapia, combinada com cirurgia e hormonioterapia (quimioterapia quando for o caso) ou mesmo como único método de escolha, é a modalidade de tratamento mais utilizada para o câncer. Pode ser usada tanto no tratamento de câncer prostático de baixo risco como de alto risco ^[10, 11]. Cerca de 50% de todos os pacientes com câncer recebem radioterapia em algum momento de seu tratamento ^[12].

O tipo de radioterapia utilizado pode ser a radioterapia convencional, que é o método mais usado e consiste de uma irradiação externa no carcinoma de próstata. A outra forma de radioterapia é a braquiterapia conhecida também como irradiação intersticial, com implantes permanentes ou temporários de agulhas com doses diferentes de radiação ^[9]. A radioterapia pode promover uma cura substancial dos tumores de próstata, contudo efeitos adversos agudos ou crônicos podem se desenvolver em pacientes após o tratamento, como sintomas urinários, retais e disfunção erétil com diminuição na qualidade de vida destes pacientes ^[13, 14,15].

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais. As radiações ionizantes são eletromagnéticas ou corpusculares e carregam energia. Ao interagirem com os tecidos, dão origem a elétrons rápidos que ionizam o meio e criam efeitos químicos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA. A morte celular pode ocorrer por variados mecanismos, desde a

inativação de sistemas vitais para a célula até sua incapacidade de reprodução [3].

A resposta dos tecidos às radiações depende de diversos fatores, tais como a sensibilidade do tumor à radiação, sua localização e oxigenação, bem como o tipo e a quantidade da radiação e o tempo total em que ela é administrada. O sucesso da radioterapia em erradicar tumores depende em parte da dose total de radiação dada ao paciente, que é limitada pela tolerância do tecido normal na região que está recebendo tratamento [16].

A radioterapia promove danos ao DNA, principalmente por formação de radicais livres, levando a radiosensibilidade tumoral e do tecido normal. A radiosensibilidade tumoral ocorre quando as células do tumor são encaminhadas à apoptose, uma vez que os danos ao DNA não foram reparados de forma eficaz. A resposta dos tecidos normais a radiação caracteriza-se pela eficiência com que os danos ao DNA nas células normais são reparados, um fator importante na determinação de sua radiosensibilidade. Os efeitos adversos da radioterapia são provocados em geral pela radiosensibilidade do tecido normal [9].

As reações adversas à radioterapia são classificadas como reações agudas ou tardias e definidas de acordo com os critérios do RTOG (**anexo 2**). Por se tratar de um tratamento na região pélvica, os principais efeitos adversos à radioterapia para o câncer de próstata são complicações agudas ou crônicas envolvendo trato urinário, trato gastrointestinal inferior e aparelho sexual [17,18]. Para pacientes com tumores prostáticos as reações agudas mais comuns, que podem ser, por exemplo, sangramento retal, disúria, hematúria, diarréia e dor anal, aparecem durante, logo após o fim da radioterapia ou então até 90 dias depois do fim do tratamento. Os efeitos colaterais tardios se desenvolvem após períodos de latência de meses ou anos [19].

Existe uma variabilidade inter-individual no desenvolvimento de reações adversas no tecido normal, decorrentes da radioterapia. Além de fatores como idade e estilo de vida, as diferenças da resposta individual ao tratamento podem ser atribuídas ao perfil genético de cada indivíduo. Já foi demonstrado em alguns estudos que certas alterações genéticas podem prever o desenvolvimento de reações adversas à radioterapia para o câncer de próstata [14, 15, 20].

Portanto, o objetivo da radioterapia é efetuar controle local do tumor, preservando ao máximo os tecidos adjacentes. Ao longo de vários anos estudos foram realizados com a finalidade de se obter uma dose efetiva para cada tumor, com o menor envolvimento possível do tecido normal adjacente, evitando as reações adversas ao tratamento.

I.2.1 Braquiterapia

Na braquiterapia, implanta-se uma fonte radioativa diretamente no tumor. Esta técnica é bem aceita como opção de tratamento para o câncer de próstata de baixo risco e resulta em altas doses dentro da próstata com uma exposição mínima dos tecidos normais adjacentes. Para o tratamento do câncer de próstata, a abordagem tradicional é a braquiterapia com implante permanente de fontes radioativas de baixas doses, no entanto mais recentemente tem sido utilizado um tipo de braquiterapia de alta dose cujo implante distribui a radiação por um tempo específico e é retirado em seguida [10]. No entanto, este tipo de tratamento é considerado invasivo, deixando assim de ser a opção de escolha para o tratamento do câncer de próstata.

I.2.2 Radioterapia externa

A radioterapia externa é considerada atualmente como o tratamento padrão por radiação para adenocarcinomas prostáticos desde os últimos 40 anos. As técnicas de radioterapia externa disponíveis são: radioterapia convencional, radioterapia conformacional de três dimensões (3D-CRT), radioterapia de intensidade modulada (IMRT) e radioterapia guiada por imagem (IGRT). Com o desenvolvimento tecnológico e de sistemas de planejamento do tratamento, um maior número de pacientes tem sido tratado com as técnicas de radioterapia conformacional 3D e IMRT. Estas técnicas estão sendo cada vez mais utilizadas por serem tratamentos não cirúrgicos, com uma baixa morbidade e custo acessível. Em termos de qualidade de vida, a utilização destas técnicas preserva a função sexual em alguns pacientes e permitem uma recuperação mais rápida [21].

I.2.2.1 Radioterapia Convencional

A radioterapia convencional envolve imobilização, simulação, planejamento e algumas vezes verificação antes de começar o tratamento. Durante a simulação, o paciente permanece deitado em posição supina. Algumas vezes é necessária imobilização do paciente, especialmente se o planejamento for de um pequeno campo. Normalmente usa-se a técnica chamada de “4-field box” (**Figura 1**), ou seja, irradia-se quatro campos, sendo dois laterais opostos e outros dois, anterior e posterior. Outras técnicas de irradiação incluem quatro campos opostos oblíquos ou arcos bilaterais para evitar que doses cheguem à bexiga e ao reto. No entanto, são comuns modificações no planejamento do tratamento. A maior parte das técnicas convencionais utiliza uma dose única. Como a dose de radiação é limitada pelo tecido normal adjacente é apropriado não usar-se doses muito maiores que 70 Gy, pois não há vantagens terapêuticas levando a danos dos tecidos adjacentes e conseqüente efeitos adversos ^[21].

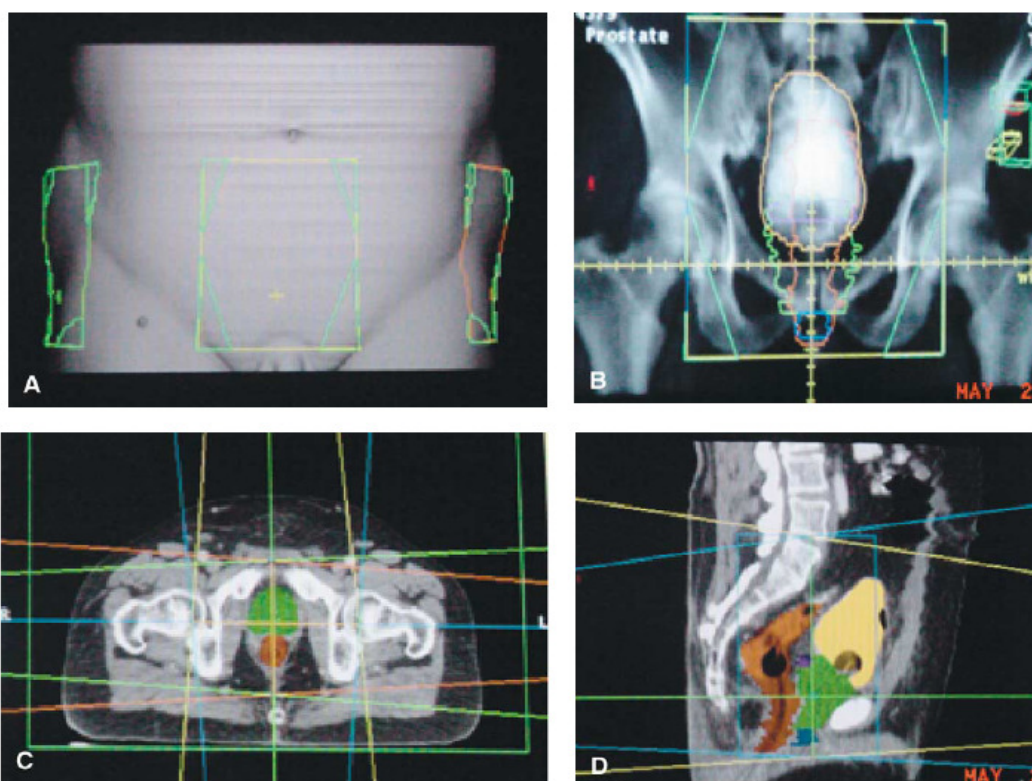


Figura 1. Técnica “4-field box” para próstata e nódulos da pelve. (A) Superfície da pelve como os Campos em verde. (B) Radiografia digital anterior e posterior, mostrando a próstata em verde, bexiga em amarelo escuro, e o reto em laranja. (C) Visão axial dos quatro feixes: amarelo-campo anterior, azul: campo posterior, verde: campo da direita e laranja: campo da esquerda. (D) Visão sagital da pelve mostrando os feixes anteriores e posteriores ^[21].

O planejamento da radioterapia convencional é realizado de acordo com o estadiamento dos tumores confinados à próstata (**Anexo 4**). As doses mínimas para radioterapia exclusiva de câncer de próstata são de 64 Gy para tumores T1a, 66-70 Gy para T1b, c e aproximadamente 70-72 Gy para T2-T3. Para tumores T4, o tratamento é usualmente paliativo e uma dose tumoral mínima pode ser empregada (60-65 Gy) para diminuir a morbidade. A maioria das instituições emprega frações de 1,8 à 2 Gy, cinco frações por semana ^[9].

I.2.2.2 Radioterapia 3D

Com o advento da radioterapia conformacional 3-D foi possível diminuir o volume de tecidos normais expostos a altas doses de radiação, sem comprometer a aplicação de doses mais altas ao tumor. A técnica de radioterapia 3D visa distribuir espacialmente a dose de radiação de acordo com a conformação 3D precisa do tumor. É possível calcular a dose para cada ponto do tecido irradiado usando-se algoritmos matemáticos. Além disso, a precisão desta técnica, reduz o risco de uma sub-dosagem do tumor e permite a orientação dos feixes de radiação somente na área tumoral, sem comprometer em grandes extensões o tecido normal adjacente como na radioterapia convencional ^[22]. Vários estudos validaram a superioridade da radioterapia conformacional 3-D sobre a radioterapia convencional em termos de controle bioquímico do tumor e toxicidade no tratamento do câncer de próstata localizado ^[23].

I.2.2.3 Radioterapia de Intensidade Modulada

O conceito de radioterapia de intensidade modulada (IMRT) foi primeiramente proposto na década de 60, mas só se tornou viável a partir das décadas de 80 e 90 com o desenvolvimento de tecnologias, principalmente na área da computação. A IMRT se refere a uma técnica específica baseada em radioterapia com acelerador linear, onde feixes de radiação são modulados de maneira a produzir e distribuir altas doses de radiação no tumor (**Figura 2**). O

principal objetivo da IMRT é o de reduzir as doses de radiação no tecido normal, preservando-se ao máximo sua função, sem diminuir as altas doses aplicadas ao tumor. Intensidades variáveis de doses podem ser empregadas em cada campo tumoral de acordo com o planejamento conformacional. Tanto para IMRT quanto para 3DCRT são designados alvos específicos e estruturas que devem ser evitadas. A IMRT se difere da radioterapia conformacional 3D, já que na última são empregados feixes de mesma intensidade ao tumor, mas com grandes margens. Já o planejamento da IMRT requer que o físico defina doses específicas tanto para o alvo, como para as estruturas a serem evitadas. O *software* de planejamento cria padrões de intensidade para cada feixe a fim de se atingir a dose prescrita [24].

Um estudo que acompanhou pacientes tratados com IMRT e radioterapia 3D entre os anos 1988 a 2000 mostrou que mesmo com doses altas de radiação, os pacientes raramente apresentaram toxicidade tardia grave. Altas doses de radioterapia foram associadas ao aumento de toxicidade grau 2 nos tratos gastrointestinal e urinário, mas o risco de proctite foi baixo quando os pacientes eram tratados com IMRT [25].

Outro estudo realizado nos EUA acompanhou por 10 anos pacientes tratados com IMRT, e concluiu que altas doses de IMRT (81Gy) são bem toleradas e estão associadas com excelente controle tumoral a longo prazo em pacientes com tumores de próstata localizado [26].

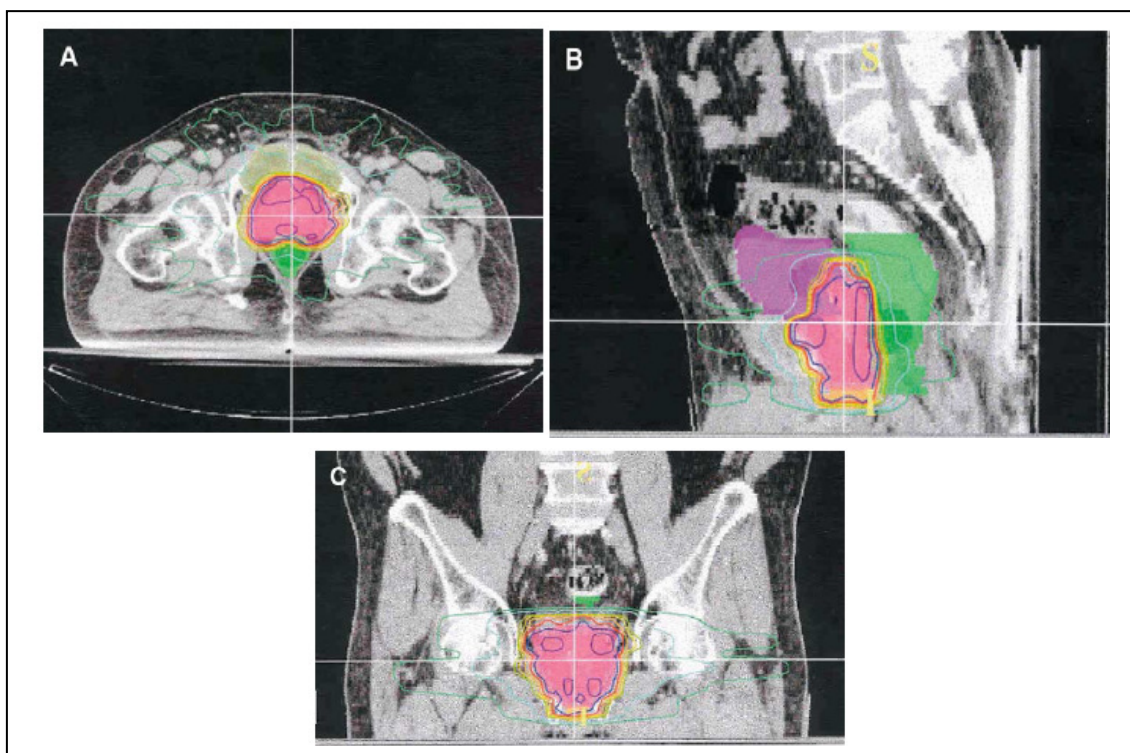


Figura 2. Técnica de radioterapia de intensidade modulada para câncer de próstata. Figura mostrando os feixes de doses altas em rosa, contornando o formato da próstata, enquanto os feixes que atingem o reto e a bexiga em verde e violeta, respectivamente, têm doses mais baixas. (A) visão axial, (B) visão sagital e (C) visão coronal ^[21].

I.2.2.4 Radioterapia guiada por imagem

Estruturas normais da próstata e o tumor podem se mover durante o tratamento, isso ocorre, por exemplo, durante o movimento da bexiga ao ser preenchida ou mesmo pelos movimentos peristálticos e do reto ^[27]. Desta forma, a radioterapia guiada por imagem (IGRT) possibilita planejar o tratamento por meio de equipamentos de imagem antes ou mesmo durante a etapa de irradiação. As imagens podem ser obtidas usando tomografia computadorizada, ressonância magnética, ultrassonografia e raios-X. Um estudo recente, realizado em Melbourne na Austrália, mostrou que pacientes tratados exclusivamente com IGRT tiveram menor incidência de efeitos adversos agudos durante o tratamento quando comparados com pacientes que não foram tratados usando IGRT ^[28].

I.3 - Dano ao DNA e Vias de Reparo

A molécula de DNA, por ser quimicamente instável, está sujeita a numerosas alterações resultantes de fatores químicos ou físicos. Lesões ao DNA podem ocorrer espontaneamente devido à instabilidade das ligações químicas dos próprios nucleosídeos, ou por meio de produtos do metabolismo celular, tais como espécies reativas de oxigênio resultantes do processo de respiração celular. Além disso, o material genético está sujeito a inúmeras alterações exógenas causadas principalmente por fatores físicos como a luz ultravioleta (UV) e as radiações ionizantes e também por fatores químicos, tais como, agentes quimioterápicos utilizados no tratamento contra o câncer, cigarro, poluição e certos tipos de alimentos. Todos os componentes do DNA estão sujeitos a alterações, no entanto as alterações mais importantes são as lesões de bases, que interferem diretamente no sequência gênica [29].

A oxidação dos componentes do DNA, resultando em espécies reativas de oxigênio, é uma das maiores fontes de indução de dano à molécula de DNA, e como foi dito anteriormente pode ser gerada por uma série de fatores, incluindo metabolismo celular, alguns produtos químicos, drogas, radiação ionizante e luz solar. As espécies reativas de oxigênio mais comuns são os radicais de hidroxila, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e radicais superóxidos. As modificações no DNA podem ser quebras de cadeias, ligações químicas cruzadas entre as fitas de DNA (*crosslinks*), formações de sítios apurínico/apirimidínicos (sítios AP) e oxidação de bases [29].

Fatores químicos exógenos podem levar principalmente aos *crosslinks*. A radiação ionizante por sua vez pode gerar radicais altamente reativos e causar uma série de lesões no DNA, parecidas com aquelas geradas durante o metabolismo oxidativo incluindo danos aos anéis de purina e pirimidina, sítios AP e quebras de fitas simples ou dupla de DNA. O tipo de lesão induzida pelas radiações ionizantes mais danosa para as células é a quebra da fita dupla do DNA, que pode levar a célula à apoptose, caso o erro não seja reparado [30].

Para prevenir as conseqüências severas do dano ao DNA e recuperar a perda de informações, existe uma variedade de estratégias e uma

rede complexa de mecanismos de reparo, que dependem do tipo de dano na estrutura de dupla-hélice do DNA. Uma das vantagens da dupla hélice do DNA é a redundância. Se uma fita é lesada, a outra pode ser usada para recuperar a informação. A maioria dos sistemas de reparo utiliza um mecanismo de excisão, no qual o dano é removido e a fita é sintetizada novamente usando a outra fita como molde. No entanto, as quebras de fitas duplas são mais danosas, e necessitam de processos mais complexos de reparo uma vez que não possuem um sistema de *backup*, como ocorrem nas quebras de fitas simples. Defeitos no DNA durante a replicação ou transcrição são reparados mais rapidamente do que aqueles que ocorrem no DNA quando a cromatina está condensada. Isto acontece porque o DNA não condensado está acessível para as enzimas que atuam nas vias de reparo [30].

No genoma existem genes específicos relacionados aos mecanismos de reparo. Assim que os danos são localizados, as proteínas das vias de reparo são recrutadas e se ligam a regiões próximas ao local do dano, atraindo outras moléculas para formar complexos que são capazes de reparar o dano. A maioria das pequenas alterações das bases nitrogenadas do DNA, como as resultantes de oxidação por espécies reativas de oxigênio, metilação e desaminação, assim como quebras de fitas simples do DNA, são reparados por meio de excisão de bases (BER, do inglês: *Base Excision Repair*). Outro tipo de reparo é por excisão de nucleotídeos (NER, do inglês: *Nucleotide Excision Repair*), que é o processo de reparo mais importante do DNA e remove o maior espectro de danos genômicos, incluindo fotoprodutos induzidos por UV, adutos químicos, como os induzidos pelo cigarro e certos tipos de ligações cruzadas entre duas cadeias de DNA. O reparo de emparelhamento errôneo (MMR, do inglês; *MisMatch Repair*) é um mecanismo crítico responsável pela manutenção da integridade genômica por meio da correção do emparelhamento errôneo de bases (*mismatches*) e da inserção ou exclusão de nucleotídeos ou trechos inteiros da molécula de DNA durante a replicação ou recombinação do DNA, assim como lesões ao DNA resultantes de vários tipos de estresses internos ou externos. Por fim, duas vias distintas, mas interconectadas, podem reparar quebras de fita dupla de DNA: o reparo por recombinação homóloga (HR, *Homologous Recombination*) e o reparo por junção de extremidades não homólogas (NHEJ, *Non-Homologous End-Joining*).

Mesmo com mecanismos distintos de ação das vias de reparo, os substratos usados não são totalmente específicos, ou seja, certas proteínas são usadas em mais de uma via de reparo ^[31].

Um processo que pode ocorrer em resposta ao dano do DNA, é a tolerância. Os danos não reparados antes da replicação podem levar à parada do ciclo celular para revisão. Neste momento, mecanismos que ainda não são bem conhecidos, inativam as enzimas DNA polimerases da replicação e ativam polimerases alternativas capazes de replicar o DNA lesionado. Este processo, que envolve DNA polimerases de baixa especificidade, resulta em tolerância ao dano do DNA ^[32].

Os danos ao DNA não reparados ou reparados de forma imprópria podem levar a instabilidade genômica e desregulação das funções celulares. Ao detectar o dano, os vários sensores celulares transmitem esta informação a uma família de proteínas-quinases muito grande. Um exemplo destas proteínas é a ATM, que atua no ponto de checagem G2 do ciclo celular. Quando a ATM e outras quinases como ATR são informadas do dano no DNA, elas fosforilam ao menos dois substratos importantes: a proteína supressora de tumor p53 e uma proteína quinase chamada Chk1 (do inglês: *Checkpoint Kinase 1*). Portanto, as respostas aos danos no DNA incluem proteínas que podem ativar a maquinaria nos pontos de checagem do DNA. Uma rede complexa de vias de sinalização é ativada ao detectar o erro e assim param o ciclo celular e podem levar a correção do erro ou a apoptose ^[33].

I.4 - Gene TP53

Uma das proteínas chave das vias de reparo do DNA é a proteína supressora de tumor p53 (**Figura 3**).



Figura 3. Estrutura da proteína p53, que consiste de 393 resíduos de aminoácidos com 5 domínios bem definidos. O domínio de transativação, responsável pela ligação do *MDM2*. Um domínio rico em prolina, região altamente conservada. O domínio de ligação ao DNA. Um domínio de tetramerização, seguido por domínio básico não estruturado (Modificado do site http://p53.free.fr/p53_info/p53_Protein.html)^[34]

O gene TP53 foi o primeiro gene supressor de tumor identificado. Está situado no braço curto do cromossomo 17(p13.1) (**Figura 4**). Trata-se de um gene altamente conservado, apresentando homólogos em diferentes espécies e codifica uma proteína nuclear com 43 kDa, no entanto possui migração anômala devido a sua conformação, sugerindo que seu peso molecular seja 53 kDa por esse motivo é denominada proteína 53 ou p53^[35].

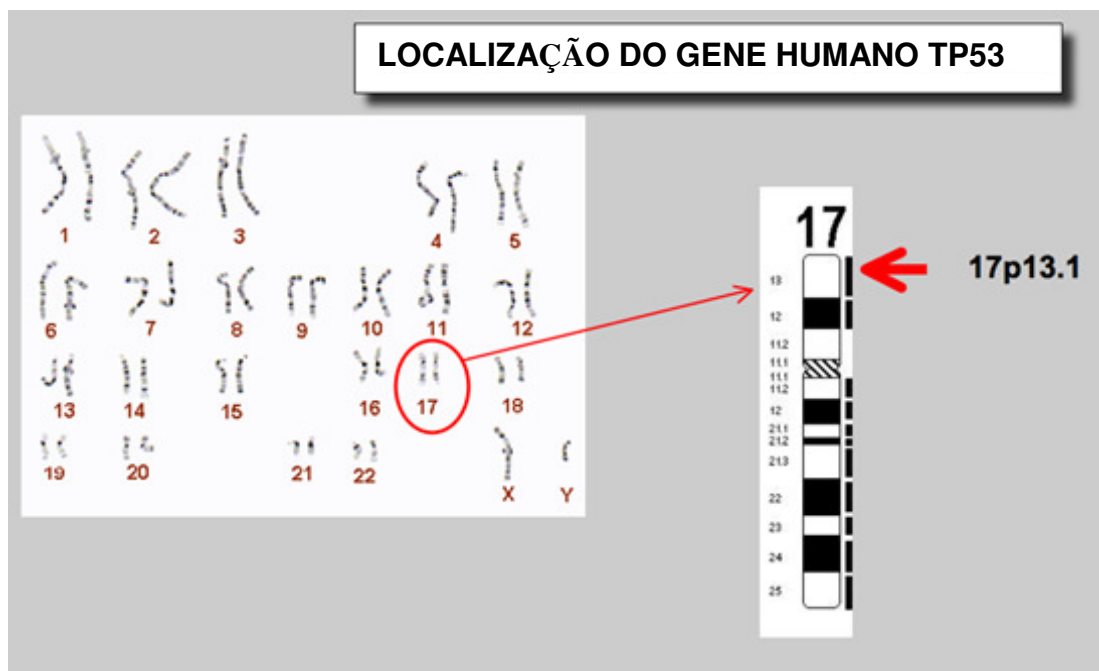


Figura 4. Localização cromossômica do gene *TP53*. O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossoma 17 (17p13), uma região que sofre deleção em cânceres humanos. (Modificado do site: http://p53.free.fr/p53_info/p53_gene.html)^[34].

Nos últimos anos, várias isoformas de p53 foram descritas. Já existe um total de 12 isoformas caracterizadas, que podem ter sido geradas a partir do *splicing* alternativo após a transcrição [36]. No entanto, o conhecimento acerca das funções e atividades biológicas destas isoformas ainda é bem limitado. Novos estudos são necessários a fim de desvendar se existe uma relação destas isoformas de p53 com o prognóstico e tratamento do câncer. As isoformas descritas estão representadas na **Figura 5**:

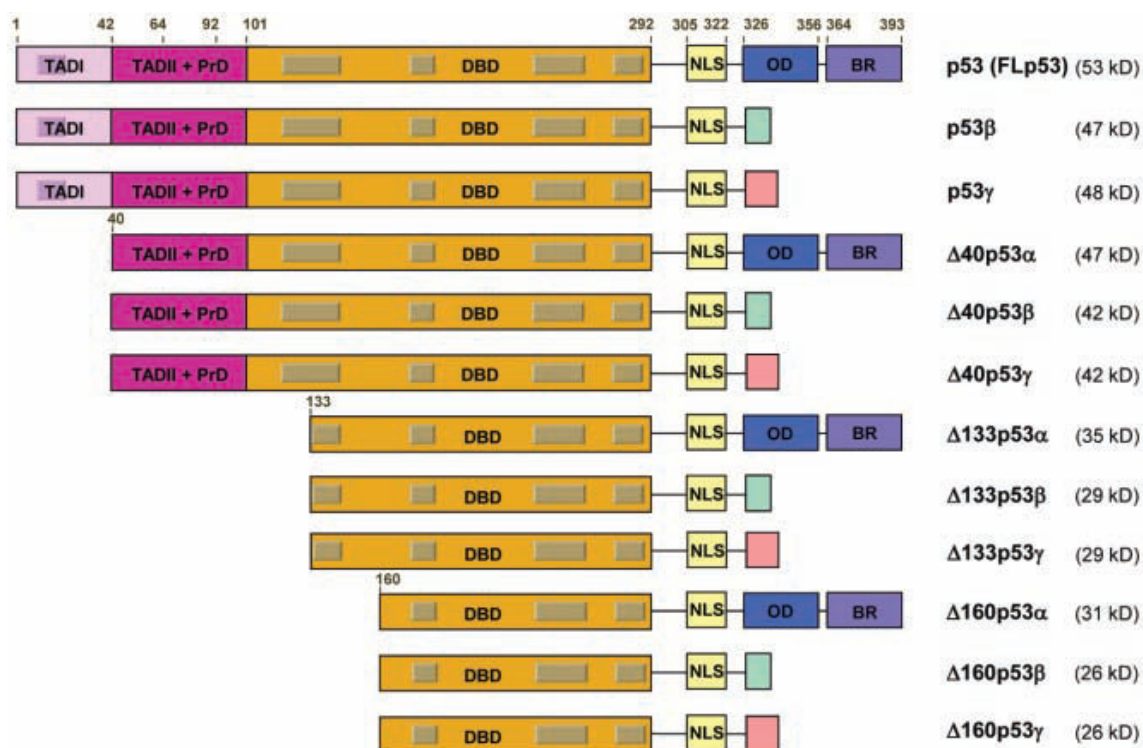


Figura 5. Representação esquemática das 12 isoformas de p53 humanas identificadas, com seus domínios e nomenclatura. TAD são domínios de transativação e DBD são domínios de ligação ao DNA. O domínio c-terminal compreende o sinal de localização nuclear (NLS), um domínio de oligomerização (OD) e uma região básica (BR). Os quadrados cinza representam 5 regiões altamente conservadas que definem a família de p53. Os domínios C-terminal de p53β (DQTSFQKENC) e p53γ (MLLDLRWCYFLINSS) estão indicados pelos quadrados verde e rosa, respectivamente. O peso molecular de cada isoforma de p53 também está indicado [36].

A proteína supressora de tumor p53 responde a estresses celulares diversos regulando genes que induzem a parada do ciclo celular na fase G1/S, apoptose, senescência, reparo do DNA ou mudanças no metabolismo. A p53 também participa em outros pontos de checagem durante a fase G2 e mitose.

O DNA ao se expor à radiação ionizante altera sua cromatina. As proteínas sensoras (RAD9, RAD1, RAD17 e HUS1) reconhecem este dano e

sinalizam para quinases, como a ATM, para que estas fosforilem e ativem a proteína p53. A p53 ativada atua em alvos em cascata, principalmente induzindo a transcrição do gene p21 que impede a célula de entrar na fase S, causando atraso no ciclo celular e permitindo o reparo do DNA. Quando o dano ao DNA está além da possibilidade de reparo, encaminha a célula para apoptose (**Figura 6**).

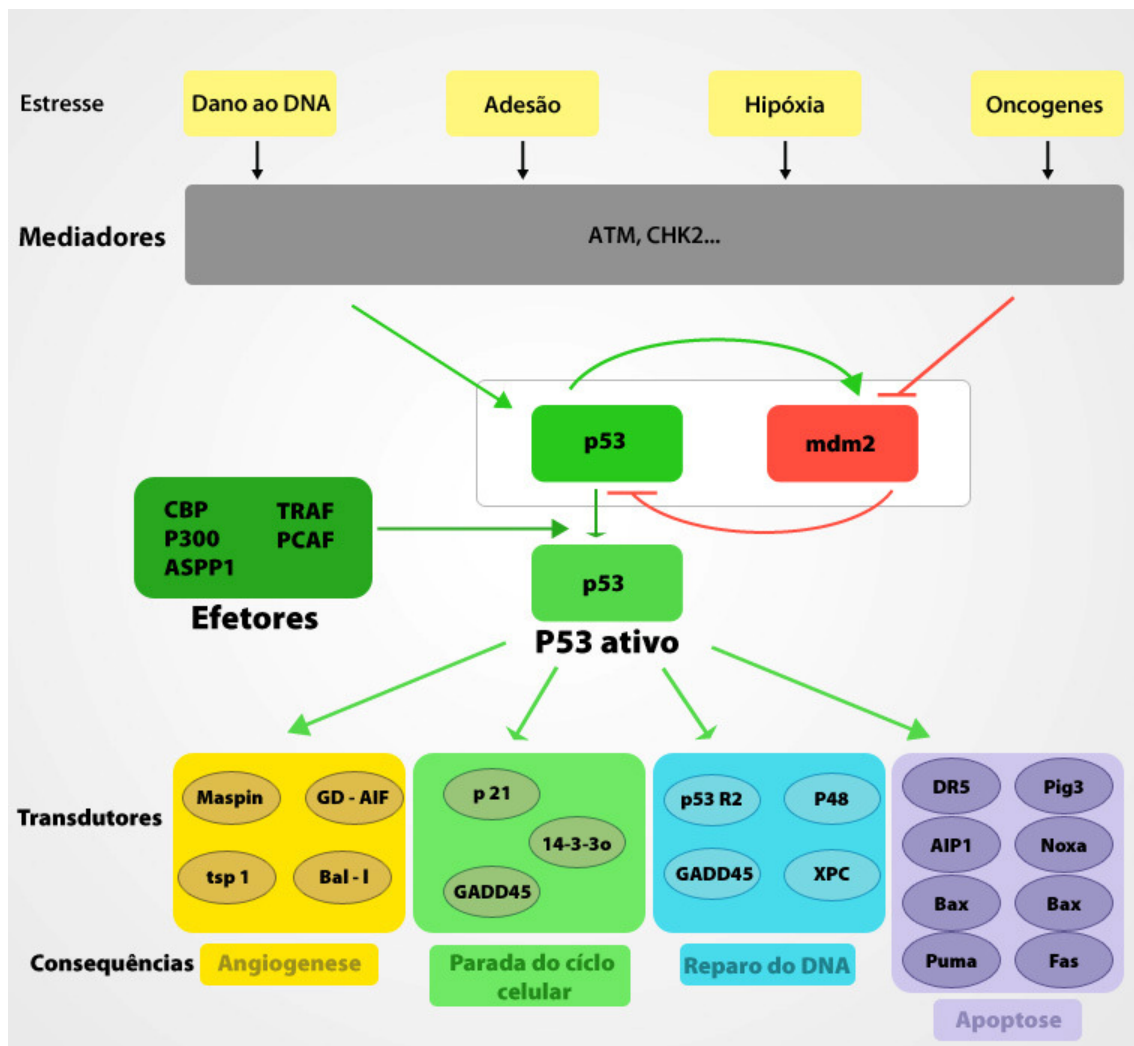


Figura 6. Esquema mostrando as vias de sinalização de *TP53* e suas conseqüências assim como os genes envolvidos. (Modificado de: http://p53.free.fr/p53_info/p53_Pathways.html)^[34].

A molécula Murine Double Minute-2 (MDM2) é um dos responsáveis pela regulação da degradação da proteína p53 através de via de ubiquitinação e também por bloqueio direto da atividade transcritora da p53^[37]. Quando submetidas a algum tipo de estresse, por exemplo, hipóxia ou

radiação, a molécula de ATM pode fosforilar p53 e MDM2 aumentando assim os níveis de p53 como consequência da estabilização da proteína e também do aumento na sua síntese^[38], permitindo atraso no ciclo celular (**Figura 6**).

I.4.1 Polimorfismos no gene *TP53*

Muitos polimorfismos foram identificados no gene *TP53*, sendo a maioria polimorfismos intrônicos, cujas consequências funcionais são ainda desconhecidas. Uma das variantes polimórficas mais bem estudadas, descrita em 1987 por Matlashewski e colaboradores, é a troca de Prolina (Pro) por Arginina (Arg) no códon 72 de *TP53*^[39]. A proteína com o aminoácido Arg72 se mostra mais eficiente ao induzir apoptose, do que a variante Pro72, provavelmente devido à melhor capacidade de interação com *MDM2*^[40].

Alguns estudos já demonstraram uma possível associação entre o polimorfismo no códon 72 de *TP53* e o risco de desenvolvimento de certos tumores, tais como tumores endometriais, gástricos e de fígado em algumas populações^[41-43]. No entanto a mesma associação não foi obtida para tumores de próstata, cânceres cervicais e colorretais^[44-46]. Quanto à associação entre o polimorfismo do códon 72 e o desenvolvimento de reação do tecido normal à radioterapia, apesar de fortes hipóteses, tem sido pouco investigada. Tan et al. (2006) demonstrou que tal polimorfismo pode estar relacionado às reações adversas agudas à radioterapia em pacientes com câncer de mama^[47].

Além do polimorfismo do códon 72, existem outros polimorfismos de *TP53* que vem sendo investigados mais profundamente nos últimos anos. Um exemplo disso é o polimorfismo que ocorre no intron 3, conhecido como *TP53* PIN3^[48]. Este polimorfismo foi associado ao risco aumentado de desenvolvimento de câncer de ovário e de câncer colorretal^[49, 50]. Outros polimorfismos foram descritos no intron 3, entretanto, não existem estudos que mostrem uma relação entre estes polimorfismos e o câncer.

I.5 – Gene *ATM*

O gene *ATM* (ataxia-telangiectasia mutated) ^[51] foi primeiramente detectado em pacientes portadores da síndrome Ataxia-telangiectasia. A Ataxia-telangiectasia é uma desordem autossômica recessiva caracterizada por neuro-degeneração, imunodeficiência, hipogonadismo, envelhecimento precoce, sensibilidade à radiação e suscetibilidade ao câncer. Os portadores possuem uma instabilidade genômica causada por uma resposta não efetiva às quebras de cadeia dupla do DNA, manifestada pela hipersensibilidade à radiação ionizante e por uma habilidade diminuída em ativar as vias de reparo celular ^[52].

Localizado no cromossoma 11 (11q22.3), como mostra a **Figura 7**, o gene *ATM* codifica uma proteína-quinase importante de ponto de checagem do ciclo celular. Essa enzima faz parte da família de quinases PI3/PI4 e funciona como um regulador de outras proteínas, incluindo as proteínas supressoras de tumor p53 e BRCA1, a quinase de ponto de checagem CHK2, as proteínas de checkpoint RAD17 e RAD9 e as proteínas de reparo do DNA, NBS1 e SMC1. *ATM* e outra enzima da mesma família, *ATR*, são conhecidas como principais controladores dos pontos de checagem, durante a resposta celular ao dano do DNA e para manter a integridade do genoma humano. Danos no DNA levam à ativação de *ATM* que fosforila e ativa *SMC1*, que é crucial no controle da replicação celular e reparo após o dano do DNA ^[53].

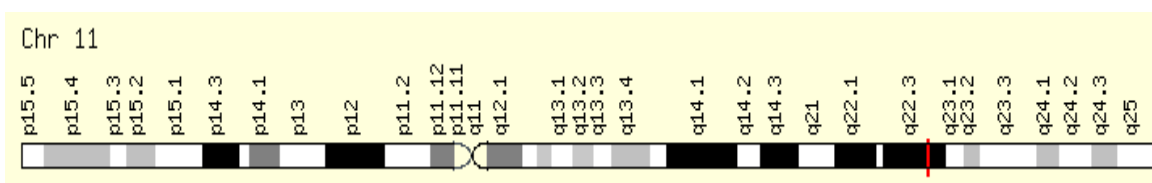


Figura 7. Localização cromossômica do gene *ATM*. Este gene localiza-se no braço longo do cromossoma 11 (11q22.3). Modificado do site: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=atm> ^[54]

Em sua forma inativa, a proteína de *ATM* é um dímero com peso molecular de cerca de 350KDa. Nesta configuração o domínio quinase de um monômero é inativado pelo domínio FAT do outro. O domínio FAT (*focal adhesion targeting*) é uma região de aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos, conservada entre as quinases da família PI3. Após a exposição à

radiação ionizante ou outro tipo de agente que introduza quebras de dupla hélice no DNA, a proteína ATM responde com um rápido aumento de sua atividade quinase e simultaneamente é ativada por auto-fosforilação da serina na posição 1981 no domínio FAT, para que ocorra a dissociação da molécula em monômeros [55].

I.5.1 Polimorfismos no gene *ATM*

Mais de 80 polimorfismos foram identificados no gene *ATM*, o que o torna um dos genes mais variáveis de todo o genoma humano [56]. Um dos polimorfismos mais freqüentes é o que ocorre no nucleotídeo 5557 correspondente ao exon 39 do gene (rs1801516). Caracteriza-se por uma troca de Guanina (G) por Adenina (A), o que resulta numa mudança do aminoácido Ácido Aspártico (Asp) para Asparagina (Asn) na posição 1853 da proteína (D1853N) [57]. Não existem evidências de que este polimorfismo esteja associado ao risco de câncer de próstata, no entanto outro polimorfismo (3161 C>G) no mesmo gene parece ter um papel importante no desenvolvimento do câncer de próstata [58].

Estudos genéticos em pacientes com câncer de mama mostraram uma associação importante entre polimorfismos do gene *ATM* e o risco de desenvolvimento de reações adversas à radioterapia [57, 58]. Entretanto, para o câncer de próstata, os dados são ainda inconsistentes. Cessaretti e colaboradores [14] encontraram uma associação entre alterações no gene *ATM*, incluindo o polimorfismo no códon 1853 e o desenvolvimento de proctite e sangramento retal induzidos pela radioterapia.

I.6 – Importância dos estudos em radiogenômica

Os efeitos colaterais secundários a radioterapia variam muito entre os indivíduos e muitos trabalhos mostram que a hipersensibilidade observada em alguns casos pode estar relacionada a fatores genéticos [61-63]. Um limitado número de estudos de coorte analisou a relação entre alterações genéticas e a radiosensibilidade de tecidos normais [64]. Os dados até o momento são insuficientes, mostrando que os conhecimentos atuais estão longe de explicar as bases genéticas da variabilidade das reações adversas dos tecidos normais [65, 66].

Por meio da biologia molecular, genética e radiobiologia clínica, Andreassen e colaboradores [67] levantaram a hipótese de que a radiosensibilidade dos tecidos normais deve estar associada a um então chamado complexo traço-dependente que agrega o efeito de muitos determinantes genéticos mínimos, e os polimorfismos de base única (*SNPs*) poderiam corresponder a parte destes componentes genéticos. Houve a tentativa de classificar estas variações genéticas em dois grupos: as que influenciariam a radiosensibilidade em todos os tecidos normais e outras que determinariam este efeito de forma diferente em determinados tipos de tecidos.

Um estudo recente realizado com pacientes afro-descendentes americanos e portadores de câncer prostático identificou vários polimorfismos de base única associado à disfunção erétil após a radioterapia [13]. Este estudo não encontrou associação de polimorfismos de *ATM* e *TP53* com disfunção erétil. Entretanto, não foram estudados outros tipos de efeitos adversos que se correlacionem com *SNPs* destes dois genes, nem tampouco foram incluídos pacientes de outras etnias. Percebe-se, portanto a importância deste estudo já que pretendemos correlacionar pacientes de várias etnias e uma série de efeitos adversos da radioterapia.

É relevante salientar que não existem muitos trabalhos experimentais sobre o assunto e nenhum foi realizado ainda no estado de Goiás, de modo que se trata de uma área pouco explorada, embora sua importância seja inquestionável. Na prática clínica, o ideal a ser alcançado se traduziria por duas situações opostas: 1) pacientes que teriam a radioterapia contra-indicada ou sua dose total prescrita reduzida por serem geneticamente

predispostos a desenvolver efeitos colaterais intensos e; 2) pacientes nos quais se poderia fazer um escalonamento de dose aumentando a chance de resposta por se tratarem de pacientes com genótipo radiorresistente.

A evolução da genética molecular veio ao longo dos anos ampliando a compreensão do processo biológico que leva uma célula normal a tornar-se uma célula maligna, com propriedades invasivas e metastáticas. Entretanto, em relação à radioterapia, a genética e todos os conhecimentos gerados até o momento ainda não conseguiram levar a alterações da conduta clínica, não apenas para um aumento da resposta do tumor à radiação, mas também para reduzir os efeitos colaterais que muitas vezes levam ao óbito de pacientes sem evidência de doença maligna ativa.

Após a introdução de novas modalidades de radioterapia, como 3D-CRT e IMRT, houve uma significativa melhoria no tratamento do câncer de próstata. Entretanto, os gastos destas novas tecnologias ainda são elevados. A diminuição dos efeitos adversos da radioterapia por meio da individualização da dose baseada no perfil genético do paciente poderá, portanto contribuir, juntamente com o diagnóstico precoce, para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes e diminuição das taxas de óbito.

A Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) é o único centro de atendimento de alta complexidade em oncologia (CACON) com uma unidade hospitalar no Estado de Goiás e atende a pacientes de oito estados dentre os mais carentes do Brasil. Em 2010, o Hospital Araújo Jorge gastou 1.648.601,70 reais em internações para tratamento clínico de pacientes do SUS, sendo deste total 634.556,30 reais pagos pelo SUS e o restante (1.014.045,40 reais) sendo contabilizados como prejuízo para a instituição, que é uma empresa privada e filantrópica que sobrevive do que produz. Ensaios moleculares capazes de detectar polimorfismos relacionados à radiosensibilidade poderiam minimizar os gastos com intercorrências durante o tratamento. Isso significaria uma grande economia para o Sistema Único de Saúde.

II - OBJETIVOS

Geral

O principal objetivo deste trabalho foi investigar uma possível associação entre polimorfismos dos genes *TP53* e *ATM* e as reações adversas agudas e crônicas apresentados por 50 pacientes portadores de câncer de próstata submetidos à radioterapia.

Específicos

- 1- Determinar a frequência de polimorfismos nos genes *TP53* e *ATM* em pacientes com tumores de próstata;
- 2- Verificar as possíveis associações dos polimorfismos estudados e as reações agudas e crônicas do tecido normal após a radioterapia de pacientes com câncer de próstata.
- 3- Revisar e atualizar a bibliografia sobre a associação entre os genes *TP53* e *ATM* com a toxicidade aguda e crônica em pacientes com câncer prostático tratados com radioterapia;
- 4- Comparar os resultados obtidos com outros estudos; referente à associação de toxicidade à radiação com perfil genético de pacientes com câncer de próstata tratados com radioterapia.

III - METODOLOGIA

III.1 - Seleção de pacientes

Para o estudo foram selecionados 50 pacientes do Serviço de Radioterapia, do Hospital Araújo Jorge (HAJ), da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG). As informações clínicas dos pacientes foram coletadas a partir da revisão de prontuários e fichas de teleterapia do Serviço de Arquivo Médico do HAJ, da ACCG. Todos os pacientes selecionados tiveram câncer de próstata diagnosticado histologicamente e foram submetidos à radioterapia há pelo menos cinco anos. Os pacientes foram recrutados entre janeiro de 2009 e novembro de 2010. A amostra de sangue periférico foi obtida após cada paciente ter concordado em participar do estudo e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 1**).

Todos os pacientes incluídos no estudo foram tratados por radioterapia convencional (teleterapia), sendo a dose de radiação diária de 2 Gy. O equipamento utilizado no tratamento foi o ALx1, Clinac 2100C/D (Varian Medical Systems) com fótons de energia de 15mV.

III.2 - Classificação da toxicidade

As reações adversas à radioterapia foram classificadas segundo critérios de morbidade aguda e crônica do *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) (**Anexo 2**) ^[68]. Pacientes que desenvolveram reações adversas agudas ou crônicas classificadas com o escore de RTOG maior ou igual a 2 foram considerados pacientes com efeitos adversos de alto grau.

III.3 - Estimativa de dose nos órgãos de risco

Para calcular a dose biológica efetiva (BED) nos órgãos de risco, bexiga e reto, na resposta tardia, foi utilizada a relação $\alpha/\beta = 3.0$ Gy ^[69,70], aplicando a seguinte fórmula:

$$BED = n.d \left(1 + \frac{d}{\alpha/\beta} \right)$$

Onde,

n= número de aplicações de radioterapia em dias

d= dose total de radioterapia/dia

α/β = dose na qual os componentes linear e quadrático da morte celular são iguais

III.4 - Critérios de inclusão

1. Pacientes com diagnóstico histológico de câncer de próstata.
2. Pacientes submetidos a radioterapia no HAJ, ACCG.
3. Assinatura do TCLE (Res. 196/96 e complementares, CNS).

III.5 - Critérios de exclusão

1. Pacientes com diagnóstico de carcinoma metastático.
2. Pacientes que evoluíram ao óbito.
3. Pacientes encaminhados para radioterapia de serviços externos ao Hospital Araújo Jorge.
4. Pacientes com perda de seguimento deste hospital.
5. Pacientes que não concordaram em assinar o TCLE.

III.6 - Obtenção das amostras

Foram coletadas 50 amostras de 15 mL de sangue periférico heparinizado. Após a coleta, o material foi submetido à extração de DNA e armazenado em microtubos à -20°C.

III.7 - Extração de DNA

A extração de DNA a partir do sangue periférico coletado de cada paciente foi realizada com equipamento e a tecnologia desenvolvidos pela Invitrogen Corporation, CA. O kit *iPrep™ PureLink™ gDNA Blood* possui a tecnologia das *Dynabeads® MyOne™ SILANE* que são *beads* magnéticas monodispersas (1 µm) com uma superfície tipo sílica e uma área de superfície específica. A purificação do DNA da amostra foi obtida utilizando o procedimento de purificação baseado em *beads* e evita o uso de centrífugas e sistemas a vácuo, além de extrair 13 amostras em 30 minutos.

No processo totalmente automatizado, as células foram lisadas com o *Lysis Buffer* e as proteínas digeridas com proteinase K. O lisado foi misturado com *Dynabeads® MyOne™ SILANE* para subsequente ligação do DNA da amostra. O DNA ligado às *beads* magnéticas foi separado do lisado utilizando separação magnética. As *beads* foram lavadas exaustivamente com os tampões de lavagem para remoção dos contaminantes. O DNA genômico foi então eluído com tampão de eluição previsto no kit.

A integridade do DNA foi analisada em gel de agarose 0,8% e fotodocumentado pelo Molecular Imager Gel Doc™ XR System (Bio-Rad Laboratories INC Latin America).

III.8 - Amplificação das regiões gênicas de TP53 e ATM

O SNP do códon 72 do gene *TP53* ocorre no segundo nucleotídeo do códon e este se localiza na posição 466 do mRNA (2640nt). Para amplificação da região de interesse do gene *TP53* (NM_000546) foram definidos um par de oligonucleotídeos. Usamos como *primer sense* a sequência 5' - ATGGAGGAGCCGCAGTCAGA - 3' (posição 10953-10972) e como *primer antisense* 5'- TCTGGAAGGGACAGAAGATGAC - 3' (posição 11457-11479), gerando um fragmento de PCR de 527 pares de base (pb).

Os fragmentos de 527 pares de bases (pb) foram gerados a partir do DNA adicionado com uma *master mix* de AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, CA), a qual contém em sua mistura o tampão para

PCR, deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) e AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, CA). Esta amplificação foi realizada com um ciclo de desnaturação a 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95° C por 30 segundos, 61,3° C por 30 segundos e 72° C por um minuto. Por fim, uma etapa de extensão final de 72° C por sete minutos, sendo que após a finalização dos ciclos a reação foi mantida a 4° C até o congelamento ou até a eletroforese.

O polimorfismo de base única do gene *ATM* ocorre com a substituição da guanina pela adenosina no 5557^o nucleotídeo do quadro de leitura aberto (posição 5942 do mRNA do gene *ATM*, pois o códon de iniciação do mRNA está na posição 386), levando a uma alteração na proteína com a troca do aminoácido ácido aspártico (Asp/D) pela asparagina (Asn/N) no códon 1853.

Para amplificação da região de interesse do gene *ATM* (NM_000051.3) foi definido um par de oligonucleotídeos, dos quais foram usados como *primer sense* a sequência 5' – AGCAGTATGTTGAGTTTATGGC - 3' (posição 81700-81721) e *primer antisense* 5'- TGAATCCAAGTTTGCAGG - 3' (posição 82003-82017), gerando um fragmento de PCR de 317 pares de base (pb).

Os fragmentos de 317 pares de bases foram gerados a partir de reação de PCR do DNA total do paciente utilizando a *master mix* de AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, CA), a qual contém em sua mistura o tampão para PCR, deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) e AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, CA). Esta amplificação foi realizada com um ciclo de desnaturação a 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 94° C por 30 segundos, 54,3° C por 30 segundos e 72° C por um minuto. Por fim, uma etapa de extensão final de 72° C por sete minutos, sendo que após a finalização dos ciclos a reação foi mantida a 4° C até o congelamento ou à eletroforese.

Para avaliação dos amplicons, os mesmos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8%. As reações de PCR foram primeiramente submetidas à purificação pelo kit de purificação da Invitrogen™ e tratadas com o reagente ExoSAP-IT (Invitrogen, CA) para remover os dideoxinucleotídeos trifosfato (ddNTPs) e os oligonucleotídeos restantes da

reação de PCR. Após a purificação, os fragmentos de interesse foram quantificados utilizando o bioanalisador de DNA Nanodrop (ThermoScientific, USA), para adequação da concentração de DNA de acordo com a exigência do kit de seqüenciamento.

III.9 - Reação de Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento foram definidos oligonucleotídeos internos sense. Para o gene TP53 foi utilizado o *primer* interno com a seguinte sequência: 5' - ATGGGACTGACTTTCTGCT - 3' e para o gene *ATM*, o *primer* definido foi: 5'- TTGGGTGGATTTGTTTGT -3'. O kit de seqüenciamento usado nas reações foi o BigDye Terminator v. 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), que fornece os componentes necessários para reação de seqüenciamento em uma pré-mistura pronta, que deve ser adicionada juntamente com o produto de PCR purificado e *primer*. A reação de seqüenciamento foi realizada com um ciclo de desnaturação a 96° C por um minuto, seguido de 25 ciclos a 96° C por 10 segundos, 52,9° C para *ATM* e 55,3° C por cinco segundos e 60° C por quatro minutos. Após a finalização dos ciclos a reação foi mantida a 4° C.

Antes da eletroforese capilar as amostras foram submetidas à purificação utilizando o Kit de purificação BigDye X-terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA) para remoção completa de ddNTPs, segundo o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, as amostras analisadas foram submetidas à eletroforese capilar no bioanalisador de DNA, ABI 3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando polímero POP-7 para ABI 3130 e 3130xL (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os dados obtidos foram analisados pelo Software Seqscape v. 2.6 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Após o seqüenciamento do fragmento do gene *TP53*, foram analisados outros polimorfismos descritos nesta região de 527 pares de bases amplificada por PCR. Tais polimorfismos estão representados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Polimorfismos do gene *TP53* descritos na região de 527 pares de bases amplificada por PCR.

Exon/Intron	Descrição Genômica	Descrição do código	Descrição Protéica	Efeito	Referência
Intron 3	g.11259_11274Ins16	c.96+41_96+56Ins16	p.?	Intrônico	Lazar et al, 1993 ^[48]
Intron 3	g.11299C>A	c.97-29C>A	p.?	Intrônico	-
Intron 3	g.11322C>T	c.97-6C>T	p.?	Intrônico	-
Exon 4	g.11370C>T	c.139C>T	p.P47S	<i>missense</i>	Felley-Bosco et al, 1993 ^[71]
Exon 4	g.11446C>G	c.215C>G	p.P72R	<i>missense</i>	Mattashewski et al, 1987 ^[39]

III.10 - Análise estatística

As análises foram realizadas com o pacote de software estatístico SigmaStat versão 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Após coleta dos dados em formulário pré-testado, foi realizada a caracterização da amostra por meio de cálculos de medida de dispersão e tendência central. As variáveis foram testadas para verificação de possíveis associações por meio dos testes *t* de student para variáveis contínuas paramétricas ou Mann Whitney quando estas não tinham distribuição normal. Para as variáveis categóricas foram utilizados teste do chi-quadrado (χ^2) e análise do risco relativo para estimar as possíveis associações. A associação entre os polimorfismos de *ATM* e *TP53* e as reações adversas à radioterapia foram estimadas pelo teste de chi-quadrado (χ^2) ou teste exato de Fisher e análise do risco relativo para estimar as possíveis associações com os efeitos adversos à radioterapia. Para verificar as correlações foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Todas as análises foram realizadas com o α de 5% e intervalo de confiança de 95%.

III.11 - Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás com protocolo CEP-ACCG Nº 035/07 de 27/09/2007 (**Anexo 3**).

VI - RESULTADOS

As informações clínicas dos pacientes selecionados, como idade, comorbidades, hábitos de vida, escore de Gleason, evolução do PSA, tipo de tratamento e dose de radiação, foram revisadas retrospectivamente com base nas informações coletadas dos prontuários e ficha de radioterapia de cada paciente (**Tabela 2**).

Como mostra a **Tabela 2**, 12 pacientes (28%) relataram algum tipo de câncer na família. Trata-se de um tipo de câncer que atinge principalmente pessoas acima dos 60 anos. A média de idade dos pacientes do estudo foi de 68 anos, variando de 52 a 82 anos. Por se tratar de pacientes com mais de 60 anos é comum a presença de comorbidades. As principais comorbidades encontradas foram hipertensão arterial sistêmica em 48% dos pacientes ou diabetes mellitus em 12% dos pacientes, destes 8% relataram tanto a presença de hipertensão como diabetes. Como mostra a **Figura 8**, as frequências das comorbidades foram: 20 pacientes tinham apenas Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), 2 tinham apenas diabetes, 4 relataram sofrer de HAS e diabetes, 7 outros pacientes tinham outras comorbidades. Apenas 4 pacientes não possuíam nenhuma comorbidade.

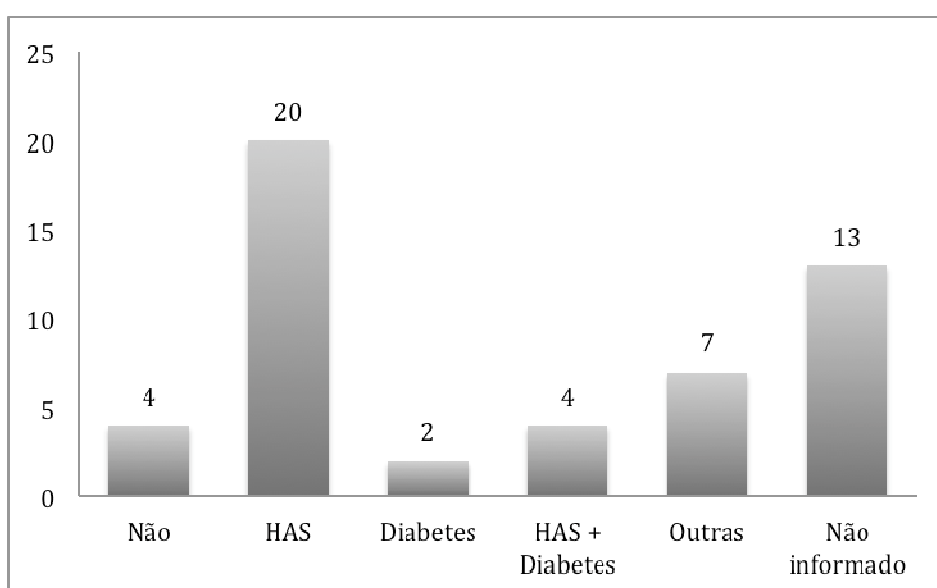


Figura 8. Frequência das comorbidades relatadas pelos pacientes incluídos no estudo.

Os hábitos de vida considerados para análise foram tabagismo e etilismo. Mais da metade dos pacientes (56%) relataram o hábito tabagista em algum momento da vida e 9 pacientes (18%) referiram o uso de bebidas alcoólicas.

Tabela 2. Freqüência das características clínicas dos pacientes e do tratamento

Características	No. de pacientes (%)
Média de idade	68 (52-82)*
História Familiar de Câncer	12 (28)
Hipertensão	24 (48)
Diabetes mellitus	6 (12)
Hipertensão + Diabetes mellitus	4 (8)
Outras comorbidades	7 (14)
Histórico de tabagismo	28 (56)
Etilismo	9 (18)
Escore de Gleason	
≤ 5	3 (6)
6	26 (52)
7	16 (32)
8-9	4 (8)
Evolução do PSA após a radioterapia	
PSA diminuiu	38 (76)
PSA não diminuiu	12 (24)
Hormonioterapia concomitante	9 (18)
Cirurgia prévia	8 (16)
Interrupção do tratamento	5 (10)
Dose total de radiação (Gy)	69,2 (46-74)*
Duração do tratamento em dias	61,5 (49-74)*

Abreviações: PSA: Prostate Specific Antigen (Antígeno prostático específico), Gy: Grays, unidade de medida para dose de radiação. * Média (faixa de variação)

O tratamento durou em média $61,5 \pm 8,7$ dias com doses totais de RT de $69,2 \pm 4,1$ Gy. Cinco pacientes (10%) tiveram o tratamento interrompido por em média $5,8 \pm 1,8$ dias. Dos 50 pacientes estudados, 9 (18%) realizaram hormonioterapia concomitante e 8 (16%) fizeram cirurgia prévia (**Tabela 2**).

A maior parte dos pacientes (94%) foi classificada como portadores de tumor prostático com grau de Gleason ≥ 6 , sendo 26 pacientes (52%) com Gleason 6, 16 pacientes (32%) com Gleason 7 e 4 pacientes (8%) com Gleason 8 ou 9. Graus de Gleason maiores que 6 estão associados aos piores prognósticos do câncer prostático [72-78]. Todavia, a maior parte dos pacientes respondeu bem à radioterapia, como mostra a evolução do PSA após o tratamento, com diminuição em 38 pacientes (76%). Além disso, nenhum dos pacientes foi a óbito durante o período de seguimento de 5 anos.

Para a obtenção de resultados satisfatórios do presente estudo, a qualidade do material analisado foi de suma importância. A **Figura 9** mostra a

integridade do DNA genômico dos 50 pacientes após a extração. Para tal verificação, o produto da extração de DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

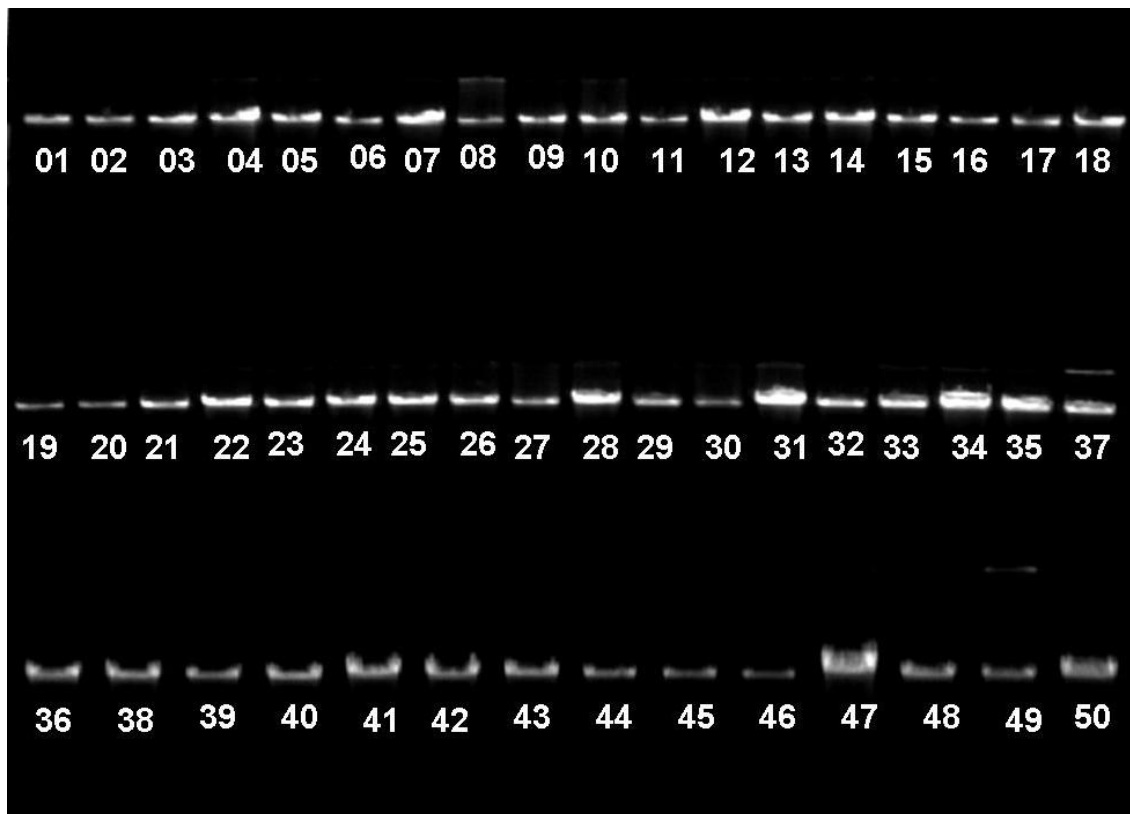


Figura 9. Análise eletroforética, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, mostrando a integridade do DNA genômico total extraído das amostras dos 50 pacientes incluídos no estudo.

A partir de um DNA genômico de qualidade foi realizada a reação em cadeia da polimerase para amplificação dos fragmentos gênicos de interesse dos gene TP53 e ATM. A **Figura 10** exemplifica o resultado da PCR para o fragmento de 527 pares de bases do gene TP53. A **Figura 11** mostra o o fragmento do gene ATM de 317 pares de bases amplificado por PCR. Os produtos de PCR também foram analisados em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio. As **Figuras 10 e 11** representam apenas alguns dos pacientes analisados, no entanto, o resultado foi semelhante em todos os casos.

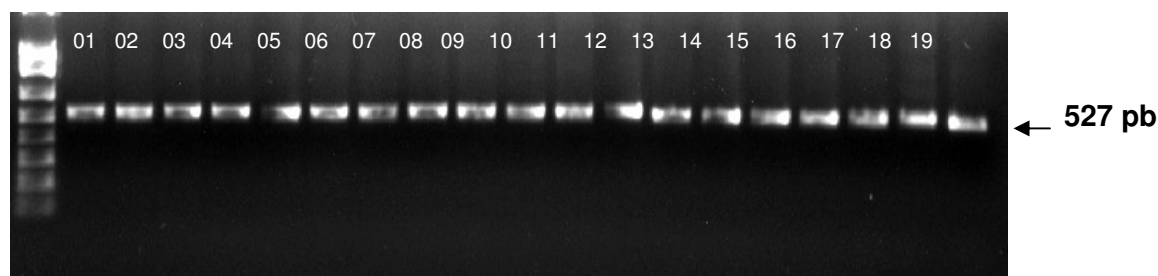


Figura 10. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do fragmento amplificado do gene TP53 de 527 pares de bases. A primeira linha corresponde ao marcador de massa molecular (Ladder 100 bp, Invitrogen™).

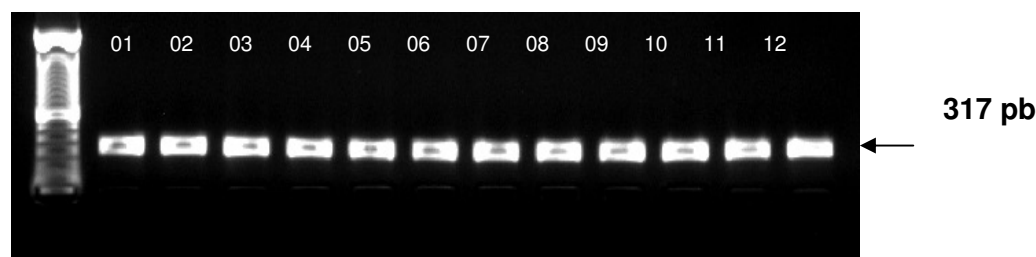


Figura 11. Análise eletroforética em gel de agarose 0,8% do fragmento amplificado do gene ATM de 317 pares de bases. A primeira linha corresponde ao marcador de massa molecular (Ladder 100 bp, Invitrogen™).

As **Tabelas 3 a 6** mostram as freqüências de efeitos colaterais da radioterapia nos 50 pacientes estudados. As **Tabelas 3 e 4** representam o grau de toxicidade aguda e crônica, respectivamente, de cada área anatômica, estratificado em quatro grupos, desde grau 0 a 3, de acordo com o que Cox e colaboradores, descreveram em 1995 ^[66] (**anexo 2**). As **Tabelas 5 e 6** mostram a distribuição da morbidade aguda e crônica, agrupadas em alto grau (RTOG \geq 2) e baixo grau (RTOG < 2).

A **Tabela 3** mostra que a maior parte dos pacientes apresentou morbidade aguda de pele grau 0 e I com 82 e 14% respectivamente e apenas 2 pacientes (4%) apresentaram dermatite grau II aguda. Quanto à toxicidade aguda no trato gastrointestinal inferior e urinário, somente dois pacientes (4%) e três pacientes (6%) respectivamente apresentaram grau III de toxicidade que é o mais grave. No entanto, 10 e 44% dos pacientes apresentaram toxicidade aguda no TGI inferior e urinário respectivamente, necessitando de medicação para tratar tais sintomas.

Na **Tabela 4** pode-se perceber que somente os pacientes com morbidade urinária crônica apresentaram sintomas grau III, sendo um total de dois pacientes (4%) e 12% dos pacientes necessitaram de medicação para tratar sintomas urinários crônicos grau II. Somente um paciente (2%) apresentou grau II de morbidade crônica de pele e dois (4%) apresentaram morbidade crônica no TGI inferior.

Tabela 3. Morbidade aguda segundo RTOG (grau de toxicidade)

	RTOG Pele n (%)	RTOG TGI inferior n (%)	RTOG Urinário n (%)
Grau 0	41 (82%)	27 (54%)	11 (22%)
Grau I	7 (14%)	16 (32%)	14 (28%)
Grau II	2 (4%)	5 (10%)	22 (44%)
Grau III	-	2 (4%)	3 (6%)

Abreviações: RTOG = Radiation Therapy Oncology Group
TGI = Trato Gastrointestinal. Grau 0 = sem sintomas

Tabela 4. Morbidade crônica segundo RTOG (grau de toxicidade)

	RTOG Pele n (%)	RTOG TGI inferior n (%)	RTOG Urinário n (%)
Grau 0	49 (98%)	43 (86%)	23 (46%)
Grau I	-	5 (10%)	19 (38%)
Grau II	1 (2%)	2 (4%)	6 (12%)
Grau III	-	-	2 (4%)

Abreviações: RTOG = Radiation Therapy Oncology Group
TGI = Trato Gastrointestinal
Grau 0 = sem sintomas

Os dados extraídos dos prontuários mostram que os efeitos adversos de alto grau mais comuns são os urinários (**Tabelas 5 e 6**). Um total de 25 pacientes, 50% dos casos, apresentaram sintomas urinários agudos de alto grau e 08 pacientes (16%) sintomas urinários crônicos de alto grau. Nestes pacientes foi necessário administrar medicação para melhora do quadro clínico. A toxicidade de alto grau aguda e crônica no trato gastrointestinal foi detectada em 14% e 4% dos pacientes, respectivamente (**Tabelas 5 e 6**).

Apenas dois (4%) dos pacientes apresentaram efeitos adversos agudos de alto grau na pele e somente um (2%) apresentou toxicidade de crônica de alto grau nesta área anatômica. Nenhum dos pacientes apresentou dermatite aguda ou crônica de grau III. Isso mostra que os efeitos adversos

mais comuns da radioterapia para o câncer de próstata ocorrem no trato gastrointestinal inferior e no sistema urinário (**Tabelas 3 e 4**). Sintomas no sistema reprodutor, tais como disfunção erétil, não foram avaliados em nossas análises, devido à falta de informações a este respeito nos prontuários dos pacientes.

Tabela 5. Distribuição de morbidade aguda de alto e baixo grau segundo RTOG

	RTOG Pele n (%)	RTOG TGI inferior n (%)	RTOG Urinário n (%)
Alto grau	2 (4%)	7 (14%)	25 (50%)
Baixo grau	48 (96%)	43 (86%)	25 (50%)

Abreviações: RTOG = Radiation Therapy Oncology Group
TGI = Trato Gastrointestinal
Alto grau = RTOG \geq 2 e Baixo grau = RTOG < 2

Tabela 6. Distribuição de morbidade crônica de alto e baixo grau segundo RTOG

	RTOG Pele n (%)	RTOG TGI inferior n (%)	RTOG Urinário n (%)
Alto grau	1 (2%)	2 (4%)	8 (16%)
Baixo grau	49 (98%)	48 (96%)	42 (84%)

Abreviações: RTOG = Radiation Therapy Oncology Group
TGI = Trato Gastrointestinal . Alto grau = RTOG \geq 2 e baixo grau = RTOG < 2

Para a classificação do grau de toxicidade da pele, a dermatite foi o único sintoma considerado. Para os tratos gastrointestinal e urinário, vários sintomas foram analisados a fim de se classificar a toxicidade. As **Figuras 12 e 13** representam as percentagens de cada um dos sintomas agudos e crônicos, utilizados para classificação do grau de toxicidade (RTOG) no trato gastrointestinal. Os sintomas agudos mais frequentes no TGI foram diarreia, em 26% dos pacientes e dor anal, em 20% dos pacientes. Os sintomas crônicos no TGI foram apenas diarreia e dor anal, em 10 e 2% dos pacientes respectivamente.

Os sintomas avaliados no trato urinário foram, disúria, nictúria, hematúria, polaciúria e outros sintomas relacionados aos listados nas **Figuras 12 e 13**. As percentagem destes sintomas são mostradas nas **Figuras 14 e 15**. A disúria e nictúria foram os sintomas mais frequentes, atingindo respectivamente 66 e 36% dos pacientes durante o tratamento ou em até 90 dias após o fim do tratamento, como mostra a **Figura 14**. Da mesma forma os

sintomas crônicos no trato urinário mais comuns foram disúria e nictúria, atingindo 30 e 32% dos pacientes, respectivamente. Não foram avaliados outros sintomas crônicos relacionados aos listados na **Figura 15**.

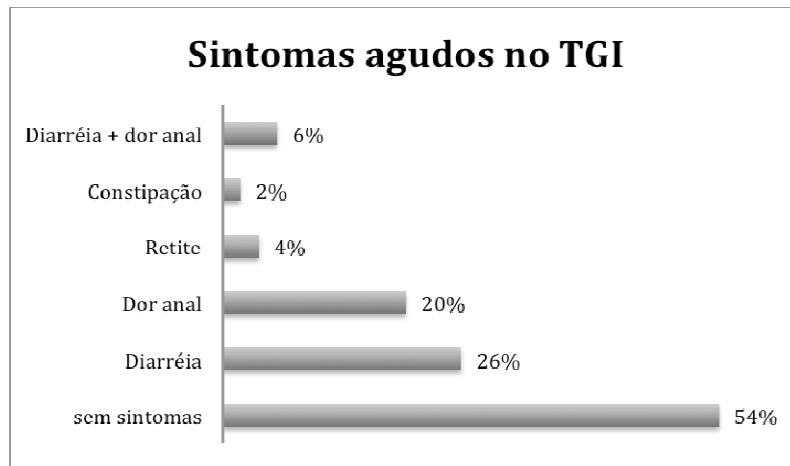


Figura 12. Percentagens dos sintomas agudos apresentados no trato gastrointestinal pelos pacientes estudados.

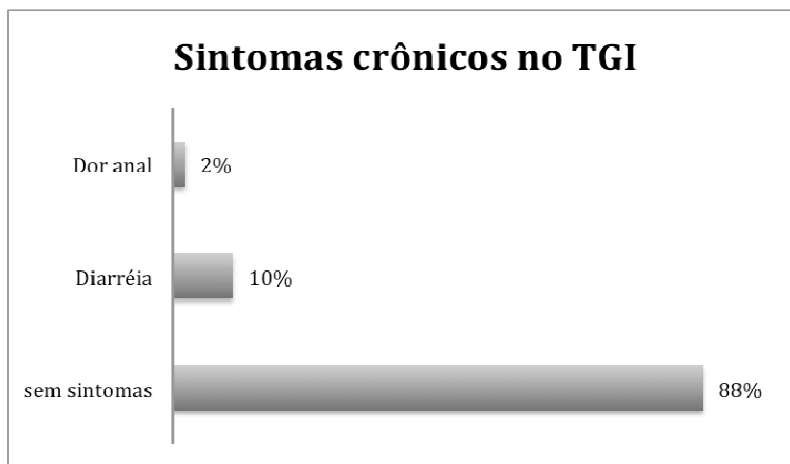


Figura 13. Percentagens dos sintomas crônicos apresentados no trato gastrointestinal pelos pacientes estudados

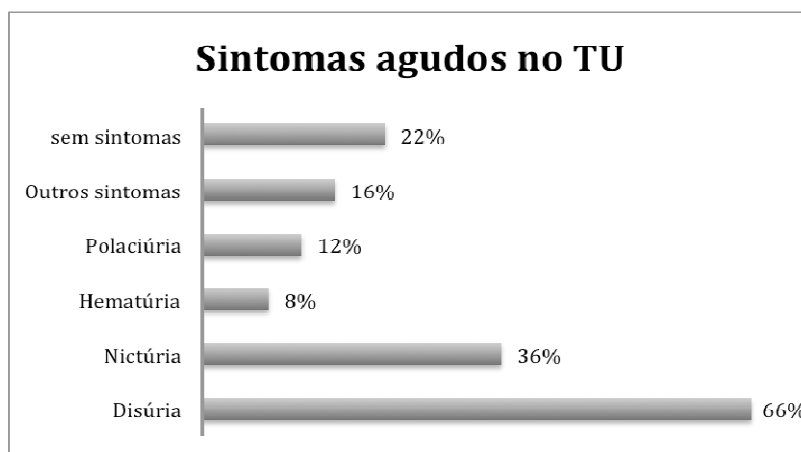


Figura 14. Percentagens dos sintomas agudos apresentados no trato Urinário pelos pacientes estudados

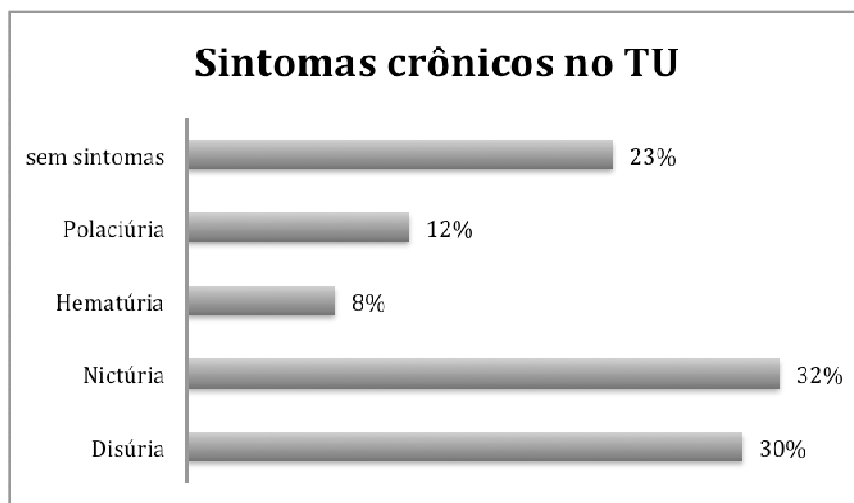


Figura 15. Percentagens dos sintomas crônicos apresentados no trato urinário pelos pacientes estudados

A **Tabela 7** mostra as freqüências de cada polimorfismo e os genótipos encontrados nos pacientes estudados. Para o gene *ATM* foi analisado o polimorfismo Asp1853Asn. Apenas 12 indivíduos (24%) apresentaram tal polimorfismo em heterozigose, ou seja, a troca ocorre em apenas um dos alelos. Nenhum dos pacientes apresentou o genótipo AA, que é a troca de bases em homozigose. A maior parte dos indivíduos eram portadores do genótipo selvagem GG, cujo códon codifica o aminoácido asparagina (Asn).

A partir do fragmento amplificado do gene *TP53* foi possível avaliar vários polimorfismos, dentre os quais, foram analisados os que estão listados na **Tabela 7**, com as respectivas freqüências genotípicas. Quanto ao polimorfismo mais conhecido da literatura, Pro72Arg, 34% dos indivíduos apresentaram a referida troca de G por C, em um dos alelos e 12% apresentaram a troca em ambos os alelos (CC). Aproximadamente 46% dos pacientes apresentam tal polimorfismo e 54% dos pacientes apresentavam o genótipo selvagem.

Quanto ao polimorfismo que ocorre no códon 47 de *TP53* (Pro47Ser), com a troca do aminoácido prolina (Pro) por serina (Ser), apenas 2 pacientes (4%) apresentaram tal polimorfismo em um dos alelos (heterozigose). Nenhum dos pacientes apresentou a troca em ambos os alelos e 47 pacientes (94%) possuíam o genótipo selvagem.

Além disso, foram analisados 3 polimorfismos intrônicos, localizados no íntron 3 de *TP53*. O polimorfismo intrônico com maior número de referências na literatura é uma inserção de 16 pares de bases, começando no nucleotídeo 11951 do gene *TP53*. Este polimorfismo define 2 alelos: alelo A1 que corresponde ao gene selvagem de *TP53* e o alelo A2 com a seqüência de 16pb duplicada. Em nosso estudo os pacientes que só tinham o alelo selvagem foram classificados como A1 e aqueles que tinham em um dos alelos ou em ambos como A2. Não foi possível verificar, por meio dos nossos experimentos, a freqüência de heteroziguidade. Os pacientes que portavam o alelo A2 foram 42 (84%), e os pacientes que não tinham o polimorfismo, somente o alelo selvagem A1, foram 6 (12%). Isto mostra que a inserção foi muito comum neste grupo de pacientes.

Tabela 7. Freqüência dos polimorfismos analisados em 50 pacientes.

Polimorfismos	Genótipos	Freqüência N (%)
<i>ATM</i> 5557 G>A Asp1853Asn	GG (Asn/Asn)	38 (76%)
	GA (Asn/Asp)	12 (24%)
	AA (Asp/Asp)	-
<i>TP53</i> codon 72 C>G Pro72Arg	GG (Arg/Arg)	27 (54%)
	CG (Arg/Pro)	17 (34%)
	CC (Pro/Pro)	6 (12%)
<i>TP53</i> codon 47 C>T Pro47Ser	CC (Ser/Ser)	47 (94%)
	CT (Ser/Pro)	2 (4%)
	TT (Pro/Pro)	-
<i>TP53</i> PIN3 11299 C>A	CC	45 (90%)
	CA	4 (8%)
	AA	-
<i>TP53</i> PIN3 11322 C>T	CC	42 (84%)
	CT	2 (4%)
	TT	4 (8%)
<i>TP53</i> PIN3 Indel 16pb	A1	6 (12%)
	A2	42 (84%)

Quanto aos outros dois polimorfismos encontrados no íntron 3 de *TP53*, um deles localizado na posição 11299 com a troca de uma citosina por uma adenina, não foi muito freqüente entre os pacientes, sendo que 45 pacientes (90%), possuíam os alelos selvagens e apenas 4 pacientes (8%)

apresentaram a troca em heterozigose, e nenhum em homozigose. Já o polimorfismo na região 11322, onde ocorre uma troca de citosina por timina, foi observado em 12% dos pacientes, dos quais 2 pacientes eram heterozigotos (4%) e 4 pacientes (8%) eram homozigotos para a troca. Pacientes com os alelos selvagens, sem a troca, foram 42, no total, representando 84% dos pacientes analisados. As **Tabelas de 8 a 11** representam a associação entre as características clínicas dos pacientes e a toxicidade aguda ou crônica da pele, trato gastrointestinal e trato urinário à radioterapia.

A **Tabela 8** mostra que houve associação entre hormonioterapia (HT) e a toxicidade aguda da pele ($p=0,029$), no entanto nenhuma das outras características se associaram a tal toxicidade. A **Figura 16** mostra o gráfico de dispersão representando o número de pacientes que fizeram ou não hormonioterapia, em relação aos efeitos adversos agudos de pele após a radioterapia. As retas mostram o mesmo sentido e sugerem uma relação causal entre as duas variáveis. Outra associação positiva, representada na **Tabela 11**, ocorreu entre pacientes que sofriam de hipertensão arterial sistêmica e tiveram toxicidade crônica no trato urinário ($p=0,022$ OR:0,048 95%CI 0,004 - 0,620), entretanto ao avaliar o *odds ratio*, percebemos que a presença de HAS sugere um efeito protetor à toxicidade crônica no trato urinário. Na **Figura 17** que mostra o gráfico de dispersão desta associação, podemos perceber que as retas tem sentidos opostos, sugerindo assim uma possível ação protetora da hipertensão em relação a toxicidade urinária crônica.

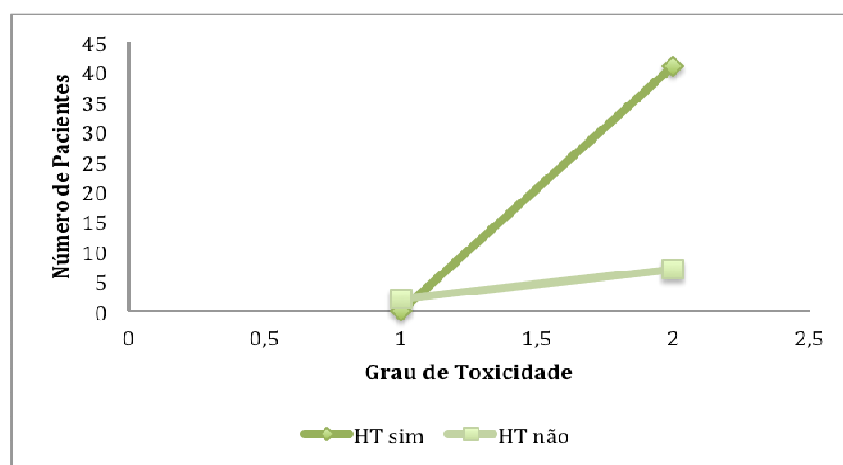


Figura 16. Gráfico de dispersão representando o número de pacientes que fizeram ou não hormonioterapia, em relação aos efeitos adversos agudos de pele após a radioterapia.

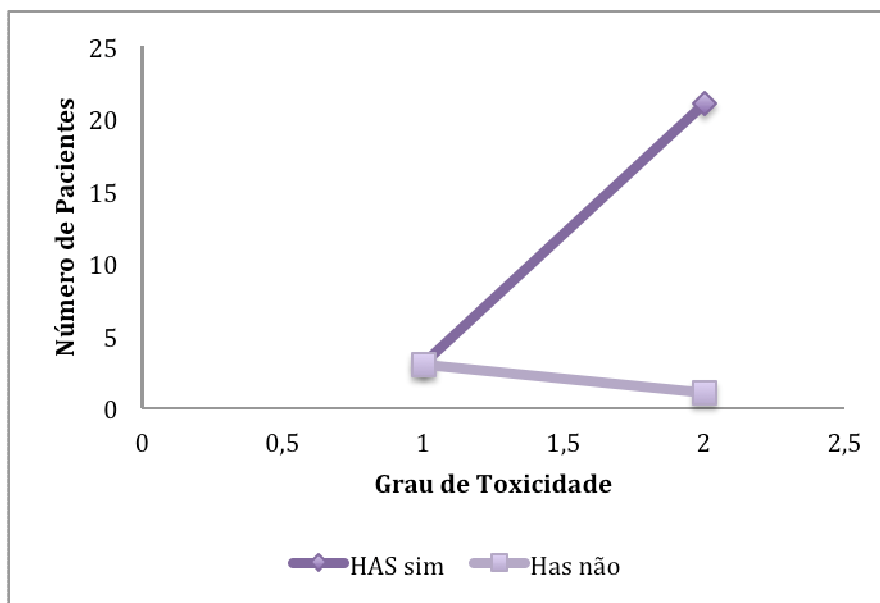


Figura 17. Gráfico de dispersão representando o número de pacientes que tinham ou não hipertensão, em relação aos efeitos adversos crônicos urinários de alto e baixo grau, após a radioterapia.

Não houve nenhuma associação entre as demais características clínicas analisadas (etilismo, tabagismo, idade, neoplasia na familiar, diabetes, escore de Gleason, cirurgia prévia e dose total aplicada) e a frequência de efeitos colaterais agudos e crônicos de pele, do trato gastrointestinal e do trato urinário ($p > 0,05$), como mostram as **Tabelas de 8 a 13**. Nas amostras nas quais não foi possível se utilizar *odds ratio* para calcular o risco estimado, foi calculado o risco relativo de cada variável, dentro do grupo estudado.

Tabela 8. Associações entre as características clínicas e a dermatite aguda de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) para pele.

	OR	Dermatite aguda	
		95% IC	p-value
Etilismo (sim/não)	3,37	0,189 - 60,238	0,432
Tabagismo (sim/não)	0,37	0,021 - 6,501	0,490
Neoplasia na família (sim/não)	1,615	0,093 - 28,117	1
Gleason ≥ 6	1,044*	0,983 - 1,109	1
Cirurgia (sim/não)	0,952*	0,890 - 1,019	1
HT concomitante (sim/não)	1,286*	0,907 - 1,823	0,029
Idade (≥ 60 anos)	1,824	0,107 - 31,03	1
Dose total (≥ 70 Gy)	0,955*	0,895 - 1,018	1
HAS (sim/não)	0,958*	0,882 - 1,042	1
Diabetes (sim/não)	0,833*	0,583 - 1,192	1

Abreviações: OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confiança; HT, hormonioterapia; HAS, hipertensão arterial sistêmica, respectivamente.

* Risco relativo e não *odds ratio*

Tabela 9. Associações entre as características clínicas e a dermatite crônica de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) para pele.

	Dermatite crônica		
	OR	95% IC	p-value
Etilismo (sim/não)	1,037*	0,966 - 1,114	1
Tabagismo (sim/não)	1,100*	0,913 - 1,326	0,282
Neoplasia na família (sim/não)	-	-	-
Gleason ≥ 6	1,022*	0,980 - 1,066	1
Cirurgia (sim/não)	0,976*	0,931 - 1,023	1
HT concomitante (sim/não)	0,976*	0,930 - 1,024	1
Idade (≥ 60 anos)	1,032*	0,970 - 1,099	1
Dose total (≥ 70 Gy)	0,977*	0,934 - 1,022	1
HAS (sim/não)	0,958*	0,882 - 1,042	1
Diabetes (sim/não)	-	-	-

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; HT, hormonioterapia; HAS, hipertensão arterial sistêmica, respectivamente

* Risco relativo e não odds ratio

Tabela 10. Associações entre as características clínicas e os efeitos colaterais do trato gastrointestinal agudos de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Efeitos adversos agudos no TGI		
	OR	95% IC	p-value
Etilismo (sim/não)	1,31	0,208 - 8,319	1
Tabagismo (sim/não)	0,978	0,160 - 5,989	1
Neoplasia na família (sim/não)	1,227	0,230 - 6,548	1
Gleason ≥ 6	3,417	0,267 - 43,703	0,370
Cirurgia (sim/não)	0,833*	0,728 - 0,954	0,580
HT concomitante (sim/não)	0,486	0,907 - 1,823	0,595
Idade (≥ 60 anos)	1,400	0,276 - 7,096	0,692
Dose total (≥ 70 Gy)	0,841*	0,739 - 0,956	0,576
HAS (sim/não)	0,600	0,049 - 7,345	1
Diabetes (sim/não)	0,600	0,027 - 13,582	1

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; TGI, trato gastrointestinal; HT, hormonioterapia; HAS, hipertensão arterial sistêmica, respectivamente

* Risco relativo e não odds ratio

Tabela 11. Associações entre as características clínicas e os efeitos colaterais do trato gastrointestinal crônicos de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Efeitos adversos crônicos no TGI		
	OR	95% IC	p-value
Etilismo (sim/não)	1,077	0,972 - 1,193	1
Tabagismo (sim/não)	1,222*	0,925 - 1,615	0,074
Neoplasia na família (sim/não)	1,100*	0,964 - 1,255	0,511
Gleason ≥ 6	1,044*	0,983 - 1,109	1
Cirurgia (sim/não)	0,952*	0,890 - 1,019	1
HT concomitante (sim/não)	0,200	0,011 - 3,541	0,331
Idade (≥ 60 anos)	1,067*	0,975 - 1,166	0,530
Dose total (≥ 70 Gy)	0,955*	0,895 - 1,018	1
HAS (sim/não)	0,130	0,006 - 2,677	0,270
Diabetes (sim/não)	0,600	0,027 - 13,58	1

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; TGI, trato gastrointestinal; HT, hormonioterapia; HAS, hipertensão arterial sistêmica, respectivamente. * Risco relativo e não odds ratio

Tabela 12. Associações entre as características clínicas e os efeitos colaterais urinários agudos de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Efeitos adversos agudos no TU		
	OR	95% IC	p-value
Etilismo (sim/não)	4,038	0,710 - 22,966	0,137
Tabagismo (sim/não)	1,600	0,393 - 6,509	0,510§
Neoplasia na família (sim/não)	1,800	0,455 - 7,127	0,400§
Gleason ≥ 6	2,087	0,177 - 24,615	1
Cirurgia (sim/não)	1,000	0,220 - 4,536	1
HT concomitante (sim/não)	0,432	0,095 - 1,966	0,463
Idade (≥ 60 anos)	2,020	0,623 - 6,557	0,239§
Dose total (≥ 70 Gy)	2,190	0,363 - 13,22	0,667
HAS (sim/não)	0,846	0,102 - 7,036	1
Diabetes (sim/não)	2,000	0,150 - 26,73	1

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; TU, trato urinário; HT, hormonioterapia; HAS, hipertensão arterial sistêmica, respectivamente

* Risco relativo e não odds ratio

§ Associação usando o chi-quadrado e não Fisher exact test.

Tabela 13. Associações entre as características clínicas e os efeitos colaterais urinários crônicos de alto grau (≥ 2) segundo o critério adotado pelo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Efeitos adversos crônicos no TU		
	OR	95% IC	p-value
Etilismo (sim/não)	3,000	0,525 - 17,159	0,327
Tabagismo (sim/não)	0,444	0,081 - 2,426	0,379
Neoplasia na família (sim/não)	0,567	0,094 - 3,423	0,681
Gleason ≥ 6	2,857	0,227 - 35,910	0,414
Cirurgia (sim/não)	0,810*	0,699 - 0,937	0,324
HT concomitante (sim/não)	0,278	0,052 - 1,479	0,144
Idade (≥ 60 anos)	2,000	0,434 - 9,210	0,436
Dose total (≥ 70 Gy)	0,946	0,095 - 9,378	1
HAS (sim/não)	0,048	0,004 - 0,620	0,022
Diabetes (sim/não)	0,067	0,003 - 1,509	0,190

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; TU, trato urinário; HT, hormonioterapia; HAS, hipertensão arterial sistêmica, respectivamente

* Risco relativo e não odds ratio

As Tabelas de 14 a 19 representam os resultados do cruzamento de tabelas 2x2 em uma análise univariada de alguns dos polimorfismos encontrados nos genes *TP53* e *ATM* versus toxicidade aguda e crônica de pele, trato gastrointestinal e trato urinário.

Na análise de *cross-table* (tabelas cruzadas), o polimorfismo intrônico, localizado na posição 11322 do gene *TP53*, foi associado com a ocorrência de toxicidade ≥ 2 aguda de pele ($p=0,006$). O risco relativo do paciente portador do genótipo TT (variante polimórfica em homozigose) de apresentar toxicidade de

pele é 22 vezes maior do que os não portadores. Nenhum dos outros polimorfismos foi significativamente associado com toxicidade aguda ou crônica dos tecidos adjacentes à próstata. Isto pode ter ocorrido devido ao número reduzido da amostra, apenas 50 pacientes.

Tabela 14. Associação entre os genótipos de *TP53* e *ATM* e os efeitos adversos de alto grau agudos de pele (dermatite) segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Análise Univariada		
	OR	95% IC	p-value
<i>TP53</i> P47S	1,044*	0,983 - 1,109	1
<i>TP53</i> PIN 3 Indel 16pb	1,150*	1,028 - 1,286	1
<i>TP53</i> PIN 3 11299	1,093*	1,002 - 1,193	1
<i>TP53</i> PIN 3 11322 (TT)	22,00*	5,680 - 85,207	0,006
<i>TP53</i> Arg72Pro (Arg/Arg)	1,240*	1,044 - 1,473	1
<i>ATM</i> 5557 G>A	0,306	0,018 - 5,289	0,434

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; PIN3, polimorfismo no intron 3, respectivamente. * Risco relativo e não Odds ratio

Tabela 15. Associação entre os genótipos de *TP53* e *ATM* e os efeitos adversos de alto grau crônicos de pele, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Análise Univariada		
	OR	95% IC	p-value
<i>TP53</i> P47S	1,043*	0,984 - 1,107	1
<i>TP53</i> PIN 3 Indel 16pb	1,146*	1,028 - 1,279	1
<i>TP53</i> PIN 3 11299	16,00*	5,349 - 47,858	0,082
<i>TP53</i> PIN 3 11322 (CT)	1,049*	0,982 - 1,120	1
(TT)	1,098*	1,002 - 1,202	1
<i>TP53</i> Arg72Pro (Arg/Pro) (Arg/Arg)	1,375*	1,065 - 1,776	1
<i>ATM</i> 5557 G>A	4,364*	2,597 - 7,331	0,245

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; PIN3, polimorfismo no intron 3, respectivamente. * Risco relativo e não Odds ratio

Tabela 16. Associação entre os genótipos de *TP53* e *ATM* e os efeitos adversos de alto grau e agudos no trato gastrointestinal, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Análise Univariada		
	OR	95% IC	p-value
<i>TP53</i> P47S	0,146	0,008 - 2,663	0,268
<i>TP53</i> PIN 3 Indel 16pb	1,200	0,119 - 12,143	1
<i>TP53</i> PIN 3 11299	0,125	0,014 - 1,094	0,092
<i>TP53</i> PIN 3 11322 (CT)	1,056*	0,979 - 1,138	1
(TT)	0,500	0,044 - 5,637	0,496
<i>TP53</i> Arg72Pro (Arg/Pro) (Arg/Arg)	1,500	0,111 - 20,299	1
(Arg/Arg)	1,150	0,105 - 12,616	1
<i>ATM</i> 5557 G>A	0,781	0,131 - 4,665	1

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; PIN3, polimorfismo no intron 3, respectivamente. * Risco relativo e não Odds ratio

Tabela 17. Associação entre os genótipos de *TP53* e *ATM* e os efeitos adversos de alto grau e crônicos no trato gastrointestinal, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Análise Univariada		
	OR	95% IC	p-value
<i>TP53</i> P47S	*1,044	0,983 - 1,109	1
<i>TP53</i> PIN 3 Indel 16pb	*1,150	1,028 - 1,286	1
<i>TP53</i> PIN 3 11299	*1,093	1,002 - 1,193	1
<i>TP53</i> PIN 3 11322			
(CT)	0,024	0,001 - 0,737	0,09
(TT)	*1,098	1,002 - 1,202	1
<i>TP53</i> Arg72Pro (Arg/Pro)	-	-	-
(Arg/Arg)	*1,240	1,044 - 1,473	1
<i>ATM</i> 5557 G>A	*1,343	1,136 - 1,588	1

Abreviações: OR, Odds ratio; IC, intervalo de confiança; PIN3, polimorfismo no intron 3, respectivamente. * Risco relativo e não Odds ratio

Tabela 18. Associação entre os genótipos de *TP53* e *ATM* e os efeitos adversos de alto grau e agudos no trato urinário, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Análise Univariada		
	OR	95% IC	p-value
<i>TP53</i> P47S	*1,087	0,968 - 1,220	0,490
<i>TP53</i> PIN 3 Indel 16pb	0,455	0,075 - 2,756	0,666
<i>TP53</i> PIN 3 11299	0,292	0,028 - 3,021	0,349
<i>TP53</i> PIN 3 11322			
(CT)	0,826	0,048 - 14,106	1
(TT)	0,275	0,026 - 2,868	0,336
<i>TP53</i> Arg72Pro (Arg/Pro)	0,350	0,05 - 2,467	0,371
(Arg/Arg)	0,538	0,084 - 3,451	0,665
<i>ATM</i> 5557 G>A	1,056	0,287 - 3,882	0,935 §

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; PIN3, polimorfismo no intron 3, respectivamente. * Risco relativo e não Odds ratio

§ Associação usando o Qui-quadrado (χ^2) e não Fisher exact test

Tabela 19. Associação entre os genótipos de *TP53* e *ATM* e os efeitos adversos de alto grau e crônicos no trato urinário, segundo o RTOG (Radiation Therapy Oncology Group).

	Análise Univariada		
	OR	95% IC	p-value
<i>TP53</i> P47S	*1,051	0,981 - 1,127	1
<i>TP53</i> PIN 3 Indel 16pb	3,000	0,447 - 20,153	0,258
<i>TP53</i> PIN 3 11299	0,154	0,018 - 1,308	0,120
<i>TP53</i> PIN 3 11322			
(CT)	*1,056	0,979 - 1,138	1
(TT)	0,500	0,044 - 5,637	0,496
<i>TP53</i> Arg72Pro (Arg/Pro)	3,750	0,396 - 35,543	0,270
(Arg/Arg)	2,875	0,388 - 21,289	0,295
<i>ATM</i> 5557 G>A	2,567	0,283 - 23,309	0,660

Abreviações: OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; PIN3, polimorfismo no intron 3, respectivamente. * Risco relativo e não Odds ratio

Com a intenção de correlacionar as variáveis estudadas foi realizado o teste de correlação de Spearman. A **Tabela 20** lista todas as variáveis que mostraram correlação entre si, seja positiva ou negativa. A correlação positiva mostra que os valores elevados de uma variável correspondem a valores elevados da outra e a correlação negativa representa valores elevados de uma variável correspondendo a valores baixos da outra e vice-versa. Uma correlação é considerada positiva perfeita quando o coeficiente de correlação é igual à 1. De 0 à 0,3 a correlação é considerada positiva fraca, de 0,3 à 0,6 é uma correlação positiva moderada e acima de 0,6 a correlação é positiva forte. A correlação negativa perfeita é igual a -1, de 0 à -0,3 é uma correlação negativa fraca, de -0,3 à -0,6 o coeficiente de correlação relação representa uma correlação negativa moderada e abaixo de -0,6 a correlação é negativa forte.

Os resultados mostram que mesmo sendo fraca, existe correlação entre os efeitos colaterais agudos do trato urinário e os efeitos agudos do trato gastrointestinal ($p=0,02$). Da mesma forma os efeitos urinários agudos estavam correlacionados positivamente com os efeitos gastrointestinais agudos ($p=0,02$). Não foi encontrada correlação positiva entre os polimorfismos e os efeitos adversos à radioterapia. Entretanto, existe uma correlação positiva fraca entre o polimorfismo no códon 72 de p53 e o polimorfismo intrônico da posição 11322 ($p=0,01$). Além disso, os polimorfismos do códon 47 e o polimorfismo do intron 3 na posição 11299 também estão correlacionados positivamente ($p=0,01$).

Tabela 20. Correlações significativas entre as variáveis do estudo

Variável 1	Variável 2	Coef. Correlação*	p-value
Efeitos urinários agudos	Efeitos TGI agudos	0,29	0,02
Efeitos urinários crônicos	Efeitos TGI agudos	0,30	0,02
Efeitos urinários crônicos	TP53 PIN3 11299 C>A	-0,27	0,03
Efeitos TGI agudos	Dose total	-0,25	0,03
Efeitos TGI agudos	TP53 PIN3 11299 C>A	-0,30	0,02
Efeitos TGI crônicos	Dose total	-0,30	0,05
TP53 codon 72 C>G	TP53 PIN3 11322 C>T	0,31	0,01
TP53 codon 72 C>G	TP53 PIN3 11299 C>A	-0,30	0,01
TP53 codon 72 C>G	TP53 codon 47 C>T	-0,25	0,03
TP53 codon 47 C>T	TP53 PIN3 11299 C>A	0,31	0,01

* Coeficiente de correlação de Spearman

V - Discussão

Existe uma crença que a revolução genômica desencadeada pelo sequenciamento total do genoma humano e o desenvolvimento tecnológico de metodologias em larga escala, anuncia o futuro da medicina personalizada. Para a oncologia, este progresso deve aumentar a possibilidade de prever respostas individuais de pacientes à radioterapia e a quimioterapia. Andreassen et al.^[67] (2002) levantaram a hipótese de que a radiosensibilidade dos tecidos normais deve estar associada a um então chamado “complexo traço-dependente” que agrega o efeito de muitos determinantes genéticos mínimos, e os polimorfismos de base única poderiam corresponder a parte destes componentes.

Nesse sentido, alguns pontos importantes observados durante a realização deste projeto serão discutidos nos parágrafos subseqüentes.

A avaliação das características clínicas dos pacientes mostrou que a hipertensão arterial sistêmica e diabetes foram as comorbidades mais freqüentemente relatadas pelos pacientes incluídos neste estudo (**Figura 08**). Nossas análises mostraram que a hipertensão arterial sistêmica estava fortemente associada à diminuição do risco de efeitos adversos crônicos urinários após a radioterapia (OR:0,048 95%CI 0,004 - 0,620; $p=0,022$). Na **Figura 17**, que mostrou o gráfico de dispersão desta associação, podemos perceber que as retas tem sentidos opostos, sugerindo assim uma possível ação protetora da hipertensão em relação a toxicidade urinária crônica. Este resultado corrobora com os dados publicados por um ensaio clínico de fase III em 2011, que também encontrou associação entre a hipertensão e o baixo risco de desenvolvimento de sintomas urinários crônicos após a radioterapia (HR=0.25, 95% CI 0.09 - 0.71; $p=0.009$)^[79]. Devido ao grupo amostral relativamente pequeno, nossos resultados não excluem a possibilidade de que a hipertensão ou seu tratamento possam ter um significativo efeito clínico protetor contra o desenvolvimento de efeitos adversos no trato gastrointestinal.

O uso de anti-hipertensivos no tratamento da HAS foi previamente associado com a diminuição de diarreia aguda após a radioterapia^[80]. Outro estudo sugeriu que isto poderia ocorrer por meio de um mecanismo vascular^[81]. Neste estudo nós não coletamos dados sobre medicações concomitantes, fato

que poderia esclarecer melhor a associação entre a HAS e os sintomas urinários crônicos.

Dos 50 pacientes estudados, 09 realizaram hormonioterapia concomitante (**Tabela 2**). Destes, apenas 02 apresentaram na pele efeitos adversos agudos de alto grau. Nossos resultados mostram que a hormonioterapia parece ter um efeito clínico determinante para o desenvolvimento de dermatite aguda após a radioterapia, em pacientes com tumores prostáticos. Os pacientes que fizeram HT concomitante tinham o risco 1,3 vezes maior de apresentar toxicidade aguda de pele ($p= 0,029$, RR: 1,3) em relação aos pacientes que não foram submetidos a HT. A **Figura 16** mostra o gráfico de dispersão com retas de sentidos convergentes, o que sugere que pacientes que fizeram HT tem uma chance maior de apresentar dermatite aguda após a radioterapia.

Não existem estudos que mostrem a relação direta entre a HT e os efeitos adversos de pele, em pacientes com câncer de próstata submetidos à radioterapia. Uma meta-análise publicada em 2009 mostrou que a supressão hormonal ocasionada pela hormonioterapia juntamente com a radioterapia reduzia a recorrência e mortalidade de pacientes com câncer de próstata localizado, sem afetar a toxicidade urinária e do trato gastrointestinal [82]. Estudos recentes concluíram que a HT não é determinante para o desenvolvimento de efeitos agudos e crônicos no trato urinário ou gastrointestinal após a radioterapia [83 -85], e outro estudo ainda classificou a hormonioterapia como efeito protetor a toxicidade intestinal/retal em pacientes portadores de câncer de próstata, tratados com radioterapia 3D [80].

Este estudo não contradiz os resultados publicados na literatura, já que encontramos uma associação entre HT e efeitos adversos de pele, dermatite, que não foi analisada por nenhum dos estudos revisados, sendo que a pele não é considerada o órgão de risco mais afetado pela radioterapia nesta estrutura anatômica. Novos estudos são necessários para avaliar esta associação encontrada. Acreditamos que esta associação possa ser verdadeira, uma vez que a bula do medicamento mais utilizado em hormonioterapia para câncer de próstata, o Zoladex® (registro no ministério da saúde MS 1.1618.0043), apresenta as alterações de pele e tecido subcutâneo como

efeitos adversos muito comuns ($\geq 10\%$). Nossas análises sugerem que estes efeitos possam ser potencializados pela radioterapia.

A análise dos demais dados clínicos mostrou, como esperávamos, que tais características não foram determinantes da toxicidade aguda ou crônica dos tecidos adjacentes à próstata, quando submetidos à radioterapia. Esta observação corrobora com a importância de se investigar o perfil genético dos pacientes a fim de se encontrar uma associação positiva com os efeitos colaterais apresentados após radioterapia.

O presente estudo foi realizado com a intenção inicial de analisar a influência de polimorfismos genéticos nos genes *TP53* e *ATM* e o desenvolvimento de toxicidade aguda ou crônica em pacientes portadores de câncer prostático tratados com radioterapia convencional. Nossos achados mostraram que o polimorfismo localizado na região 11322 do íntron 3 de *TP53* estava associado com alto risco de desenvolvimento de efeitos adversos agudos de alto grau na pele ($p=0,006$). Foi observado o efeito causador no subgrupo que possuía o alelo variante em homozigose (RR 22,00; 95%IC 5,68 - 85,21), mesmo com o grupo amostral de 50 pacientes sendo considerado pequeno.

O polimorfismo intrônico 11322 C>T (rs35117667) ainda não foi investigado por nenhum estudo, no entanto sua frequência foi validada em populações controle não afetadas. Não existe nenhuma informação adicional como frequência em populações específicas ou estudos de associação publicados, de acordo com o nosso conhecimento e buscas no site do NCBI (National Center of Biotechnology Information).

A base molecular da associação entre o polimorfismo intrônico 11322 C>T e o risco elevado para toxicidade aguda de pele (dermatite) ainda não foi estabelecida. Por ser localizado no íntron, este polimorfismo não está implicado diretamente numa proteína alterada, entretanto, uma hipótese pode ser que este polimorfismo leve a um *splicing* alternativo ou mesmo esteja relacionado aos RNAs de interferência, mas não existe nenhuma confirmação destas hipóteses ainda. Uma proteína alterada por estes processos pode estar associada, por exemplo, a um aumento de apoptose, como já foi descrito para o polimorfismo de p53 Pro72Arg, onde o genótipo Arg72 parece estar relacionado a uma maior apoptose^[86].

São necessários novos estudos para avaliar este polimorfismo *in vitro* e em um número maior de pacientes e ainda relacionar com outros tipos de tumores, como o de mama, onde a pele é um dos tecidos mais afetados pela radioterapia.

Este foi o primeiro estudo a avaliar a toxicidade aguda e crônica de pacientes portadores de câncer prostático e o polimorfismo no gene *TP53* Pro72Arg. Nenhuma associação foi encontrada, no grupo estudado. No entanto, mais da metade dos indivíduos, 27 no total, apresentaram a troca em homozigose, ou seja, apresentam a combinação Arg/Arg, que foi descrita como genótipo mais predisposto à apoptose [86]. Um estudo em 2006 por pesquisadores alemães [47] mostrou que existe uma associação positiva entre a toxicidade aguda de pele e o genótipo 72Pro em pacientes obesas portadoras de câncer de mama, este estudo contou com 446 pacientes para análise. É possível que este polimorfismo mostre alguma relação com toxicidade de pacientes portadores de câncer prostático se o número de pacientes estudados for maior.

Os dados sobre o efeito do polimorfismo de *TP53*, Pro72Arg em tratamentos são escassos, mas foi mostrado que pacientes que recebiam quimioterapia para câncer de cabeça e pescoço avançado tinham uma melhor resposta e maior sobrevida quando seus tumores expressavam o alelo pró-apoptótico Arg72 [87].

Um resultado importante deste trabalho foi a correlação positiva que encontramos entre os genótipos de *TP53* Pro72Arg e *TP53* 11322 C>T (p 0,01 e Coef. correlação 0,31). Mesmo sendo uma correlação fraca, este dado mostra que os dois polimorfismos crescem de forma correspondente, ou seja, poderiam ser dependentes. São necessários outros estudos para validar ou não esta hipótese de dependência e sua relação com os efeitos agudos e/ou crônicos de resposta à radioterapia.

A proteína p53 possui no códon 47 (P47) uma prolina que atua no sítio de reconhecimento para fosforilação de uma ser46 pela proteína p38 MAPK, a qual leva a indução da apoptose. Contudo, uma percentagem menor de 5% dos americanos descendentes de africanos possuem uma serina no lugar da prolina do códon 47 (S47) devido a um SNP nesta posição com a troca de Citosina por Timina [88]. Li e colaboradores [88] (2005) mostraram que a

variante S47 de p53 era um pior substrato para fosforilação pela p38 MAPK, resultando em uma redução de até 5 vezes na capacidade de induzir apoptose, comparada com a proteína p53 selvagem. Esta diminuição na capacidade de induzir apoptose foi acompanhada pela reduzida habilidade de transativação de dois genes alvos pró-apoptóticos de *TP53*: o gene *p53A1P1* e gene *PUMA*, mas não de outros genes alvos de p53, em células humanas transfectadas. Nossas análises revelaram que cerca de 4% dos pacientes do estudo possuíam a variante S47. A população brasileira é bastante miscigenada, motivo pelo qual, a frequência deste polimorfismo em nosso estudo é semelhante à frequência do estudo de Li et al (2005) ^[88]. No entanto a percentagem de pacientes com este polimorfismo não foi estatisticamente suficiente para encontrarmos uma relação com os efeitos adversos a radioterapia, mesmo sendo uma variante que possivelmente induz apoptose. Apesar de ambos os polimorfismos no códon 72 e no códon 47 estarem relacionados à indução da apoptose, nossos resultados mostraram uma correlação negativa entre eles ($p=0,03$ e Coef. Correlação: $- 0,25$). A correlação é fraca, contudo pode indicar que estes dois polimorfismos não estejam relacionados entre si, ou seja, não dependem um do outro para que ocorram.

Quanto ao polimorfismo no íntron 3 de *TP53*, uma inserção/duplicação de 16 pares de bases descrita por Lazar et al. ^[48] (1993), não foi encontrada nenhuma associação com o desenvolvimento de efeitos adversos à radioterapia ($p>0,05$). Nossos dados corroboram com os resultados de Tan et al (2006) ^[47], que também não encontrou associação deste polimorfismo com o risco de toxicidade após a radioterapia. Entretanto, um estudo publicado por Gemignani e colaboradores ^[50] em 2004, mostrou que esta inserção/duplicação está associada ao risco de desenvolvimento de câncer colorretal (OR 1.55, 95% CI 1.10 – 2.18, $p = 0.012$). Entre os pacientes portadores de câncer prostático incluídos no presente estudo 42/50 (84%) apresentaram tal polimorfismo. Levando-se em consideração estes resultados analisados pode sugerir um estudo caso-controle para verificar a associação entre este polimorfismo e o desenvolvimento de câncer de próstata. Ainda não existem estudos que respondam tal questionamento, e nenhum dos estudos que incluem este polimorfismo foi realizado em regiões abaixo da linha do

Equador. Nosso estudo é o primeiro no Brasil a incluir este polimorfismo em suas análises. O significado funcional do polimorfismo de *TP53 PIN3* ainda permanece pouco explorado, impedindo assim a comparação dos efeitos deste polimorfismo com os demais analisados.

Não houve nenhuma evidência da associação do polimorfismo intrônico na posição 11299, onde ocorre uma troca de citosina por adenina, no gene *TP53* com toxicidade aguda ou crônica de alto grau. Este polimorfismo ainda foi pouco estudado, e de acordo com nossas buscas em sítios científicos, ainda não existem trabalhos que o associem aos efeitos colaterais da radioterapia.

É sabido que MicroRNAs (miRNAs) são uma chave importante da regulação da expressão gênica pós-transcricional em diversos processos fisiológicos e patológicos. Suzuki et al. ^[89] (2009) mostrou que em resposta ao dano ao DNA, a proteína p53 está envolvida na maturação pós-transcricional de vários miRNAs com funções supressoras, incluindo miR16-1, miR143, miR145 e miR206. Em geral, TP53 selvagem leva a expressão de miRNA, já TP53 mutante diminui a expressão de alguns tipos de miRNA, sugerindo que mutações em p53 possam interferir no processamento de miRNA independente do processo transcricional. Este dado mostra a importância de avaliarmos os polimorfismos intrônicos no gene *TP53*. No entanto, não existem evidências que conectam os polimorfismos intrônicos que estudamos e os miRNAs descritos por Suzuki ^[89].

As alterações no gene *ATM* são uma das mais estudadas para associação com a radiotoxicidade do tecido normal. Isto se deve a constatação de que pacientes com mutações neste gene apresentavam ataxia-telangectasia, uma alteração patológica que leva a uma hipersensibilidade à radioterapia.

Nossas análises mostraram que o polimorfismo Asp1853Asn não estava associado ao desenvolvimento de nenhum efeito adverso agudo ou crônico em pacientes portadores de câncer prostático tratados com radioterapia ($p > 0,05$). Este foi o primeiro estudo a verificar a associação deste polimorfismo específico no gene *ATM*, com os efeitos colaterais da radioterapia para o câncer de próstata, portanto, não podemos compará-lo com outros estudos realizados anteriormente. Além disso, o estudo de um único polimorfismo em *ATM* pode ter sido um dos fatores limitantes por não termos encontrado uma

associação positiva entre as alterações no gene *ATM* e os efeitos adversos da radioterapia.

O primeiro trabalho a descrever uma associação entre mutações no gene *ATM* com proctite e cistite em pacientes com câncer de próstata foi publicado em 1998 por Hall et al ^[90]. Esta publicação foi seguida por duas outras ^[14,20] que demonstraram a associação entre SNPs *missense* em *ATM*, incluindo o SNP no códon 1853 com o sangramento retal e disfunção erétil. Nestes estudos, a associação entre os SNPs e a proctite foi dependente da dose de radiação aplicada. Em contrapartida com estes resultados positivos, nenhuma associação foi encontrada entre o SNP que ocorre no códon 1054 de *ATM* e morbidade urinária ou disfunção erétil ^[91].

Vários trabalhos foram publicados mostrando a associação entre polimorfismos de *ATM* e o câncer de mama. Alguns destes estudos mostraram que o polimorfismo no códon 1853 de *ATM* estava associado ao risco elevado de fibrose ^[59,91]. Outro estudo realizado com pacientes Norueguesas e americanas encontrou associação entre este mesmo polimorfismo e a telangiectasia ($p=0,042$) ^[93].

O *ATM* é um gene grande com muitas variantes documentadas. Serão necessários estudos de associação destes SNPs em maiores grupos amostrais para estabelecer se as variantes de base única ou os haplótipos deste gene podem de fato contribuir com a toxicidade do tecido normal.

Uma das grandes limitações deste estudo foi a impossibilidade de calcular a dose exata que chegou a cada órgão adjacente à próstata, uma vez que o serviço de radioterapia, no momento do tratamento dos pacientes selecionados, usava a radioterapia convencional e não a radioterapia 3D ou conformacional que permitem um cálculo mais fidedigno da dose de radiação em cada tecido adjacente. Este é definitivamente um parâmetro importante na comparação com estudos realizados em outros laboratórios e que utilizam tipos de tratamentos mais avançados. Um estudo clínico de fase I que está em andamento (NCT00002602) poderá mostrar os potenciais benefícios do planejamento 3D para radioterapia de câncer de próstata localizado. Sua finalidade é determinar a dose máxima de radioterapia tolerada pela próstata e os tecidos que a envolvem ^[94].

Outra limitação importante deste estudo foi o tamanho do grupo amostral. Foram selecionados 50 pacientes para o estudo, o que em termos estatísticos é considerado um número pequeno. Portanto, os achados deste estudo necessitam de uma validação adicional por estudos subseqüentes. Mesmo assim, nossos resultados puderam fornecer informações relevantes da importância do polimorfismo de *TP53* 11322 C>T e a dermatite após a radioterapia em pacientes com câncer de próstata. Este resultado contribui como ferramenta útil para as estratégias de individualização da radioterapia. O presente estudo é o primeiro a observar as freqüências deste polimorfismo dentro de uma população específica e também o primeiro a associar este polimorfismo à radioterapia.

Este estudo foi realizado retrospectivamente com a coleta das amostras e dos dados dos prontuários após a radioterapia. Um estudo prospectivo poderia gerar mais informações sobre os pacientes e seus sintomas antes e após a radioterapia, tornando possível, por exemplo, a avaliação da função erétil do paciente, que não pudemos incluir no estudo já que seria necessária a aplicação de questionário antes e depois do tratamento. A disfunção erétil é uma complicação da radioterapia e já foi relacionada a polimorfismos em alguns genes ^[13].

Em suma, apesar das limitações do tratamento e de um grupo amostral relativamente pequeno, nossos resultados mostram que polimorfismos têm um papel determinante no desenvolvimento de efeitos adversos à radioterapia.

VI - Perspectivas e conclusões

Os polimorfismos nos genes *ATM* e *TP53* são comumente estudados, principalmente por atuarem nas vias de reparo do DNA. No entanto, polimorfismos em outros genes são igualmente importantes no momento de avaliar a radiotoxicidade do tecido normal em pacientes com câncer de próstata. Uma associação importante foi encontrada entre SNPs nos genes *LIG4*, *ERCC2*, *CYP2D6* e *MDC1* com toxicidade na bexiga e no reto [63,95]. Polimorfismos no gene *TGFB1* foram correlacionados com disfunção erétil e sangramento retal [15]. Além disso, foi descrito que pacientes com um polimorfismo no gene *XRCC1* tinham mais chances de desenvolver disfunção erétil e que homens com um polimorfismo em *SOD2* ou a combinação de SNPs em *SOD2* e *XRCC3* possuíam uma incidência maior de sangramento retal [96]. Por fim, outros SNPs, localizados nos genes *SART1*, *ID3*, *EPDR1*, *PAH* e *XRCC6* foram associados a morbidade urinária após a radioterapia [97]. Um grande desafio é o de avaliar estes polimorfismos já associados à radiotoxicidade em pacientes do Serviço de Radioterapia do Hospital Araújo Jorge, da ACCG a fim de validar estes resultados na população de Goiás, e futuramente, juntamente com outros serviços, validar os resultados também na população brasileira.

A identificação de polimorfismos associados às complicações da radioterapia pode levar a duas conseqüências importantes. A primeira é que com tal informação o clínico poderia tratar com cirurgia ou quimioterapia exclusivas aqueles pacientes que possuem genótipos associados aos efeitos adversos severos da radioterapia. Outra conseqüência diz respeito a pacientes que possuísem SNPs associados ao dano pela radiação poderiam se beneficiar de radioterapias mais sofisticadas, como a radioterapia de intensidade modulada, em que o tumor é o foco da radiação e os tecidos adjacentes recebem quantidades de radiação inferiores, levando a menores danos. Desta forma, um teste genético preditivo poderia identificar pacientes que seriam beneficiados por tratamentos mais dispendiosos, gerando a economia para o sistema único de saúde. Um paciente que possua um SNP associado à toxicidade do tecido normal é de fato um candidato ideal para

radioterapia, já que algumas variantes genéticas podem render radiosensibilidade ao tumor. Para tal paciente, o uso de uma dose padrão poderia ser desnecessariamente alta e é possível que este paciente possa ser curado com doses mais baixas, que levariam também a menos danos nos tecidos normais. Outro benefício é a possibilidade de tratar a grande maioria dos pacientes, que não possuam as alterações genéticas, com doses mais altas de radiação e melhorar suas chances de cura.

Atualmente a maior parte dos estudos neste campo foi realizada a partir de genes candidatos, como o presente estudo. Estes trabalhos podem fornecer informações valiosas, no entanto são limitados e ainda não tiveram sucesso em fornecer um teste preditivo para identificar pacientes radiosensíveis. Para suprir o insucesso dos estudos com genes candidatos, os pesquisadores em radiogenômica começaram uma busca mais ampla para identificar genes e SNPs associados à resposta a radiação. Já estão sendo executados estudos em larga escala de associação genômica ampla (GWA, do inglês: *genome wide association*), nos quais os pacientes são genotipados para um grande número de SNPs comuns. Estes estudos podem tanto servir como base para testes preditivos como podem também levar a descoberta de genes cujos produtos tenham um papel importante na resposta à radiação. Espera-se que estas informações ajudem a elucidar as vias envolvidas nos efeitos da radiação, o que poderia ajudar no desenvolvimento de drogas capazes de prevenir ou atenuar a toxicidade à radiação. Em 2010 foi publicado o primeiro estudo de associação genômica ampla a identificar SNPs associados com uma forma de toxicidade do tecido normal, a disfunção erétil, em pacientes portadores de câncer prostático e tratados com radioterapia ^[13]. Além disso, foi criado também um consórcio internacional de radiogenômica com a intenção de agrupar dados e amostras em escala global a fim de criar um grande biorrepositório e um banco de dados, que juntos poderiam aumentar o poder estatístico dos estudos, nesta área ^[98].

Com o avanço da radiogenômica, cada vez mais tomamos conhecimento da diversidade de SNPs presentes nos indivíduos e que estão associados ao desenvolvimento de complicações resultantes da radioterapia. Por isso, esta modalidade terapêutica não pode continuar a ser realizada como um protocolo padronizado em que cada tipo de tumor recebe determinada dose

de radiação, sem que sejam consideradas todas essas diferenças interindividuais e genéticas. Em relação à radioterapia, a genética e todos os conhecimentos gerados até o momento ainda não conseguiram promover avanços suficientes que justificassem mudanças na conduta terapêutica, embora a necessidade da pesquisa nesta área seja evidente.

VII – BIBLIOGRAFIA

- 1- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec;127(12):2893-917.
- 2- Estimativas 2012: Incidência de câncer no Brasil. Inca, 2011. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa>. Acessado em dezembro de 2011.
- 3- Câncer de próstata. INCA, 2011. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acessado em dezembro de 2011.
- 4- Boyle P, Levin B (Eds.). Prostate Cancer. In *World Cancer Report 2008*, IARC Press, International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organisation (WHO). Lyon, 2008; pp. 450-455.
- 5- Potosky AL, Miller BA, Albertsen PC, Kramer BS. The Role of Increasing Detection in the Rising Incidence of Prostate Cancer. *JAMA*. 1995 Feb;273(7):548-52.
- 6- Mettlin C, Murphy GP, Babaian RJ, ET al. The results of a Five-year early prostate cancer detection intervention. *Cancer* 1996 Jan;77(1):150-9.
- 7- Gerber GS, Thompson IM, Thisted R, Chodak GW. Disease-specific survival following routine prostate cancer screening by digital rectal examination. *JAMA*. 1993 Jan; 269(1):61-4.
- 8- D'Amico AV & Hanks GE. Combined modality staging. In: *Radiotherapeutic management of prostate adenocarcinoma*. 1th ed. Arnold 1999. Cap1, p.1-19.
- 9- Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL. Tumores de Próstata. In: *Radioterapia em Oncologia*. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999. cap. 25, p. 643-685.
- 10- Choe KS, Liauw SL. Radiotherapeutic strategies in the management of low-risk prostate cancer. *Scientific World Journal*. 2010 Sep;10:1854–69.
- 11- Marciscano AE, Hardee ME, Sanfilippo N. Management of High-Risk Localized Prostate Cancer. *Adv Urol*. 2012; 2012:641-89.
- 12- Stewart BW, Kleihues P (Eds.). Radiotherapy. In *World Cancer Report 2003*, IARC Press, International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organisation (WHO). Lyon, 2003; pp. 277-280.
- 13- Kerns SL, Ostrer H, Stock R, et al. Genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPS) associated with the development of erectile dysfunction in african-american men after radiotherapy for prostate cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys* 2010 Dec;78(5):1292-300.
- 14- Cesaretti JA, Stock RG, Atencio DP, et al. A genetically determined dose-volume histogram predicts for rectal bleeding among patients treated with prostate brachytherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*. 2007 Aug;68(5):1410-6.
- 15- Peters CA, Stock RG, Cessaretti JA, et al. TGFB1 single nucleotide polymorphisms are associated with adverse quality of life in prostate cancer patients treated with radiotherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys*. 2008 Mar;70(3):752-9.

- 16- Burnet NG, Wurm R, Peacock JH. Low dose-rate fibroblast radiosensitivity and the prediction of patient response to radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 1996 Sep;70(3):289-300.
- 17- Yarbro CH, Ferrans CE. Quality of life of patients with prostate cancer treated with surgery or radiation therapy. *Oncol Nurs Forum* 1998;25:685-93.
- 18- Shipley WU, Zietman AL, Hanks GE, Coen JJ, Caplan RJ, Won M, et al. Treatment related sequelae following external beam radiation for prostate cancer: a review with an update in patients with stages T1 and T2 tumor. *J Urol* 1994;152:1799-805.
- 19- Popanda O, Marquardt JU, Chang-Claude J, Schmezer P. Genetic variation in normal tissue toxicity induced by ionizing radiation. *Mutat Res.* 2008 Jul;667(1-2):58-69.
- 20- Cesaretti JA, Stock RG, Leherer S, et al. ATM sequence variants are predictive of adverse response among patients treated for prostate cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2005 Jan;61(1):196-202.
- 21- Eng TY, Thomas CR, Herman TS. Primary radiation therapy for localized prostate cancer. *Urologic Oncology.* 2002 Nov-Dec;7:239-57.
- 22- Kannan V, Sathiyarayanan VK, Sagde S, Anand V, Almel S, Kapadia A, Srinivas V. Three dimensional conformal radiation therapy in prostate adenocarcinoma: Survival and rectal toxicity. *Journal of Cancer Research and Therapeutics.* 2005 Jan-Mar;1(1): 34-7.
- 23- McCloskey SA, Ellerbroek NA, McCarthy L, Malcolm AW, Tao ML, Wollman RC, Rose CM. Cancer treatment outcomes of three-dimensional conformal radiotherapy for localized prostate carcinoma: a large community-based experience. *2004 Dec; 101(11): 2693-700.*
- 24- Hong TS, Ritter MA, Tome WA, Harari PM. Intensity-modulated radiation therapy: emerging cancer treatment technology. *Br J Cancer.* 2005 May;92(10):1819-24.
- 25- Zelefsky MJ, Levin EJ, Hunt M, Yamada Y, Shippy AM, Jackson A, Amols HI. Incidence of late rectal and urinary toxicities after three-dimensional conformal radiotherapy and intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Mar;70(4):1124-9.
- 26- Alicikus ZA, Yamada Y, Zhang Z, Pei X, Hunt M, Kollmeier M, Cox B, Zelefsky MJ. Ten-year outcomes of high-dose, intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer. *Cancer.* 2011 Apr;117(7):1429-37.
- 27- Ten Haken RK, Forman JD, Heimburger DK, Gerhardsson A, McShan DL, Perez-Tamayo C, Schoepfel SL, Lichter AS. Treatment planning issues related to prostate movement in response to differential filling of the rectum and bladder. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991 Jun;20:1317-24.
- 28- Gill S, Thomas J, Fox C, Kron T, Rolfo A, Leahy M, Chander S, Williams S, Tai KH, Duchesne GM, Foroudi F. Acute toxicity in prostate cancer patients treated with and without image-guided radiotherapy. *Radiat Oncol.* 2011 Oct;6:145.
- 29- Ferreira CG, Rocha JCC. Processos de reparo do DNA. In: *Oncologia molecular, segunda edição.* Rio de Janeiro: Atheneu, 2010. cap. 5, p.61-81.

- 30- Iliakis, G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays*. 1991 Dec;13:641–8.
- 31- Altieri F, Grillo C, Maceroni M, Chichiarelli S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008 May;10(5): 891-937.
- 32- Friedberg EC, Lehmann AR, and Fuchs RP. Trading places: how do DNA polymerases switch during translesion DNA synthesis? *Mol Cell*. 2005 May;18:499–505.
- 33- Pollard TD, Earshaw WC. *Biologia Celular*. Tradução de Andrea Leal Affonso Mathiles et al. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- 34- The TP53 web site. [acesso em jan 2012]. Disponível em <http://p53.free.fr>
- 35- Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986 Mar;320:84-5.
- 36- Khoury MP, Bourdon JC. P53 Isoforms: an intracellular microprocessor? *Genes Cancer*. 2011 Apr;2(4):453-65.
- 37- Levav-Cohen Y, Haupt S, Haupt Y. MDM2 in growth signaling and cancer. *Growth Factors*. 2005 Sep; 23(3):183-92.
- 38- Hall EJ, Giaccia AJ. *Cancer Biology*. In: *Radiobiology to the radiologist*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. cap. 17, p. 274-302.
- 39- Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol*. 1987 Feb;7(2):961-3.
- 40- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*. 2003 Mar.;33(3):357-65.
- 41- Gu Y, Zhou X, Zhang SL. Meta-analysis of an association of codon 72 polymorphisms of the p53 gene with increased endometrial cancer risk. *Genet Mol Res*. 2011 Oct 31;10(4).
- 42- Chen X, Liu F, Li B, Wei YG, Yan LN, Wen TF. P53 codon 72 polymorphism and liver cancer susceptibility: a meta-analysis of epidemiologic studies. *World J Gastroenterol*. 2001 Mar;17(9):1211-18.
- 43- Zhou Y, Li N, Zhuang W, Wu X. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer risk in a Chinese Han population. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010 Dec;14(6):829-33.
- 44- Li MS, Liu JL, Wu Y, Wang P, Teng H. Meta-analysis demonstrates no association between p53 codon 72 polymorphism and prostate cancer risk. *Genet Mol Res*. 2011 Nov;10(4):2924-33.
- 45- Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is there a biological plausibility for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development? *Acta Med Port*. 2011 Jan-Feb;24(1):127-34.
- 46- Tang NP, Wu YM, Wang B, Ma J. Systematic review and meta-analysis of the association between p53 codon 72 polymorphism and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2010 May;36(5):431-8.
- 47- Tan XL, Popanda O, Ambrosone CB, Kropp S, et al. Association between TP53 and p21 genetic polymorphisms and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 2006 Jun;97:255-62.
- 48- Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B. Simple sequence repeat polymorphism within

- the p53 gene. *Oncogene*. 1993 Jun;8(6):1703-5.
- 49- Wang-Gohrke S, Weikel W, Risch H, Vesprini D, Abrahamson J, Lerman C, Godwin A, Moslehi R, Olipade O, Brunet JS, Stickeler E, Kieback DG, Kreienberg R, Weber B, Narod SA, Runnebaum IB. Intron variants of the p53 gene are associated with increase risk for ovarian cancer but not in carriers of BRCA1 or BRCA2 germline mutations. *Br J Cancer*. 1999 Sep;81(1):179-183.
- 50- Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutiérrez-Enríquez S, Hall J, Guino E, Peinado MA, Capella G, Canzian F. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*. 2004 Mar;23(10):1954-6.
- 51- Savitsky K, Stez S, Tagle DA, Ziv Y, et al. The complete sequence of the coding region of the ATM gene reveals similarity to cell cycle regulators in different species. *Hum. Mol. Genet*. 1995 Nov;4:2025-32.
- 52- Lavin M. F, Delia D, Chessa L. ATM and the DNA damage response: workshop on ataxia-telangiectasia and related syndromes. *EMBO Rep*, 2006 Feb;7(2):154-60.
- 53- Chistiakov DA, Voronova NV, Chistiakov PA. Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncologica* 2008; 47: 809-24.
- 54- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=atm>
- 55- Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003 Jan;421(6922):499-506.
- 56- Thorstenson YR, Shen P, Tusher VG, Wayne TL, Davis RW, Chu G, Oefner PJ. Global analysis of ATM polymorphism reveals significant functional constraint. *Am J Hum Genet*. 2001 Aug;69(2):396-12.
- 57- Maillet P, Vaudan G, Chappuis P, Sappino A. PCR-mediated detection of a polymorphism in the ATM gene. *Mol Cell Probes*. 1999 Feb;13(1):67-9.
- 58- Angèle S, Falconer A, Edwards SM et al. ATM polymorphisms as risk factors for prostate cancer development. *Br J Cancer*. 2004 Aug;91(4):783-7.
- 59- Andreassen CN, Overgaard J, Alsner J et al. ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after posmastectomy radiotherapy. *Int. J. Radiat Oncol Biol. Phys*. 2006 Mar; 64:776-83.
- 60- Bentzen SM, Parliament M, Deasy JO et al. Biomarkers and surrogate endpoints for normal-tissue effects of radiation therapy: importance of dose-volume effects. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys* 2010 Mar;76(3 Suppl): S145-50.
- 61- Burnet NG, Peacock JH. Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother Oncol*. 2002 Mar;62(3):350-1.
- 62- Marcou Y, D'Andrea A, Jeggo PA, Plowman PN. Normal cellular radiosensitivity in an adult Fanconi anaemia patient with marked clinical radiosensitivity. *Radiother Oncol* 2001 Jul; 60(1):75-9.
- 63- Pugh TJ, Keyes M, Barclay L, et al. Sequence Variant Discovery in DNA Repair Genes from Radiosensitive and Radiotolerant Prostate Brachytherapy

- Patients. Clin Cancer Res. 2009 Aug;15:5008-16.
- 64- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard M, Overgaard J. Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. Radiother Oncol 2003 Nov; 69(2):127-35.
- 65- Hendry JH. Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy. Radiother Oncol 2001 May; 59(2):117-26
- 66- Raaphorst GP, Malone S, Alsbeih G, Souhani L, Szumacher E, Girard A. Skin fibroblasts in vitro radiosensitivity can predict for late complications following AVM radiosurgery. Radiother Oncol. 2002 Aug;64(2):153-6.
- 67- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard J. Does variability in normal tissues reactions after radiotherapy have a genetic basis – where and how to look for it? Radiother Oncol 2002 Aug; 64:131-40.
- 68- Cox JD, Stetz J, Pajak TK. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995 Mar;31(5):1341-6.
- 69- Marzi S, Saracino B, Petrongari MG et al. Modeling of alpha/beta for late rectal toxicity from a randomized phase II study: conventional versus Hypofractionated scheme for localized prostate cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2009 Aug;28:117.
- 70- Chen SW, Liang JA, Shiau AC et al. Lack of dose-rate effect of ¹⁹²Ir source activity on pelvic control and late complications after high-dose-rate brachytherapy for cervical cancer. J Radiat Res (Tokyo). 2010;51(2):173-9.
- 71- Felley-Bosco E, Weston A, Cawley HM, Bennett WP, Harris CC. Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. Am J Hum Genet. 1993 Sep;53(3):752-9.
- 72- Gleason D. Classification of prostate carcinomas. Cancer Chemother Rep. 1966 Mar;50(3):125-8.
- 73- Baillar J, Mellinger G, Gleason D: Survival rates of patients with prostatic cancer, tumor stage and differentiation- a preliminary report. Cancer Chemotherap Rep. 1966 Mar;50(3):129-36.
- 74- Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histologic grading and clinical staging. J Urol. 1974 Jan;111(1):58-64.
- 75- Gleason DF and The Veteran's Administration Cooperative Urologic Research Group: Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma, in Urologic Pathology: The Prostate (Tannenbaum M., ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, 1977;171-97.
- 76- Hodge K, McNeal JE, Terris MK, Stamey TA: Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. J Urol. 1989 Jul;142(2):71-74.
- 77- Gleason DF. Histology grading of prostate cancer: a perspective. Hum Path. 1992 Mar; 23(3):273-9.
- 78- Allsbrook Jr WC, Mangold KA, Yang X, et al: The Gleason grading system: an overview. J Urologic Path. 1999;10:141-157.
- 79- Barnett GC, De Meerleer G, Gulliford SL, Sydes MR, Rlliott RM, Dearnaley DP. The impact of clinical factors on the development of late radiation toxicity: results from the Medical Research Council RT01 trial (ISRCTN47772397).

- Clin Oncol (R Coll Radiol). 2011 Nov;23(9):613-24.
- 80- Vavassori V, Fiorino C, Rancati T, et al. Predictors for rectal and intestinal acute toxicities during prostate cancer high-dose 3D-CRT: results of a prospective multicenter study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Apr;67:1401-10.
- 81- Liu M, Pickles T, Agranovich A, et al. Impact of neoadjuvant androgen ablation and other factors on late toxicity after external beam prostate radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Jan;58:59-67.
- 82- Bria E, Cuppone F, Giannarelli D, Milella M, Ruggeri EM, Sperduti I, Pinnarò P, Terzoli E, Cognetti E, Carlini P. Does hormone treatment added to radiotherapy improve outcome in locally advanced prostate cancer?:meta-analysis of randomized trials. *Cancer*. 2009 Aug;115(15):3446-56.
- 83- Jani AB, Gratzle J, Myers M. Impact of hormone therapy on acute radiotherapy toxicity in the treatment of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2005 Jun;8(3):224-8.
- 84- Jani AB, Gratzle J. Late radiotherapy toxicity after prostate cancer treatment: influence of hormonal therapy. *Urology*. 2005 Sep;66(3):566-70.
- 85- Ferrandis C, March JA, Martínez JM, Hernández J, Diez N, Morillo V, García F, Chuan P. Combined external radiotherapy and hormone therapy in patients with locally advanced prostate cancer: predictive factors of genitourinary toxicity. *Actas Urol Esp*. 2011 Mar;35(3):146-51.
- 86- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*. 2003 Mar;33: 357-65.
- 87- Sullivan A, Syed N, Gasco M et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2004 Apr;23(19):3328-37.
- 88- Li, X., Dumont P, Pietra AD, Shetler C, Murphy ME. The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *J. Biol. Chem*. 2005 Jun;280(25):24245-51.
- 89- Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*. 2009 Jul;460(7254):529-33.
- 90- Hall EJ, Schiff PB, Hanks GE. A preliminary report: frequency of A-T heterozygotes among prostate cancer patients with severe late responses to radiation therapy. *Cancer J Sci Am*. 1998 Nov; 4(6):385–9.
- 91- Meyer A, Wilhelm B, Dork T. ATM missense variant P1054R predisposes to prostate cancer. *Radiother Oncol*. 2007 Jun;83(3), 283–8.
- 92- Ho AY, Fan G, Atencio DP, et al. Possession of ATM sequence variants as predictor for late normal tissue responses in breast cancer patients treated with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007 Nov;69(3):677-84.
- 93- Edvardsen H, Tefre T, Jansen L, et al. Linkage disequilibrium pattern of the ATM gene in breast cancer patients and controls; association of SNPs and haplotypes to radio-sensitivity and post-lumpectomy local recurrence. *Radiol Oncol*. 2007 Jul;2:25
- 94- Clinical Trials [<http://clinicaltrials.gov>]. Radiation Therapy in Treating Patients With Stage II or Stage III Prostate Cancer. [Acesso jan 2012]. Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT0002602?term=NCT00002602&rank=1>

- 95- Damaraju S, Murray D, Dufour J et al.
Association of DNA repair and steroid metabolism gene polymorphisms with clinical late toxicity in patients treated with conformal radiotherapy for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr;12(8):2545–54.
- 96- Burri RJ, Stock RG, Cesaretti JA et al.:
Association of single nucleotide polymorphisms in SOD2, XRCC1 and XRCC3 with susceptibility for the development of adverse effects resulting from radiotherapy for prostate cancer. *Radiat Res.* 2008 Ju;170(1):49–9.
- 97- Suga T, Iwakawa M, Tsuji H et al.:
Influence of multiple genetic polymorphisms on genitourinary morbidity after carbon ion radiotherapy for prostate cancer. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Nov;72(3):808–13.
- 98- West C, Rosenstein BS, Alsner J et al.:
Establishment of a Radiogenomics Consortium. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010 Apr; 76(5):1295–6.

ANEXO 01

Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE

Número ficha: _____ CID: _____ Projeto: _____ Prontuário: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Esse consentimento é exclusivo para esta pesquisa, sem possibilidade de extensão do mesmo para outros projetos. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final este documento, que está em duas vias (uma da pesquisadora e a outra sua). Em caso de recusa você não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida sobre seus direitos você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge ou o Coordenador do Comitê de Ética pelo telefone (062) 3243-7000, ramal 7089.

O título da pesquisa é “**Radiossensibilidade exacerbada do tecido normal em tratamento radioterápico para tumores de Cabeça e pescoço, Câncer de Colo uterino e Câncer de próstata: análise dos polimorfismos de base única (SNPs) do gene p53 e ATM**”.

As pesquisadoras responsáveis são a Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi e a Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares, que, em caso de dúvidas podem ser contactadas pelos telefones (062) 3243-7022/3243-7059.

Sobre a pesquisa:

- Esse estudo se propõe a avaliar a variação dos efeitos colaterais secundários à radioterapia que o senhor (a) recebeu no último ano. Para isso utilizaremos as informações escritas no seu prontuário e estamos solicitando que o senhor (a) doe uma amostra de sangue pequena (15ml que equivale a menos que uma seringa) para que possamos estudar o seu sangue (avaliação do seu DNA) e descobrir porque alguns pacientes apresentam mais efeitos colaterais que outros.

- Seu acompanhamento e tratamento não serão alterados em nada por este estudo.

- Os resultados deste estudo poderão ajudar a desenvolver um método para diminuir os efeitos colaterais do tratamento com a radioterapia;

- Seus dados pessoais (como nome) permanecerão confidenciais, sem exposição pública, sendo o senhor (a) identificada apenas por um número;

- Não haverá qualquer compensação financeira por sua participação no projeto de pesquisa;

- Se houver necessidade, você terá a assistência necessária, decorrente da sua participação no estudo;

- Você poderá retirar seu consentimento a qualquer hora sem prejuízo para seu tratamento ou acompanhamento;

Eu, _____, RG _____, CPF _____, prontuário _____, concordo em participar da pesquisa acima descrita, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência ou tratamento.

Goiânia, ____ de _____ de 20____.

Assinatura da paciente

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar.

Testemunha: _____ Assinatura: _____

Testemunha: _____ Assinatura: _____

ANEXO 02

Morbidade segundo o RTOG

Tabela 1 – Pele

Grau	Sintomas
Grau 0	Sem mudança.
Grau 1	Eritema folicular fraco ou apagado, epilação, descamação seca, diminuição da sudorese.
Grau 2	Eritema brando ou claro, descamação úmida em placas, edema moderado.
Grau 3	Descamação úmida confluyente, além das dobras da pele ou edema em casca de laranja.
Grau 4	Ulceração, hemorragia ou necrose.

Tabela 2 – Membrana mucosa

Grau	Sintomas
Grau 0	Sem mudança.
Grau 1	Eritema puntiforme, pode haver dor branda sem a necessidade de analgésicos.
Grau 2	Mucosite em placas que pode produzir uma secreção serossanguinolenta inflamatória. Pode haver dor moderada necessitando de analgésicos.
Grau 3	Mucosite fibrinosa confluyente. Pode incluir dor intensa, necessitando de narcóticos.
Grau 4	Ulceração, hemorragia ou necrose.

Tabela 3 – Trato Urinário

Grau	Sintomas
Grau 0	Sem mudança.
Grau 1	Frequência urinária ou nictúria 2x maior que o habitual. Urgência miccional não necessitando de medicação.
Grau 2	Frequência urinária ou nictúria menos frequente do que a cada hora. Disúria ou espasmo de bexiga necessitando de analgésico tópico.
Grau 3	Frequência urinária ou nictúria a cada hora ou mais frequente. Disúria, dor pélvica ou espasmo de bexiga necessitando o uso de narcóticos regularmente. Hematúria macroscópica, com ou sem coágulos.
Grau 4	Hematúria requerendo transfusão. Obstrução aguda da bexiga. Ulceração ou necrose.

Tabela 4 – Trato Gastrointestinal Superior

Grau	Sintomas
Grau 0	Sem mudança.
Grau 1	Anorexia com menos de 5% de perda de peso. Náuseas não necessitando de antieméticos. Desconforto abdominal não necessitando de drogas parassimpatolíticas ou analgésicos.
Grau 2	Anorexia com menos de 15% de perda de peso. Náuseas ou vômitos necessitando de antieméticos. Dor abdominal necessitando de analgésicos.
Grau 3	Anorexia com mais de 15% de perda de peso ou necessitando de sonda nasogástrica ou de suporte parenteral. Dor abdominal intensa ou distensão (radiografias demonstrando distensão de alças intestinais). Hematêmese ou melena.
Grau 4	Obstrução aguda ou subaguda do íleo e dor abdominal intensa. Perfuração intestinal ou sangramento requerendo transfusão.

Tabela 5 - Trato Gastrointestinal Inferior

Grau	Sintomas
Grau 0	Sem mudança.
Grau 1	Aumento da frequência ou modificação do hábito intestinal não necessitando de medicação. Sem desconforto retal.
Grau 2	Diarréia necessitando de drogas parassimpatolíticas. Descamação de mucosa ou dor retal e abdominal.
Grau 3	Diarréia requerendo suporte parenteral. Mucosite grave ou sangramento necessitando de fraldas.
Grau 4	Obstrução aguda ou subaguda, fístula ou perfuração. Sangramento requerendo transfusão. Dor abdominal ou tenesmo necessitando de sonda nasogástrica.

Tabela 6 – Sistema Hematopoiético

Grau	Sintomas
Grau 0	Sem mudança.
Grau 1	$11 > \text{Hb} \geq 9,5$ $4000 > \text{leucócitos} \geq 3000$ $1900 > \text{neutrófilos} \geq 1500$ $100.000 > \text{plaquetas} \geq 75.000$
Grau 2	$9,5 > \text{Hb} \geq 7,5$ $3000 > \text{leucócitos} \geq 2000$ $1500 > \text{neutrófilos} \geq 1000$ $75.000 > \text{plaquetas} \geq 50.000$
Grau 3	$7,5 > \text{Hb} \geq 5,0$ $2000 > \text{leucócitos} \geq 1000$ $1000 > \text{neutrófilos} \geq 500$ $50.000 > \text{plaquetas} \geq 25.000$
Grau 4	$\text{Hb} < 5,0$ $\text{Leucócitos} < 1000$ $\text{neutrófilos} < 500$ $\text{plaquetas} < 25.000$

* Grau 5: Morte.

Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 31:1341-6.

Anexo 3

Protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

CEP/ACCG - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

PROTOCOLO CEPACCG Nº 035/07

Goiânia, 27/09/2007

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Dra. Renata de Bastos Ascenço Soares

TÍTULO: Implantação do 1º Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia de Goiás

SUB PROJETO 1- Predição da radiosensibilidade da pele e do tecido subcutâneo pela análise do polimorfismo dos genes p53 e ATM: Avaliação prospectiva e retrospectiva de pacientes com câncer de mama submetidas à radioterapia

SUB PROJETO 2- Radiossensibilidade exacerbada do tecido normal em tratamento radioterápico para tumores de cabeça e pescoço, câncer de próstata: Análise dos polimorfismos de base única (SNPs) do gene p53 e do ATM

SUB PROJETO 3- Reparo e repopulação tumoral: Avaliação do papel do p53 na radioresistência tumoral em carcinomas de cabeça e pescoço


Área Temática: Grupo III

Local de Realização: Hospital Araújo Jorge/ACCG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG, analisou e **aprovou sem restrições** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os sub projetos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, **relatórios trimestrais** do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).


DR. GERALDO SILVA QUEIROZ
Coordenador do CEPACCG

Anexo 04

Estadiamento de tumores de próstata²

648

RADIOTERAPIA EM ONCOLOGIA

Quadro 25.1. Sistema de estadiamento TNM para tumores confinados à próstata

Estádio	
TNM	Descrição
<i>TX</i>	Tumor não pode ser avaliado
<i>T0</i>	Sem evidência de tumor primário
<i>T1</i>	Tumor clinicamente inaparente, não-palpável ou visível por imagem
<i>T1a</i>	Tumor como achado incidental à RTU (\leq 5% do tecido ressecado)
<i>T1b</i>	Tumor como achado incidental à RTU ($>$ 5% do tecido ressecado)
<i>T1c</i>	Tumor identificado por biópsia por agulha (p. ex., por PSA elevado)
<i>T2</i>	Tumor confinado à próstata*
<i>T2a</i>	Tumor envolve um lobo
<i>T2b</i>	Tumor envolve ambos os lobos
<i>T3</i>	Tumor se estende através da cápsula prostática**
<i>T3a</i>	Extensão extracapsular (uni ou bilateral)
<i>T3b</i>	Tumor invade vesícula(s) seminal(is)
<i>T4</i>	Tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes que não a vesícula seminal***
<i>T4a</i>	Tumor invade qualquer um: colo vesical, esfíncter externo ou reto
<i>T4b</i>	Tumor invade músculos elevadores do ânus e/ou está fixo à parede pélvica
Tumor primário patológico (pT)	
pT2****	Confinado ao órgão
pT2a	Unilateral
pT2b	Bilateral
pT3	Extensão extraprostática
pT3a	Extensão extraprostática
pT3b	Invasão de vesícula seminal
pT4	Invasão da bexiga, reto
Linfonodos regionais (hipogástricos, obturadores, ilíacos internos e externos, periprostáticos e sacrais-laterais, pré-sacrais, promontório [de Gerota]):	
<i>NX</i>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
<i>N0</i>	Ausência de linfonodos regionais metastáticos
<i>N1</i>	Metástase em um único linfonodo, menor ou igual a 2 cm na maior dimensão
Metástase a distância*****	
<i>MX</i>	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
<i>M0</i>	Ausência de metástase a distância
<i>M1</i>	Metástase a distância
M1a	linfonodos não-regionais (paraórticos, lombares, ilíacos comuns, inguinais superficiais, retroperitoneais, supraclaviculares, cervicais, escalenos)
M1b	osso(s)
M1c	outro(s) sítio(s)
Gradação histológica	
<i>GX</i>	Grau não pode ser avaliado
<i>G1</i>	Bem-diferenciado (anaplasia leve)
<i>G2</i>	Moderadamente diferenciado (anaplasia moderada)
<i>G3-4</i>	Pouco diferenciado ou indiferenciado (anaplasia marcante)
Gradação de Gleason (caso agrupamento de graus de Gleason seja necessário para pesquisa)	
2-4	bem-diferenciado
5-6	moderadamente diferenciado
7	moderadamente/pouco diferenciado
8-10	pouco diferenciado

Fonte: AJCC Cancer Staging Handbook 1998

* Tumor encontrado em um ou ambos os lobos por biópsia por agulha, mas não palpável ou visível à imagem é classificado como T1c.

** Invasão do ápice prostático ou da (e não além da) cápsula prostática não é classificada como T3, mas como T2.

*** Colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores e/ou parede pélvica.

**** Não há estadiamento pT1

***** Quando mais de um sítio de metástase está presente, a categoria mais avançada é usada.

Salvajoli JV, Souhami L, Faria SL. Radioterapia em Oncologia. Capítulo 25. MEDSI Editora Médica e Científica Ltda. 1999.