

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

GLÁUCIA FERNANDA DE LIMA PEREIRA

**Espectro e frequência de mutações germinativas em genes de
predisposição ao câncer em pacientes com carcinoma de próstata**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof. Dra Maria Aparecida Azevedo
Koike Folgueira

São Paulo
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA

GLÁUCIA FERNANDA DE LIMA PEREIRA

**Espectro e frequência de mutações germinativas em genes de
predisposição ao câncer em pacientes com carcinoma de próstata**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof. Dra Maria Aparecida Azevedo
Koike Folgueira

São Paulo
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pereira, Gláucia Fernanda de Lima
Espectro e frequência de mutações germinativas em
genes de predisposição ao câncer em pacientes com
carcinoma de próstata / Gláucia Fernanda de Lima
Pereira. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike
Folgueira.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata/genética
2.Genômica 3.Câncer hereditário 4.Predisposição
genética para doenças 5.Germinativo 6.Variantes

USP/FM/DBD-522/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Pereira GFL. Espectro e frequência de mutações germinativas em genes de predisposição ao câncer em pacientes com carcinoma de próstata [doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, por sua infinita misericórdia, aos meus pais e minha irmã, que sempre me incentivaram e apoiaram minhas decisões. Aos pacientes, e seus familiares, que bravamente enfrentam o difícil diagnóstico de câncer, em especial, aos meus avós

Vicente e Jerusa (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por sua infinita bondade, graça e misericórdia! Agradeço imensamente por Ele ter me trazido até aqui e me sustentado em todos os momentos.

Agradeço aos meus pais e minha irmã por todo apoio, por nunca me deixarem desistir e por sempre acreditarem em mim, quando nem eu mesma acreditava. Obrigada papis e mamis por terem enfrentado as adversidades e estatísticas ao saírem de Valença, para que nossa família pudesse ter um mar de possibilidades e oportunidades no futuro. Obrigada por tamanha coragem! Nós conseguimos! Obrigada por terem nos ensinado a valorizar a vida, os momentos, a educação que nos foi permitida ter. Agradeço muito a minha irmã pela nossa parceria, cuidado e incentivo mútuo! Amo muito vocês!

Agradeço à minha madrinha Neusa e meus primos pela acolhida em sua casa aqui em São Paulo, e também aos meus tios Ademildo e Rachel, e meus priminhos por me receberem em sua casa quando decidi voltar pra cá.

Agradeço aos meus companheiros de CTO por estarem comigo ao longo destes 5 anos e por todo o apoio e carinho! Vocês tornaram esse tempo mais leve! Em especial, à Lívia, Isa e Amanda, minhas irmãs de caminhada!

Agradeço imensamente ao meu grupo de pesquisa, que se tornou uma família imprescindível para que eu pudesse chegar até aqui! Lucia, Simone e Rosi, obrigada por ultrapassarem as barreiras hierárquicas e se tornarem minhas amigas! Obrigada por serem minhas companheiras de aventuras na bancada e no ambulatório. Obrigada pelas noites viradas enquanto fazíamos experimentos ou escrevíamos esta tese!

Agradeço à minha orientadora Profa Cida Koike por todos os ensinamentos, incentivos, oportunidades, e também paciência. Eu aprendi e amadureci muito nesses anos de convívio!

Agradeço aos meus amigos de Kzoo, que fazem minha vida melhor há 10 anos, aos meus amigos e irmãos em Cristo pelo apoio e por me suportarem em oração, e ao meu namorado Fernando pela paciência e apoio nesse momento tão desafiador!

RESUMO

Pereira GFL. Espectro e frequência de mutações germinativas em genes de predisposição ao câncer em pacientes com carcinoma de próstata [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

A herdabilidade no câncer de próstata é pouco explorada em indivíduos miscigenados. A população brasileira apresenta uma miscigenação étnica única composta pelas ancestralidades europeia, africana e ameríndia. Assim, no presente estudo, nós exploramos o espectro e a frequência de variantes germinativas em genes de predisposição ao câncer em uma coorte de pacientes brasileiros com câncer de próstata. Foram incluídos 69 pacientes com câncer de próstata e realizado sequenciamento de nova geração (NGS) para avaliar um painel de 113 genes de predisposição ao câncer. A coorte foi composta por 51,5% de indivíduos autodeclarados como homens pardos miscigenados. Cinquenta e cinco por cento dos pacientes relataram história familiar de câncer; 30%, história familiar de câncer de próstata; 16%, história familiar de câncer de mama, ovário, pâncreas, endométrio e intestino. Esta coorte compreendia principalmente pacientes com doença de alto risco (92.75%). Onze (16%) pacientes eram carreadores de variantes germinativas patogênicas em: *ATM*, *BRCA2*, *CASR*, *CHEK2*, *DICER1*, *ERCC2*, *FANCA*, *MSH6*, *PMS2*, *RINT1* e *XPC*. Todos os genes foram alterados em um único paciente, exceto por *ATM*, alterado em dois pacientes. Oitenta e dois por cento das variantes ocorreram em genes de reparo do DNA. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos de carreadores e não carreadores para: idade, história familiar de câncer, IMC, Escore de Gleason, ou metástases à distância. O seguimento mediano foi de 47,91 meses e a sobrevida mediana não foi alcançada. No período foram observados 27 óbitos. Houve diferença na sobrevida global de pacientes de acordo com estadiamento e PSA iniciais, mas não em relação ao estado de carreador de variantes patogênicas em genes de predisposição ao câncer. Em uma coorte brasileira miscigenada, com predominância de pacientes pardos, um amplo espectro de genes mostrou-se afetado, compreendendo tanto genes classicamente associados ao

câncer de próstata, quanto novos candidatos. Estes dados indicam que a população brasileira merece estudos adicionais para ampliar o conhecimento sobre a contribuição da predisposição genética para o desenvolvimento de câncer de próstata.

Palavras-chave: Neoplasias da próstata/genética. Genômica. Câncer hereditário. Predisposição genética para doenças. Germinativo. Variantes

ABSTRACT

Pereira GFL. Spectrum and frequency of germline mutations in cancer predisposition genes in prostate carcinoma patients [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Heritability in prostate cancer is not well explored in miscegenated people. The Brazilian population has a unique ethnic admixture of European, African, and Amerindian ancestries. Hence, we explored the spectrum and frequency of germline mutations in cancer predisposition genes in Brazilian prostate cancer patients. We included 69 prostate cancer patients and performed next generation sequencing (NGS) to evaluate a panel of 113 hereditary cancer predisposition genes. The cohort was composed of 51.5% of self-declared brown admixed ancestry men. Fifty-five percent of the patients presented family history of cancer; 30% family history of prostate cancer, and 16% family history of breast, ovarian, pancreatic, intestinal, or endometrial cancers. This cohort was enriched for high-risk disease (92.75%). Eleven (16%) patients were pathogenic germline variant carriers in *ATM*, *BRCA2*, *CASR*, *CHEK2*, *DICER1*, *ERCC2*, *FANCA*, *MSH6*, *PMS2*, *RINT1*, and *XPC*. All genes were affected in only one patient, except for *ATM*, altered in two patients. Eighty-two percent of the variants occurred in DNA repair genes. No statistical differences were observed between the groups of carriers and non-carriers for age, family history of cancer, BMI, Gleason score, or distant metastasis. The median follow-up was 47.91 months, and the median survival was not reached. During this period 27 deaths were observed. There were statistically significant differences in overall survival for staging, and in the initial PSA, but not in relation to the status of PGV carrier in cancer predisposition genes. In a Brazilian miscegenated cohort with predominance of brown patients, there was a wide spectrum of affected genes, comprehending both classical genes associated with prostate cancer predisposition, and novel candidates. This data indicates that the Brazilian population deserves further studies to amplify the knowledge about the contribution of genetic predisposition for developing prostate cancer.

Keywords: Prostatic neoplasms/genetics. Genomics. Hereditary cancer. Genetic predisposition to disease. Germline. Variants.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Epidemiologia	16
1.2 Anatomia e fisiopatologia	16
1.3 Classificação histológica	18
1.4 Grau de diferenciação celular- Escore de Gleason	18
1.5 Estadiamento	19
1.6 Estratificação de Risco	21
1.6.1 Risco muito baixo.....	22
1.6.2 Baixo Risco	22
1.6.3 Risco intermediário	22
1.6.4 Alto risco	22
1.7 Fatores de risco	23
1.7.1 Predisposição Genética	23
1.7.1.1 BRCA1 e BRCA2 - Breast cancer susceptibility genes.....	24
1.7.1.2 BRCA-2, Breast cancer susceptibility gene 2.....	26
1.7.1.3 Genes de Mismatch repair, ou reparo de mau pareamento.....	27
1.7.1.4 <i>HOXB13, Home-box 17</i>	29
1.7.1.5 <i>TP53-Tumor Protein P53</i>	30
1.8 BRASIL	30
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	33
Objetivo Geral	33
Objetivos Específicos	33
4. MÉTODOS	34
4.1 Desenho do estudo	34
4.2 Estratégia de inclusão	34
4.3 Critérios de inclusão - Sequenciamento Painel Hereditary TruSight Cancer	35
4.4 Critérios de inclusão - Sequenciamento de Exoma Twist Bioscience	35
4.5 Critérios de exclusão -Sequenciamento de Exoma Twist Bioscience	35

4.6 Extração, qualidade e quantificação do DNA	35
4.7 Preparo de Bibliotecas protocolo Twist Bioscience	36
4.8 Preparo de Biblioteca protocolo-TruSight Hereditary Cancer - Illumina ..	39
4.9 Processamento de dados, chamada de variantes e classificação	41
4.10 Análise Estatística de Dados	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1 Características clínicas dos pacientes	44
5.2 Pacientes carreadores de variantes patogênicas	47
5.3 Variantes de Significado Incerto.....	53
5.4 Análise de Sobrevida	56
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS.....	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura anatômica da próstata.

Figura 2. Crescimento hormônio-responsivo da próstata

Figura 3. Escore de Gleason

Figura 4. Predisposição Genética

Figura 5. Estrutura e localização do gene *BRCA2*

Figura 6. Estrutura do gene *HOXB13*

Figura 7. Distribuição dos pacientes por local de nascimento

Figura 8. Distribuição de Variantes Germinativas P/PP

Figura 9. Heredogramas Variantes Germinativas P/PP

Figura 10. Variantes de Significado Incerto (VUS)

Figura 11. Sobrevida Global mediana estimada (n= 69)

Figura 12. Sobrevida global de todos os pacientes de acordo com o PSAi e estadiamento clínico

Figura 13. Sobrevida Global de todos os pacientes de acordo com histórico familiar de câncer e Idade ao diagnóstico.

Figura 14. Sobrevida Global de todos os pacientes de acordo com Índice de massa corporal (IMC) e Gleason Score.

Figura 15. Sobrevida Global de todos os pacientes de acordo com genes do Mismatch repair (MMR), Homologous repair (HR) e Nucleotide excision repair (NER)

Figura 16. Sobrevida Global de todos os pacientes de acordo com genes do status mutacional, status mutacional para genes clássicos e status mutacional para outros genes.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características Clínicas dos pacientes

Tabela 2. Características clínico-patológicas

Tabela 3. Variantes de significado incerto

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACGM	American College of Medical Genetics and Genomics
AIMs	Marcadores informativos de ancestralidade
AJCC	Joint Committee on Cancer
ATM	ATM serine/threonine kinase
BRCA1	Breast cancer susceptibility gene 1
BRCA2	Breast cancer susceptibility gene 2
CaP	Câncer de próstata
CaSR	Calcium sensing receptor
CCR	Câncer colorretal
CE	Câncer de endométrio
CEGH-USP	Centro de Estudos do Genoma Humano - Universidade de São Paulo
CENSO-IBGE	Censo demográfico brasileiro
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CM	Câncer de mama
CNV	Variações do número de cópias
CO	Câncer de ovário
COSMIC	Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
dbSNP	Banco de Dados de Polimorfismo de Nucleotídeo Único
DHT	5 alpha-dihidrotestosterona
DICER1	Dicer 1, ribonuclease III
Dx	Diagnóstico
EDTA	Ácido acético tetra-etilenoadimina
ERCC2	ERCC excision repair 2, TFIIH core complex helicase subunit
FANCA	FA complementation group A
GNOMAD	The Genome Aggregation Database
(G1)	Grau 1
(G2)	Grau 2
(G3-4)	Graus 3-4
HF	História familiar
HGVS	Human Genome Variation Society
HOXB13	Homeobox B13

HRR	Homologous recombination repair (Reparo por recombinação homóloga)
ICESP	Instituto do câncer do Estado de São Paulo
IGV	Integrative Genomics Viewer
IMC	Índice de Massa Corpórea
ISUP	International society of urological pathology
MLH1	mutL homolog 1
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
MMR	mismatch repair mutL homolog 1
msCPC	metastatic castration-sensitive prostate cancer
mCRPC	metastatic castration-resistant prostate cancer
MSH2	mutS homolog 2
MSH6	mutS homolog 6
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NER	Nucleotide-excision repair.
NGS	Sequenciamento de nova geração
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PMS2	PMS1 homolog 2, mismatch repair system
PSA	Antígeno prostático específico
PSAi	Antígeno prostático específico inicial
RAD51	RAD51 recombinase
RAD51D	RAD51 paralog D
RINT1	RAD50 Interactor 1
SG	Sobrevida global component
TCLE	Termo de consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris- ácido etilenodiamino tetra-acético
TP53	Tumor protein p53
UDI	Universal dual-index
VAF	Variant Allele Frequency
VEP	Ensembl Variant Effect Predictor
VGP	Variantes patogênicas/provavelmente patogênicas
VSI	Variante de significado incerto
XPC	XPC complex subunit, DNA damage recognition and repair factor

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

O câncer de próstata é o câncer masculino mais prevalente, 2º mais incidente e a 5ª causa de morte por câncer entre indivíduos do sexo masculino no mundo. O Brasil é o 4º país do mundo em incidência e o 3º em mortalidade por câncer de próstata (18.345 mortes estimadas), superado apenas por China e Estados Unidos da América (SUNG ET. AL., 2021).

No Brasil, o câncer de próstata é o câncer masculino mais incidente, excluindo o câncer de pele não-melanoma. Em 2020, ocorreram 15.841 óbitos por câncer de próstata no Brasil e estima-se que 71.730 novos casos ocorram em cada ano do triênio 2023-2025, correspondendo a 30% dos novos casos de câncer em homens (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER -INCA, 2022).

Pacientes com câncer de próstata apresentam elevada taxa de sobrevida em cinco anos (97%), sobretudo aqueles diagnosticados com doença localizada ou regional, cuja sobrevida é próxima a 100%. Em indivíduos com doença metastática à distância ao diagnóstico (8% dos casos), a sobrevida em cinco anos é de 32% (HOWLADER ET. AL., 2019; SIEGEL ET. AL., 2023).

1.2 Anatomia e fisiopatologia

A próstata é um órgão em forma de cone de cerca de 15 a 20g, localizado na parte interna da região pélvica masculina, posterior à bexiga e anterior ao reto, conectado à uretra na região apical e à bexiga em sua região basal, responsável pela produção do líquido prostático, que confere fluidez ao esperma e permite a ejaculação.

A próstata é composta por ductos epiteliais envoltos de estroma e dividida em 3 zonas histológicas: central, transição e periférica. A zona de transição localiza-se ao redor da uretra proximal até os ductos ejaculatórios, a zona central inicia-se nos ductos ejaculatórios e projeta-se para a base da bexiga, e a zona periférica constitui a parte apical, posterior e lateral da próstata.

A maioria dos cânceres de próstata originam-se na zona periférica, seguida da zona de transição, as quais correspondem respectivamente a 70% e 5-10% do tecido do órgão (ITTMANN, 2018; VERZE ET.AL, 2016). O tecido epitelial da próstata é composto de ácinos e ductos, formados por células basais, luminais e

neuroendócrinas. As células luminais são responsáveis pela secreção de substâncias que compõem o líquido seminal no lúmen da célula, entre estas o antígeno prostático específico, PSA (ITTMANN ET.AL., 2018).

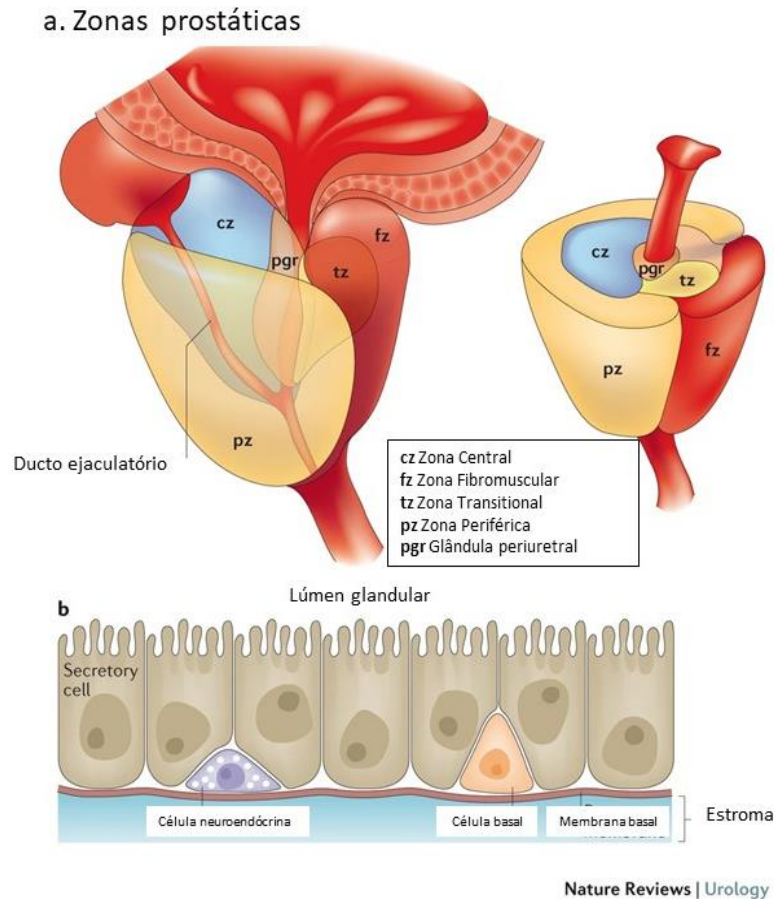


Figura 1. Estrutura anatômica da próstata. B Estrutura microscópica da próstata. Traduzido de Nature Reviews Urology (*Nat Rev Urol*) ISSN 1759-4820 (online).

O crescimento e desenvolvimento normais da próstata são mediados por hormônios androgênicos, sendo o principal deles, a testosterona. A testosterona, produzida pelas células de Leydig a partir do estímulo hormonal luteinizante, é convertida pela enzima 5 alpha-redutase em 5 alpha-dihidrotestosterona (DHT), que se liga aos receptores androgênicos, promovendo sua dimerização e transporte para o núcleo, onde ocorrerá a transcrição de genes-alvo específicos através da interação com os elementos de reconhecimento androgênico (JOHN ET AL., 2019; REBELLO ET AL., 2021) (Figura 2).

Na célula cancerosa da próstata, a ativação dos receptores de andrógenos torna-se aberrante por diferentes mecanismos como amplificação gênica, presença

de variantes patogênicas que conferem ativação constitutiva do receptor, mesmo na ausência do ligante, aumento da expressão, ou sinalização sustentada por atividade promíscua do receptor. Outra via de ativação do receptor de andrógenos pelas células do câncer de próstata ocorre através da síntese de andrógenos a partir de precursores esteróides no interior da célula (Figura 2) (JOHN ET AL., 2019; REBELLO ET AL., 2021).

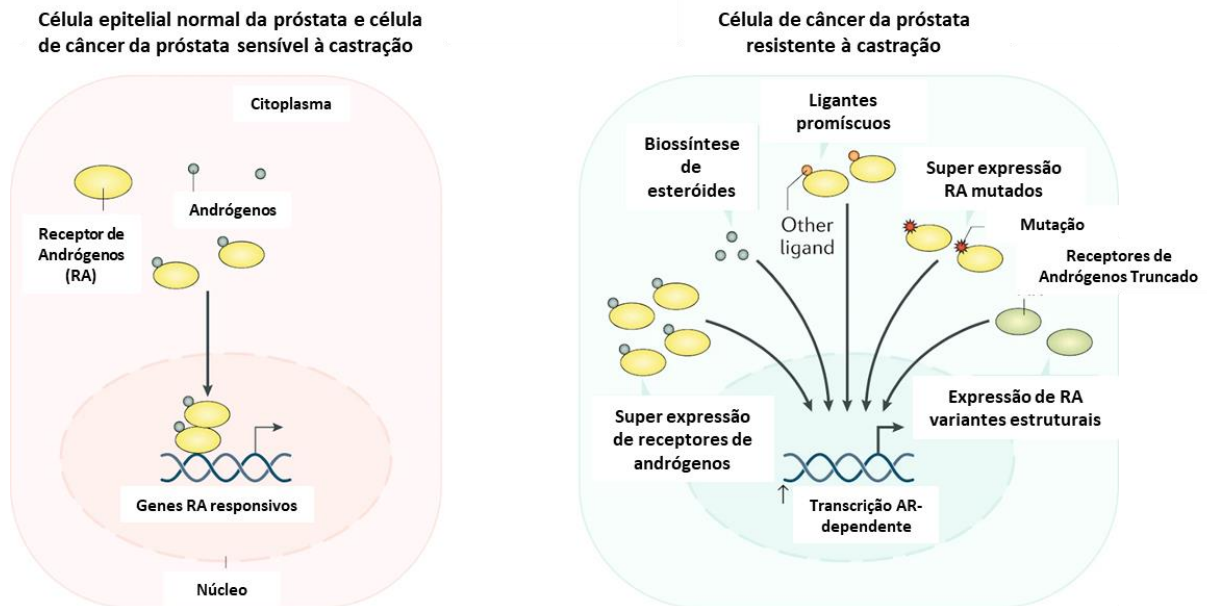


Figura 2. Crescimento e desenvolvimento tumoral da próstata. Esquerda: célula normal da próstata e célula tumoral da próstata sensível à castração. Direita: célula tumoral da próstata resistente à castração

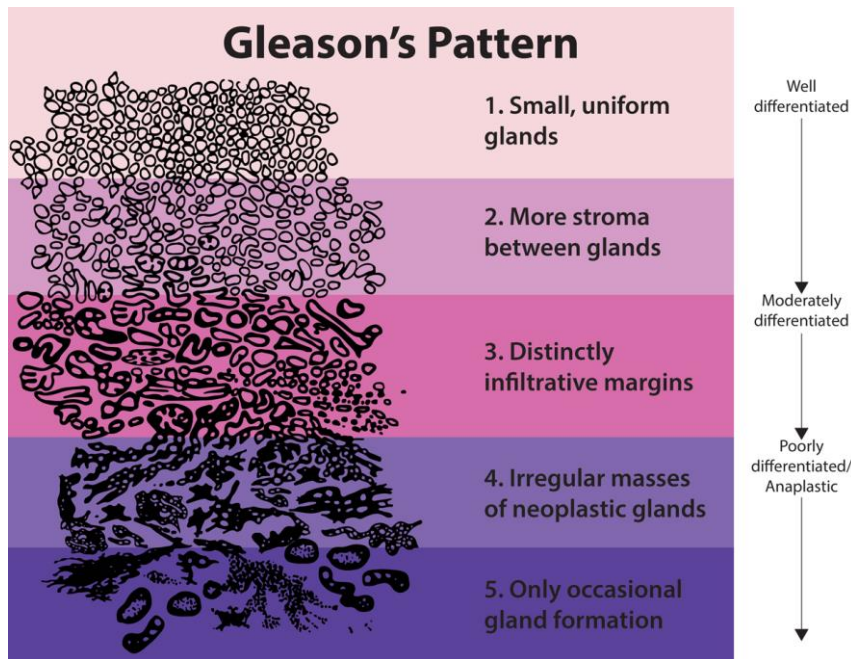
1.3 Classificação histológica

A Organização Mundial de Saúde classifica os tumores da próstata pela diretriz de 2016 para tumores do sistema urinário e órgãos sexuais masculinos em: tumores epiteliais, neuroendócrinos, mesenquimais, hemato-linfóides e miscelâneos. Os tumores epiteliais, principalmente os adenocarcinomas acinares, representam 95% de todos os tumores diagnosticados na próstata (HUMPHREY ET AL., 2016).

1.4 Grau de diferenciação celular- Escore de Gleason

O Escore de Gleason, ou Gleason Score, foi definido pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (International Society of Urological Pathology- ISUP) a fim de classificar o grau de diferenciação das células do câncer de próstata (Figura 3) durante a avaliação histopatológica do tumor. O escore é composto pela somatória dos dois grupos de diferenciação celular predominantes. Os graus definidos

pelos escores contribuem para o estadiamento da doença e alocação dos pacientes em diferentes grupos de risco prognóstico (Tabela 1).



Obtido de <https://training.seer.cancer.gov/prostate/abstract-code-stage/morphology.html>

Figura 3. Padrão de Gleason escore: Grau 1 (G1) bem diferenciado, leve anaplasia. Grau 2 (G2) moderadamente diferenciado, anaplasia moderada. Graus 3-4 (G3-4) Pouco diferenciado ou indiferenciado, anaplásico. Grau 5 (G5) Anaplasia com formação glandular ocasional.

Quadro 1. Escore de Gleason e Grau de Gleason (ISUP)

Gleason score	Grade Group	What it means
Gleason score 6 (or 3 + 3 = 6)	Grade Group 1	The cells look similar to normal prostate cells. The cancer is likely to grow very slowly, if at all
Gleason score 7 (or 3 + 4 = 7)	Grade Group 2	Most cells still look similar to normal prostate cells. The cancer is likely to grow slowly
Gleason score 7 (or 4 + 3 = 7)	Grade Group 3	The cells look less like normal prostate cells. The cancer is likely to grow at a moderate rate
Gleason score 8 (or 4 + 4 = 8)	Grade Group 4	Some cells look abnormal. The cancer might grow quickly or at a moderate rate
Gleason score 9 or 10 (or 4 + 5 = 9, 5 + 4 = 9 or 5 + 5 = 10)	Grade Group 5	The cells look very abnormal. The cancer is likely to grow quickly

1.5 Estadiamento

O estadiamento do câncer de próstata segue as diretrizes da 8ª edição do *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* de 2017.

Quadro 1. Escore de Gleason e Grau de Gleason (ISUP)

Estádio AJCC (8a edição, 2017)	Grupo	Descrição do estágio
I	cT1, N0, M0 Grau 1 (Gleason score <= 6) PSA <10	Tumor indetectável ao toque ou por exames de imagem. Diagnóstico por ressecção transuretral da próstata ou por biópsia com agulha realizada para investigação de PSA elevado [cT1]. Ausência de envolvimento linfonodal [N0] ou de metástases à distância [M0]. Grau 1, e PSA<10.
	ou	
	cT2a, N0, M0 Grupo 1 (Gleason score 6) PSA < 10	O tumor detectável ao exame de toque retal ou por exames de imagem, como ultrassom transretal. Tumor confinado a um lado da próstata [cT2a]. Ausência de comprometimento linfonodal [N0] ou metástases à distância [M0]. Grau histológico 1 e PSA <10.
	ou	
IIA	cT1, N0, M0 Grupo 1 (Gleason score 6) PSA >= 10< 20.	Tumor indetectável ao toque ou por exames de imagem. Diagnóstico por ressecção transuretral da próstata ou por biópsia com agulha realizada para investigação de PSA elevado [cT1]. Ausência de envolvimento linfonodal [N0] ou de metástases à distância [M0]. Grupo histológico 1. PSA >= 10< 20.
	ou	
	cT2a or pT2, N0, M0 Grupo 1 (Gleason score <= 6) PSA >= 10< 20.	Tumor detectado ao exame de toque retal ou por exames de imagem, como ultrassom transretal, confinado a um lado da próstata [cT2a]; ou próstata removida cirurgicamente com tumor confinado à próstata [pT2]. Ausência de envolvimento linfonodal [N0] ou de metástases à distância [M0]. Grupo histológico 1. The PSA >= 10< 20.
	ou	
	cT2b ou cT2c, N0, M0 Grau 1 (Gleason score <=6) PSA <20.	Tumor detectado ao exame de toque retal ou por exames de imagem, como ultrassom transretal, e presente em mais da metade de um dos lados da próstata [cT2b] ou em ambos os lados da próstata [cT2c]. Ausência de envolvimento linfonodal [N0] ou de metástases à distância [M0]. Grupo histológico de grau 1. PSA <20.

IIB	T1 ou T2, N0, M0 Grau 2 (Gleason escore 3+4=7) PSA<20.	Tumor confinado à próstata. Pode, ou não ser detectado ao exame de toque retal, ou por exames de imagem como ultrassom transretal [T1 or T2]. Ausência de envolvimento linfonodal [N0] ou de metástases à distância [M0]. Grupo histológico de grau 2. PSA <20.
IIC	T1 ou T2, N0, M0 Graus 3 ou 4 (Gleason escore 4+3=7 ou 8) PSA< 20.	Tumor confinado à próstata. Pode, ou não ser detectado ao exame de toque retal, ou por exames de imagem como ultrassom transretal [T1 or T2]. Ausência de envolvimento linfonodal [N0] ou de metástases à distância [M0]. Grau histológico 3 ou 4. PSA < 20.
IIIA	T1 ou T2, N0, M0 Grau histológico de 1 a 4 (Gleason Escore 8 ou menor) PSA >=20	Tumor confinado à próstata. Pode, ou não ser detectado ao exame de toque retal, ou por exames de imagem como ultrassom transretal [T1 or T2]. Ausência de envolvimento linfonodal [N0] ou de metástases à distância [M0]. Grau histológico de 1 a 4. PSA >=20.
IIIB	T3 ou T4, N0, M0 Graus de 1 a 4 (Gleason escore 8 ou menor) Qualquer PSA	O câncer tumoral é extra-prostático, e pode atingir as vesículas seminais [T3], ou à tecidos adjacentes, como esfíncter uretral, reto, bexiga e/ou parede pélvica [T4]. Ausência de envolvimento linfonodal [N0] ou metástases à distância [M0]. Graus histológicos de 1 a 4, e qualquer valor de PSA.
IIIC	Qualquer T, N0, M0 Grau 5 (Gleason escore 9 ou 10) Qualquer PSA	O tumor pode, ou não, apresentar crescimento extra-prostático para tecidos adjacentes [qualquer T]. Ausência de envolvimento linfonodal [N0] ou metástases à distância [M0]. Grau histológico 5 e qualquer valor de PSA.
IVA	Qualquer T, N1, M0 Qualquer Grupo histológico Qualquer PSA	O tumor pode invadir tecidos adjacentes à próstata [qualquer T]. Há envolvimento linfonodal adjacente [N1] e ausência de metástases à distância [M0]. Qualquer grau histológico, e qualquer valor de PSA .
IVB	Qualquer T, Qualquer N, M1, Grupo histológico Qualquer PSA	O câncer atinge outras partes do corpo, com envolvimento linfonodal e metástases à distância [M1]. Qualquer grau histológico e qualquer PSA.

Traduzido de American Cancer Society.

1.6 Estratificação de Risco

A estratificação de risco tem o intuito de auxiliar na avaliação do prognóstico, acompanhamento dos pacientes e na escolha das opções terapêuticas. Os tumores da próstata são divididos de acordo com seu tamanho, comportamento quanto ao crescimento, invasão de sítios e linfonodos adjacentes, ou distantes, diferenciação

histológica do tumor e nível de PSA em 5 grupos de risco muito baixo a altíssimo risco, de acordo com KLEIN (2021).

1.6.1 Risco muito baixo

Tumores pequenos não sentidos no exame de toque, encontrados em uma pequena área da próstata. Apresentam grau histológico 1 e PSA menor que 10. Tratam-se de tumores de crescimento lento e raramente sintomáticos.

1.6.2 Baixo Risco

Tumores confinados à próstata de grau histológico 1 e PSA menor que 10, mas de maior tamanho (cT1 to cT2a).

1.6.3 Risco intermediário

Tumores que podem ser sentidos ao toque, ou vistos por exame de imagem, encontrados em mais da metade de um dos lados da próstata (cT2b) ou em ambos os lados [cT2c], graus histológicos podem ser 2 ou 3 (Gleason score 7) e/ou PSA $\geq 10 < 20$ ng/ml. Os tumores deste grupo podem ainda ser subdivididos em prognóstico favorável e desfavorável a partir da presença de determinadas características:

1.6.3.1 Intermediário favorável - apresenta uma das características de tumores de risco intermediário, grau histológico dos grupos 1 ou 2, e menos de 50% de biópsia core são positivos.

1.6.3.2 Intermediário desfavorável - apresenta 2 ou 3 características de tumores de risco intermediário, e/ou grau histológico do grupo 3 e/ou 50% ou mais de biópsia core são positivos.

1.6.4 Alto risco

Tumores com crescimento extra-prostático (cT3a) ou grau histológico 4 ou 5 (Gleason score 8 a 10) ou PSA maior que 20.

1.6.5 Altíssimo risco

Tumores da próstata com elevado crescimento tumoral, maiores chances de recidiva e de envolvimento linfonodal adjacente. Invadem as vesículas seminais (cT3b) ou tecidos adjacentes à próstata (cT4); apresentam grau histológico de grupo 5 (Gleason score 9 ou 10); duas ou três características de grupos de alto risco, ou mais de 4 biópsias core cujos graus histológicos sejam 4 ou 5 (Gleason score 8 a 10).

1.7 Fatores de risco

Os fatores de risco para desenvolvimento de câncer de próstata são: idade avançada, descendência africana e história familiar de câncer.

A incidência de câncer de próstata tende a aumentar a partir dos 45 anos de idade, tendo seu pico entre 65 e 74 anos e mediana de idade ao diagnóstico de 66 anos. O maior percentual de mortalidade compreende homens a partir dos 75 anos de idade (67% dos casos) (HOWLADER ET. AL., 2019). Trata-se de um câncer de 3a idade, visto que 75% dos casos acometem homens a partir dos 65 anos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2023). Indivíduos de descendência africana parecem ter acometimento mais precoce e, ambas as taxas de incidência e mortalidade do grupo de afro-americanos são superiores às taxas gerais de câncer de próstata (HOWLADER ET. AL., 2019).

O fator hereditário é bastante significativo no desenvolvimento da doença. A predisposição genética para desenvolvimento de câncer de próstata foi estimada em 42%-58% por meio de análises em gêmeos monozigóticos e dizigóticos (LICHTENSTEIN ET. AL., 2000; HJELMBORG ET. AL., 2014; MUCCI ET. AL., 2016). Parentes de primeiro grau de pacientes com câncer de próstata possuem 2 a 4 vezes mais risco de desenvolver a doença em relação à população geral, sendo o risco mais elevado, para pacientes diagnosticados em idade precoce (revisado por EELES ET. AL., 2014).

1.7.1 Predisposição Genética

A predisposição genética pode ser atribuída a variantes patogênicas de baixa frequência em genes de moderada à alta penetrância, como *BRCA2*, *BRCA1* e *HOXB13*, ou a polimorfismos em *loci* específicos, os quais ocorrem em maior frequência e apresentam baixa penetrância. As alterações germinativas que conferem maior risco de desenvolvimento para o câncer de próstata ocorrem nos genes *BRCA2* e *HOXB13*.

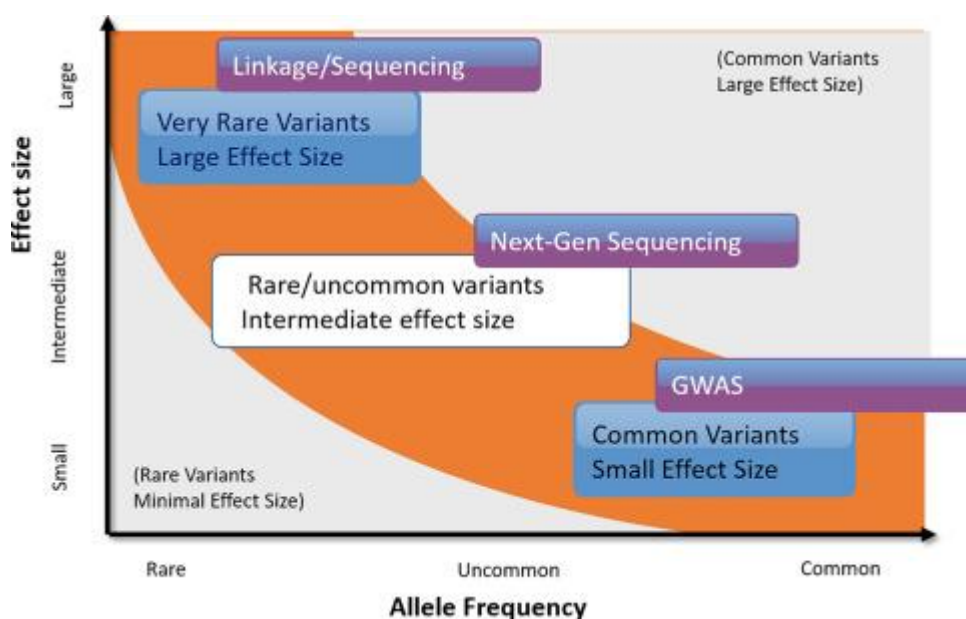


Figura 4. Predisposição Genética (Fonte: Benafif et. al., 2021)

A prevalência de variantes patogênicas somáticas e/ou germinativas em genes de reparo do DNA é de 27% no câncer de próstata, sendo quase $\frac{2}{3}$ devidos a variantes germinativas (LANG ET AL., 2019). Homens com câncer de próstata metastático ao diagnóstico apresentam maior frequência (11,8%) em relação a indivíduos com doença localizada (4,6%) e pessoas sem diagnóstico conhecido de câncer (Exome Aggregation Consortium: 2,7%) (PRITCHARD ET.AL., 2016).

A frequência de variantes patogênicas em genes de reparo homólogo em pacientes com câncer de próstata metastático é de 5,3% para *BRCA2*, 1,6% para *ATM*, 1,9% para *CHEK2*, 0,9% para *BRCA1* e 0,4% para *RAD51D* e *PALB2* (PRITCHARD ET. AL., 2016).

Genes de reparo de mau pareamento, ou mismatch repair (*MSH2*, *MSH6* e *PMS2*), *HOXB13* (CHENG ET. AL., 2019) e, mais recentemente, *TP53* (MAXWELL ET. AL., 2022) também estão associados ao risco elevado para câncer de próstata.

1.7.1.1 BRCA1 e BRCA2 - Breast cancer susceptibility genes

Variante patogênicas germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* podem ser detectadas em 0,44% e 1,2% dos pacientes com câncer de próstata, respectivamente. Tais pacientes apresentam doença mais agressiva caracterizada por elevada probabilidade de comprometimento linfonodal e metástases à distância (KOTE-JARAI ET. AL., 2011; LEONGAMORNLEERT ET. AL., 2012; CASTRO ET. AL., 2012).

A identificação dos genes *BRCA1* e *BRCA2* como genes de susceptibilidade ao câncer, a priori câncer de mama e ovário, ocorreu por meio de análises de ligação entre regiões gênicas e características compartilhadas pelos portadores. O excesso de agregação familiar de câncer de próstata em famílias portadoras de alterações em *BRCA2*, ou em familiares de mulheres com câncer de mama deu subsídio à hipótese de que estas alterações pudessem também estar associadas ao risco aumentado de outros tumores, além de mama e ovário. Estudos contemporâneos à época, demonstraram um risco relativo de 2.69 vezes e risco cumulativo de 16% até os 70 anos para desenvolvimento de câncer de próstata nestas famílias (TULINIUS ET.AL., 1992; STREWING ET AL.1995; EASTON ET. AL.1997).

Posteriormente, a análise de 173 famílias compostas de 3 a 255 indivíduos com história familiar de câncer, realizada pelo The Breast Cancer Linkage Consortium (1999), confirmou a susceptibilidade de câncer de próstata em carreadores de variantes patogênicas em *BRCA2*. O número esperado de portadores que desenvolveriam câncer de próstata estava estimado em 6, entretanto, foram observados 29 carreadores diagnosticados com câncer de próstata, perfazendo um risco relativo de 4,65 (RR 4.65; 95% CI 4 3.48– 6.22; $P < .0001$), que por sua vez, demonstrou-se significativamente mais acentuado em indivíduos até 65 anos versus indivíduos de todas as idades (RR 7.33 [95% CI 4 4.66–11.52] versus RR 3.39 [95% CI 42.34-4.92]; $P < 0.01$). Em concordância, KOTE-JARAI ET. AL 2011, observaram que risco de desenvolvimento de câncer de próstata em portadores de variantes patogênicas em *BRCA2* é de 8,6 vezes aos 65 anos de idade.

A análise prospectiva com seguimento aproximado de 5,5 anos em homens portadores de variantes germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* e não afetados por câncer de próstata, demonstrou que carreadores de variantes em *BRCA2* são mais propícios a desenvolver câncer de próstata. Nestes, foram identificados: taxa de incidência padronizada de 4,45, risco absoluto de 27% aos 70 anos, e 60% aos 85 anos; enquanto para *BRCA1*, a taxa de incidência padronizada foi de 2,35 e risco absoluto de 21% e 29%, respectivamente). Além disso, pacientes carreadores de variantes de *BRCA2* apresentavam tumores estatisticamente associados a doença clinicamente significativa à agressiva (taxa de incidência padronizada 5,07, 95% CI 3,20–8,02) e alto risco de morte pela doença (SMR 3,85, 95% CI 1,44–10.3) (NYBERG ET.AL., 2020).

1.7.1.2 BRCA-2, Breast cancer susceptibility gene 2

O gene *BRCA2*, do inglês *Breast cancer susceptibility gene 2*, localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q12-q13) foi identificado em 1995, após a análise da perda de função na região, em indivíduos com câncer de mama masculinos e femininos em famílias, cujas doenças não estavam associadas a alterações em *BRCA1* (WOOSTER ET. AL. 1995).

O gene *BRCA2* apresenta 27 éxons, que codificam uma proteína de 3418 aminoácidos. A proteína codificada apresenta domínios de interação com proteínas pertencentes a vias de reparo do DNA e um domínio de ligação ao DNA. A porção N-terminal, interage com PALB2 e a região central, composta por 8 repetições BRC, liga-se à proteína RAD51. O domínio de ligação ao DNA, se liga ao DNA de fita simples e à poly (ADP-ribose) (Figura 6).

A proteína BRCA2 promove o recrutamento de RAD51 ao local de quebra da dupla fita de DNA, intermediando sua ligação à fita simples de DNA, que atuará como molde da nova fita durante o processo de recombinação homóloga.

Análises *in-vitro* em células com deficiência do gene *BRCA2* contrapostas a diferentes inibidores da enzima Poli ADP-ribose polimerase (PARP), permitiram o desenvolvimento de inibidores de PARP1. O mecanismo de ação baseia-se na combinação da perda de função de dois ou mais genes, que culmine em morte celular, enquanto uma única alteração patogênica em qualquer um destes genes não é capaz de induzir o processo de morte sozinha. O processo é denominado letalidade sintética, pois uma das perdas de função ou inibição é induzida pela medicação (KAELIN ET.AL., 2005). Os inibidores de PARP-1, aprovados em 2020 para o tratamento de indivíduos com câncer de próstata metastático resistente à castração, mostraram-se bastante significativos para o aumento da sobrevida livre de doença e sobrevida global nos pacientes com deficiência de *BRCA1/2*.

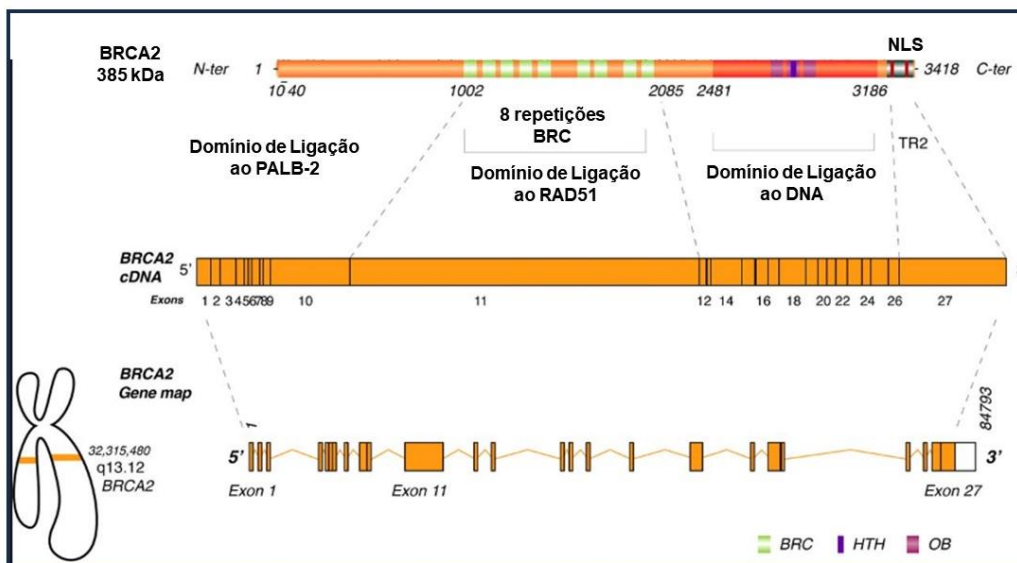


Figura 6. Estrutura e localização do gene *BRCA2*. Adaptado de LABIDI-GALY ET AL., 2018.

Além de terapias baseadas na letalidade sintética, pacientes com variantes patogênicas em genes de reparo de DNA podem beneficiar-se de terapias baseadas em platina, como cisplatina e carboplatina. Em pacientes com câncer de próstata metastático resistente à castração tratados com carboplatina, aproximadamente 75% dos portadores de mutação em *BRCA2* são responsivos à terapia, em detrimento de 17% dos não portadores de variantes patogênicas. (Pomerantz et. al., 2017; Nuhn et. al., 2019). Aproximadamente 33% dos pacientes com câncer de próstata metastático resistente à castração apresentam defeitos em genes de reparo de DNA, dentre os quais, 88% mostram-se responsivos ao inibidor de PARP Olaparib, sendo a resposta mais acentuada em pacientes portadores de variantes patogênicas, que em pacientes sem alterações (MATEO ET. AL., 2015).

1.7.1.3 Genes de Mismatch repair, ou reparo de mau pareamento

Em 2003, estudos demonstraram que pacientes com câncer de próstata portadores de variantes deletórias no gene de *mismatch repair* (MMR) *MSH2* não apresentavam o produto do gene em seus tumores, assim como é observado em tumores de câncer hereditário colorretal não poliposo, sugerindo que este câncer poderia fazer parte do espectro da síndrome de Lynch (STORMORKEN ET. AL., 2003; SORAVIA ET. AL., 2003).

A incidência de câncer de próstata foi avaliada em 106 portadores de mutações em genes MMR e, dentre os quais, 8,5% desenvolveram a doença. A chance do número esperado de câncer de próstata ocorrer ao acaso neste grupo de homens, seria de 1,52 em comparação com 9 observados (intervalo de confiança de 95%, 4.1-17.1; $p < 0,01$). O risco cumulativo de desenvolver câncer de próstata aos 60 anos foi de 9,8% e aos 70 anos foi de 29% entre os portadores de variantes em MMR, contra 8% na população norueguesa em geral. A idade média para o diagnóstico entre portadores foi de 60,4 anos em comparação com 66,6 esperados. A maioria dos pacientes portadores de mutação em MMR (8/9) apresentava tumor agressivo, Gleason > 7 , em contraste com os 17% esperados em homens diagnosticados antes dos 70 anos na população geral. Estes indivíduos também apresentam acometimento precoce (GRINDEDAL ET. AL., 2009).

Famílias com síndrome de Lynch portadoras de mutações nos genes de *mismatch repair* *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* podem apresentar 30% de risco cumulativo de desenvolverem câncer de próstata ao longo da vida, contra 17,8% de risco da população geral, sendo este risco maior em indivíduos com menos de 60 anos (RAYMOND, 2013). Em estudo realizado no Brasil, o câncer de próstata foi o câncer extra-colônico mais frequente entre homens de famílias com síndrome de Lynch (SILVA ET. AL., 2010).

A observação da ausência de proteínas de reparo em tumores da próstata de portadores de variantes germinativas em genes de mismatch repair, deu subsídio à hipótese de que tais alterações estariam associadas à predisposição de risco ao câncer de próstata, e que este pudesse fazer parte do espectro da síndrome de Lynch (STORMORKEN ET AL., 2003; SORAVIA ET.AL, 2003). A primeira análise em um grande registro de famílias com síndrome de Lynch, mostrou frequência de 8,5% de câncer de próstata entre os portadores de variantes em genes de MMR, e risco cumulativo de 9,8% até os 60 anos de idade, associando pela primeira vez, genes de MMR com a predisposição aumentada para câncer de próstata (GRINDEDAL ET. AL., 2009). Um estudo dinamarquês, também avaliando grandes registros familiares de síndrome de Lynch, identificou que 2,22% dos portadores de variantes em genes de MMR e 1,39% de seus familiares de 1º grau desenvolveram câncer de próstata. Seis destas alterações ocorreram em *MSH6* em 3/16 probandos e 3/12 dos familiares de 1º grau (RAYMOND ET.AL., 2013; DOMINGUEZ-VALENTIN ET. AL., 2016).

PRITCHARD ET. AL., 2014 identificaram que alterações com perda de função do complexo de MSH2-MSH6, como principal fator relacionado a tumores de próstata hipermutados.

1.7.1.4 *HOXB13*, *Home-box 17*

O gene *HOXB13* é um fator de transcrição, localizado no braço longo do cromossomo 17, que regula a expressão de andrógenos. O gene foi identificado através de estudos de ligação gênica, que mostraram a presença de uma região próxima ao gene *BRCA1* (também localizado no 17q), associada ao risco aumentado para câncer de próstata (PILIE; GIRI; COONEY, 2016).

A análise da região cromossômica 17q21-22, previamente relatada como de susceptibilidade para desenvolvimento de câncer de próstata, identificou a presença da variante *nonsense* G84E no gene *HOXB13* em 1,4% dos indivíduos de famílias de ascendência europeia com agregação familiar de câncer de próstata, sendo mais prevalente em homens com acometimento precoce (3,6%) (EWING ET. AL., 2012).

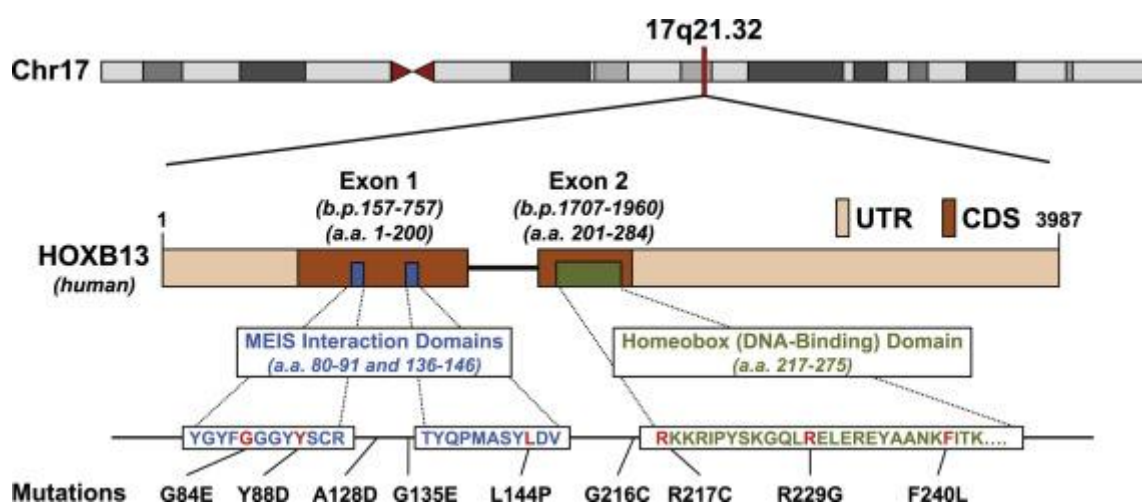


Figura 7. Estrutura do gene *HOXB13* e as principais variantes descritas e sua localização no gene.

Indivíduos com três ou mais membros da família afetados pelo câncer de próstata apresentam cerca de 2,7% de chance de serem portadores da variante patogênica (BREYER ET. AL. 2012). Embora a variante *nonsense* G84E não seja acionável em termos terapêuticos, sua identificação é importante para aconselhamento genético familiar (MOHLER ET.AL., 2019).

Outras variantes ancestralidade-específica em *HOXB13* relacionadas à predisposição aumentada ao câncer de próstata foram descritas em populações

específicas de indivíduos não-caucasianos (LIN ET.AL., 2013; MOMOZAWA ET.AL., 2020; MARLIN ET. AL., 2020; KURIHARA ET. AL., 2022; NA ET. AL., 2022, DARST ET AL., 2022).

A variante G135E foi identificada em indivíduos chineses, após sequenciamento do gene HOXB13 em uma coorte de indivíduos caso-controle do Consórcio Chinês para genética do câncer de próstata (Chinese Consortium for Prostate Cancer Genetics) (LIN ET.AL., 2013).

Na população japonesa, identificou-se a variante G132E (OR: 6,08; 95% CI = 3,39 a 11,59) (MOMOZAWA ET.AL., 2020), posteriormente descrita também na população coreana com câncer de próstata (SONG ET.AL., 2023).

Por sua vez, a variante X285K foi descrita em homens da Ilha de Martinica, no caribe, e em pacientes com câncer de próstata de oeste-africana (LIN ET.AL., 2013; MARLIN ET. AL., 2020, NA ET. AL., 2022, DARST ET AL., 2022).

Assim como G84E, as demais variantes ancestralidade-específicas de HOXB13 são raras e não acionáveis. Entretanto, o manejo de risco em portadores e familiares é de suma importância. A variante deletéria X285K, em especial, confere um risco aumentado para tumores mais agressivos.

1.7.1.5 *TP53-Tumor Protein P53*

O gene *TP53* foi recentemente associado ao risco aumentado para o câncer de próstata após a análise de 132 famílias com síndrome de Li-fraumeni, nas quais foram identificados 19% de casos de câncer de próstata entre os homens carreadores de variantes germinativas em *TP53* (31 de 163). Observou-se também que a presença de g*TP53* aumentava em 9 vezes o risco de câncer de próstata, e que a incidência da doença era 25 vezes maior em carreadores que na população geral (MAXWELL ET AL, 2022).

1.8 BRASIL

No Brasil, não existem análises específicas sobre a herdabilidade do câncer de próstata utilizando painéis genéticos extensos, apenas estudos focados sobre síndromes hereditárias de predisposição ao câncer, ou focados na influência de grupos de polimorfismos na susceptibilidade ao câncer de próstata (FERNANDES ET. AL, 2016; OLIVEIRA ET. AL., 2022).

Em sua maioria, o perfil das alterações germinativas associadas à predisposição ao câncer na população brasileira é interrogado em estudos que avaliam sua prevalência no câncer de mama, sobretudo em pacientes do sexo feminino; em indivíduos com suspeita para síndromes de câncer de mama e ovário hereditários, ou em avaliações da contribuição de variantes no genes *BRCA1* e *BRCA2*. Mesmo em estudos onde indivíduos diagnosticados com câncer de próstata foram incluídos nas análises, o número foi pouco expressivo (FERNANDES ET AL., 2016; OLIVEIRA ET.AL 2022). No maior estudo para a avaliação das alterações germinativas associadas a síndromes hereditárias de câncer conduzido no Brasil, que avaliou 1682 pacientes previamente submetidos a testes genéticos, menos de 1% (15/1682) dos indivíduos analisados apresentavam história pessoal de câncer de próstata (OLIVEIRA ET AL., 2022).

Avaliar características genéticas à luz das diferenças geográficas e ancestrais é crucial para entender a carcinogênese e susceptibilidade ao câncer em populações miscigenadas, como a brasileira, cuja ancestralidade genética mediana é composta predominantemente por alelos provenientes de três populações parentais: europeia (68,1%), africana (19,6%) e ameríndia (11,6%), o que reflete em particularidades não observadas em outras populações (SOUZA ET AL. 2019; PENA ET. AL., 2011).

As diretrizes de práticas clínicas em câncer de próstata da versão 4.2023 do National Comprehensive Cancer Network (NCCN) preconizam a avaliação genética para o risco de câncer de próstata, no entanto, testes genéticos para avaliar a predisposição genética ao câncer não são disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde Brasileiro.

2. JUSTIFICATIVA

O estudo de variantes germinativas presentes na população brasileira com câncer de próstata é fundamental para conhecer o perfil e a contribuição do câncer de próstata hereditário no Brasil, compreender aspectos da doença em nossa população, bem como identificar e caracterizar novos biomarcadores no futuro.

Visto que, no Brasil, testes genéticos para avaliar a predisposição ao câncer não são disponibilizados no âmbito do Sistema Único de Saúde, uma abordagem genética para pacientes com câncer de próstata pode estar associada a: identificação de pacientes candidatos ao uso terapia com inibidores de PARP e imunoterapia; rastreamento de outros tumores secundários, relacionados à síndrome implicada pela presença da variante detectada no paciente. Além disso, a identificação de pacientes portadores de variantes germinativas, pode orientar a investigação em familiares saudáveis, que podem se beneficiar da detecção precoce e medidas de prevenção de cânceres como câncer de mama, ovário, pancreático, colorretal e melanoma, além do próprio câncer de próstata em indivíduos do sexo masculino.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o espectro e frequência de mutações germinativas em painel de genes de predisposição ao câncer em coorte brasileira de pacientes com câncer de próstata.

Objetivos Específicos

- 1) Avaliar histórico familiar de câncer;
- 2) Avaliar hábitos e características clínicas dos pacientes;
- 3) Avaliar o nível de PSA ao diagnóstico, Gleason Score, estadiamento T, frequência de envolvimento de linfonodos e metástases à distância.

4. MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Este é um estudo transversal para avaliar a predisposição genética em uma coorte brasileira de homens com diagnóstico de câncer de próstata, tratados no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brasil.

O Conselho de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil aprovou o estudo (CAAE: 25046719.8.0000.0065). Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética, e as amostras foram utilizadas nos termos dos acordos de transferência de materiais.

4.2 Estratégia de inclusão

Homens maiores de 18 anos diagnosticados com carcinoma da próstata, preferencialmente com doença agressiva, e independente da fase de tratamento, atendidos no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo foram pré-selecionados a partir do CID da doença (CID 61- Câncer de Próstata), de acordo com a agenda de consultas dos serviços de Urologia e Oncologia Clínica, seguida da análise de dados clínicos presentes no prontuário eletrônico para comprovação do diagnóstico de câncer (exame histopatológico, laudo de exames de imagem comprovando acometimento secundário). Os pacientes incluídos foram submetidos à coleta de 15 mL de sangue periférico por venopunção em tubos contendo ácido acético tetra-etilenoadimina (EDTA) e responderam questionários sobre etnia, histórico pessoal e familiar de câncer, comorbidades e hábitos comportamentais, incluindo consumo de álcool, tabagismo, prática de exercícios físicos e foi elaborado o heredograma. Os prontuários médicos institucionais foram acessados para recuperação de dados clínicos.

Devido à pandemia da Covid-19 e interrupção temporária do recrutamento de pacientes, uma parte foi incluída de maneira retrospectiva (n=29). Estes pacientes previamente assinaram o TCLE do Biobanco do ICESP para pesquisas e alguns destes foram contatados posteriormente, e responderam ao questionário de antecedentes pessoais e hábitos de vida e tiveram seu heredograma construído.

4.3 Critérios de inclusão - Sequenciamento Painel Hereditary TruSight Cancer

Foram incluídos 55 pacientes para sequenciamento com painel de genes de predisposição ao câncer com pelo menos um dos critérios abaixo:

- Metástase à distância ao diagnóstico
- Tumores localmente avançados (comprometimento linfonodal e/tumor extra-prostático)
- História familiar positiva de câncer
- Idade precoce ao diagnóstico <65 anos

4.4 Critérios de inclusão - Sequenciamento de Exoma Twist Bioscience

Foram incluídos 14 pacientes para sequenciamento do exoma, de acordo com os critérios a seguir:

- Pacientes autodeclarados pardos, pretos e/ou indígenas
- Doença clinicamente significativa ao diagnóstico (Gleason a partir de 7)

4.5 Critérios de exclusão - Sequenciamento de Exoma Twist Bioscience

- Pacientes com metástase ao diagnóstico

4.6 Extração, qualidade e quantificação do DNA

As amostras dos pacientes foram processadas de acordo com protocolo Biobanco para separação de plasma e buffy-coat com armazenamento em freezer a -80°C. O DNA germinativo foi extraído dos leucócitos utilizando o kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Cat no./ID 51104). Resumidamente, para cada microtubo de 1,5 ml contendo o buffy-coat foram adicionados tampão de digestão contendo proteínase K seguido de incubação a 56°C por 1 hora. Após adição do *Buffer AL* e incubação a 70 °C por 10 minutos, foi adicionado etanol (96-100%), a mistura foi transferida para as colunas, as quais foram centrifugadas. Após lavagem com *Buffer AW1* e *Buffer AW2*, as colunas foram transferidas para microtubos de 2 ml, centrifugadas e a seguir transferidas para microtubos de 1,5 ml, onde as amostras foram eluídas com 50 µl de água ultrapura. Após incubação por 4 minutos e centrifugação a 6.000 g por 1 minuto, as colunas foram removidas e as amostras armazenadas a -20 °C. A concentração e pureza do DNA foram determinadas pelo espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). A concentração das amostras de DNA analisadas por sequenciamento de nova geração, foram avaliadas

por Qubit® dsDNA BR Assay kit em fluorômetro Qubit® 3.0 (Thermo Fischer Scientific, Cat no./ID Q32853).

4.7 Preparo de Bibliotecas protocolo Twist Bioscience

As bibliotecas foram preparadas com a metodologia *Enzymatic Fragmentation and Twist Universal Adapter System* (Twist Bioscience)

A quantidade correta do input de DNA é crítica para preparo de bibliotecas e fragmentação ótimas. A concentração do DNA deve ser definida por quantificação com *Qubit dsDNA Broad Range Quantification Assay*. Iniciamos o protocolo com o *input* de 80ng de DNA purificado e eluído em Água Ultrapura. O uso de mais de 50 ng de DNA de input aumenta a diversidade da biblioteca e reduz a taxa de duplicação, mas para uma *performance* ótima, algumas otimizações foram realizadas durante o preparo de bibliotecas.

Adicionou-se ao *input* de amostra inicial de 80 ng, volume suficiente de água ultrapura para alcançar volume final de 10 µl de amostra diluída de DNA, que foi transferido para poços da placa de PCR e colocados em gelo.

Em seguida, preparou-se o master mix de fragmentação enzimática composto de 25µl de Água, 5µl 10x *Fragmentation Buffer* e 10 µl 5x *Fragmentation Enzyme*, alcançando volume total 40 µl por reação. Os 40 µl do Master Mix de Fragmentação Enzimática foram adicionados no poço/tubo de cada uma das amostras de gDNA, homogenizados por pipetagem e a reação foi mantida em gelo. A placa foi para o termociclador pré-resfriado previamente (4°C- Hold na programação) e em seguida submetida a programação de 32°C por 16 minutos (otimização recomendada pela assessora técnica Twist), 65°C por 30 minutos e 4°C infinito. Temperatura da tampa 70°C. A placa com as amostras foi retirada do termociclador e mantida em gelo.

Adicionaram-se 5µl de *Twist Universal Adapters* ao poço de cada amostra contendo o DNA fragmentado e com cauda-dA, seguido de homogeneização por pipetagem.

Em seguida, preparou-se Master Mix de Ligação (tubo de 1,5 ml) pela adição de 15 µl de água ultrapura, 20µl de *DNA Ligation Mix* e 10 µl de *DNA Ligation Buffer* por amostra. O master mix foi mantido em gelo, e ao final, 45 µl do mix de ligação foi adicionado a cada amostra. A placa foi selada, agitada e incubada a 20°C por 15 minutos em termociclador.

Antes de iniciar a purificação faz-se necessário, retirar as *DNA Purification Beads* da geladeira pelo menos 30 minutos antes de sua utilização para que estas alcancem a temperatura ambiente e homogeneizá-las por vórtex. Separamos uma alíquota em tubo 2 mL para facilitar a manipulação das *beads* durante o experimento. Adicionaram-se 80 µl das *DNA purification beads* a cada amostra e para homogeneizar, pipetou-se a solução por aproximadamente 20x. Após a adição de *beads* a cada grupo de quatro amostras, a alíquota de *beads* foi homogeneizada por vórtex.

A solução das amostras e *beads* foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi colocada em estante magnética por 1 minuto. Uma vez alocadas na placa as *beads* magnéticas foram atraídas, formando um *pellet* de *beads* e um sobrenadante líquido. Passado o minuto de incubação, houve a retirada e descarte do sobrenadante sem perturbar o *pellet*.

Mantendo as amostras na estante magnética, adicionaram-se, gentilmente, 200 µl de Etanol 80% para lavagem do *pellet* de *beads* (etanol foi dispensado na parede oposta ao *pellet* a fim de não o perturbar). Após 1 minuto de incubação, o sobrenadante foi removido e descartado. A lavagem foi repetida (totalizando duas lavagens). A seguir, o etanol remanescente foi, cuidadosamente, removido com uma pipeta de 10µL, sem perturbar o *pellet*. O *pellet* secou ao ar, ainda na estante magnética de 5 a 10 minutos.

A placa com as amostras foi retirada da estante magnética e 17 µl de água ultrapura foram adicionados ao *pellet* de cada amostra. As amostras foram homogeneizadas por pipetagem e incubadas por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram colocadas novamente na estante magnética e incubadas por 3 minutos, ou até o sobrenadante ficar claro. Em seguida, 15µl do sobrenadante límpido contendo as bibliotecas indexadas e ligadas foram transferidos para uma nova placa 96-well, sem perturbar o *pellet*.

Este passo tem por intuito amplificar as bibliotecas de gDNA contendo adaptadores com primers Twist UDI (Universal dual-index), purificá-las e realizar a análise do controle de qualidade para finalização do protocolo.

Foram adicionados 10µl de *Twist UDI primers* para cada biblioteca de gDNA e gentilmente homogenizados por pipetagem.

Adicionaram-se 25 µl do *Kapa HiFi HotStart Ready mix* a cada biblioteca de gDNA e homogeneizou-se cuidadosamente por pipetagem. Em seguida, as amostras foram imediatamente transferidas para o termociclador e submetidas: 98°C por 48 segundos; 8 ciclos com variação de temperatura: 98°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; Extensão final: 72°C, 1 minuto, 1 ciclo e Hold final: 4°C, infinito; temperatura da tampa 105°C). Após término da programação, as amostras foram retiradas do termociclador e purificadas.

As *beads* de purificação de DNA foram novamente homogeneizadas por vórtex.

Foram adicionados 50 µl de *DNA purification beads* homogeneizadas em cada amostra (preconizamos homogeneizá-las por vortex a cada quatro aplicações). Em seguida, as amostras foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, e logo posicionadas na estante magnética por 1 minuto.

Após formação de pellet e sobrenadante límpido, o sobrenadante foi removido e descartado sem perturbar o pellet (sem retirar as amostras da estante magnética). O processo de lavagem foi feito pela adição de 200 µl de Etanol 80% para lavar o pellet, seguido de incubação das amostras por 1 minuto (sem retirar da estante) e remoção e descarte do etanol (sem perturbar o pellet). O processo foi repetido, totalizando duas lavagens. Ao final, o restante do Etanol foi cuidadosamente removido com pipeta de 10 µl sem perturbar o pellet.

A placa, ainda na estante magnética, permaneceu em temperatura ambiente para a secagem do pellet por 5 a 10 minutos. Finalizada a secagem, retirou-se a placa da estante magnética e 22 µl de água ultrapura foram adicionados em cada amostra e homogeneizados por pipetagem. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 2 minutos.

Após a incubação, as amostras foram colocadas novamente em estante magnética e incubadas por 3 minutos ou até a formação do pellet. Em seguida, 20µl do sobrenadante límpido contendo as bibliotecas indexadas e amplificadas foram transferidos para novos tubos strip ou placa (sem perturbar o pellet).

Concentração e tamanho de cada uma das bibliotecas indexadas e amplificadas foram avaliados com o *Qubit dsDNA Broad Range Quantification Assay* e *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (Agilent) com o *Tape Station*, respectivamente.

Por fim, as bibliotecas foram combinadas em pools para atingir a mesma equimolaridade em tampão *Low TE 1x*, e foram então sequenciadas no aparelho NextSeq (*NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5*, 150 ciclos; Illumina) do laboratório de

Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da Rede Multiusuários do Sistema FMUSP/HC, da Universidade de São Paulo (USP).-

4.8 Preparo de Biblioteca protocolo-TruSight Hereditary Cancer - Illumina

Para o sequenciamento dos 113 genes de pacientes com câncer de próstata (DNA de células mononucleares) utilizamos o protocolo *Illumina DNA Prep with Enrichment* (Illumina – 20025523/20025520/20025519). Este protocolo compreende: *Tagment Genomic DNA* (fragmentação e adição de adaptadores no DNA), *Post tagmentation Clean up*, amplificação de DNA fragmentado e etiquetado (tagmented), lavagem das bibliotecas e formação do pool de bibliotecas.

A primeira etapa desta reação consiste na fragmentação do DNA e a ligação de adaptadores nas extremidades dos fragmentos; neste processo foram utilizadas esferas ligadas a transposomes (eBLT, *bead-linked-transposomes*). Neste procedimento foram utilizados 500 ng de DNA em um volume final de 30µL. Foram adicionados 20 µl do Mix de Tagmentação (*Tagmentation Buffer 1* + eBLT) ao DNA, que foi incubada a 55°C por 5 minutos. Em seguida, realiza-se a *clean-up*, primeiramente adiciona-se 10 µl do *Stop Targment Buffer 2* e a placa foi colocada em estante magnética. Após a remoção e descarte do sobrenadante foi adicionado 100 µl do *Tagment Wash Buffer* diretamente sobre as *beads* (2 vezes).

A seguir, ao DNA etiquetado adicionou-se o Mix para PCR (*Enhanced PCR Mix* +água), o qual contém polimerase e demais reagentes para realizar a amplificação, o índice (sequências de bases conhecida e única para cada amostra), acoplado ao índice estão adaptadores p5 e p7 (que são estruturas necessárias para o acoplamento da biblioteca na flow cell e formação de clusters). A placa foi levada ao termociclador é submetida a: 72°C por 3 minutos; 98°C por 3 segundos, 9 ciclos com variação de temperatura: 98°C por 20 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos, finalizando em 72°C por 3 minutos e a 10°C por tempo indeterminado.

As bibliotecas indexadas recém-amplificadas foram purificadas por meio de *beads* Agencourt *AMPure XP Beads* em duas diferentes proporções. Na primeira etapa, 77µl de água ultrapura e 88 µl de *AMPure XP Beads* foram adicionados a reação, incubados por 5 minutos e colocados na estante magnética. O sobrenadante foi transferido para outro poço e, na segunda etapa, 20 µl de *AMPure XP Beads* foram adicionados. Após incubação por 5 minutos a placa foi colocada na estante magnética.

O sobrenadante foi removido e descartado, as *beads* lavadas duas vezes com etanol 80%. Ao final, o restante do Etanol foi cuidadosamente removido com pipeta de 10 μ L sem perturbar o pellet. A placa, ainda na estante magnética, permaneceu em temperatura ambiente para a secagem do pellet por 5 minutos, e foi adicionado 15 μ L *Resuspension Buffer*. Após incubação por 5 minutos a placa foi colocada na estante magnética. O sobrenadante foi transferido para uma placa nova.

Concentração e tamanho de cada uma das bibliotecas indexadas e amplificadas foram avaliados por *Qubit dsDNA Broad Range Quantification Assay* e *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (Agilent) com o *Tape Station*, respectivamente. Em seguida, as bibliotecas foram concentradas em pools homogêneos de até 12 amostras (500 ng de cada amostra).

O próximo passo foi a hibridização; processo no qual a biblioteca de DNA é misturada a sondas de captura das regiões de interesse. Foram formados pools com doze amostras em um volume final de 30 μ L. Foram adicionados a cada pool, 50 μ L de *Enrichment Hybridization Buffer* e 10 μ L de *Selected Oligos*. Tais sondas são os oligonucleotídeos do painel *TruSight Cancer* da Illumina, composto de 113 genes envolvidos na predisposição e desenvolvimento do câncer. A placa foi levada ao termociclador e submetida a: 95°C por 10 minutos; 18 ciclos de 1 minuto, começando a 94°C e diminuindo 2°C por ciclo; 58°C por 16 horas.

Depois da hibridização, tem se início à captura, um processo que utiliza estreptavidina para capturar as sondas hibridizadas com as regiões de interesse. Esta etapa consiste em períodos de ligação, lavagem e eluição. Na primeira ligação, 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para outra placa e adicionados a 250 μ L de *Streptavidin Magnetic Beads*, incubada a temperatura ambiente por 4 minutos, depois a 15 minutos a 62°C e colocada na estante magnética por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida a placa foi retirada da estante magnética. Na primeira lavagem foram adicionados 200 μ L de *Enrichment Wash Buffer*. Em seguida, a placa foi incubada a 62°C por 5 minutos, e imediatamente colocada na estante magnética por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa retirada da estante magnética e todo este processo foi repetido por três vezes. Na eluição foram adicionados em tubos de 1,7 mL, 28,5 μ L de *Enrichment Elution Buffer 1* e 1,5 μ L de HPE (2N NaOH), do qual foram utilizados 23 μ L para ser adicionado em cada pool. A placa foi colocada no agitador 1800 rpm por 2 minutos, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e colocada na estante magnética por 2 minutos. Foram transferidos 21 μ L do

sobrenadante para um tubo de 200 μ L, ao qual foram adicionados 4 μ L de *Elute Target Buffer*.

A seguir, ao pool de bibliotecas enriquecidas foi adicionado o Mix para PCR (*Enhanced PCR Mix* + primers), e placa foi levada ao termociclador é submetida a: 98°C por 30 segundos; 12 ciclos com variação de temperatura: 98°C por 10 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando em 72°C por 5 minutos e a 10°C por tempo indeterminado.

Novamente, o pool de bibliotecas enriquecidas e amplificadas foram purificadas com 45 μ l Agencourt *AMPure XP Beads*. Após incubação por 5 minutos a placa foi colocada na estante magnética. O sobrenadante foi removido e descartado, as *beads* lavadas duas vezes com etanol 80%. Ao final, o restante do Etanol foi cuidadosamente removido com pipeta de 10 μ l sem perturbar o pellet. A placa, ainda na estante magnética, permaneceu em temperatura ambiente para a secagem do pellet por 5 minutos, e foi adicionado 32 μ l *Resuspension Buffer*. Após incubação por 5 minutos a placa foi colocada na estante magnética. O sobrenadante foi transferido para uma placa nova.

Utilizamos o *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) para realizar a quantificação fluorométrica e o sistema *Agilent 2200 TapeStation* para avaliar o tamanho médio da biblioteca.

Por fim, as bibliotecas foram combinadas para atingir a mesma equimolaridade e foram então sequenciadas no aparelho NextSeq (*NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2.5*, 300 ciclos; Illumina) do laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da Rede Multiusuários do Sistema FMUSP/HC, da Universidade de São Paulo (USP).- Após o sequenciamento, os arquivos FASTA gerados foram depositados no *BaseSpace* (Illumina), onde foram alinhados em BWA, software que mapeia sequências de baixa frequência que divergem de um genoma de referência.

4.9 Processamento de dados, chamada de variantes e classificação

Os dados brutos foram pré-processados com Picard-2.18.7 e alinhados ao genoma de referência GRCh38/hg38 usando a ferramenta de alinhamento bwakit0.7.15. Todas as variantes foram chamadas seguindo o pipeline Genome Analysis Toolkit-GATK-4.0.9.0 (Broad Institute). A anotação dos dados e avaliação do efeito funcional das variantes foi realizada com Annovar e VEP_103. Todas as

variantes identificadas foram nomeadas de acordo com a nomenclatura proposta pela Human Genome Variation Society, HGVS.

Os dados brutos das 55 amostras do painel foram processados e pré-analisados pela curadoria do CEGH-USP (Centro de Estudos do Genoma Humano - Universidade de São Paulo). Os dados das 14 amostras de exoma foram processados pelo suporte do Departamento de Bioinformática do CTO-ICESP e totalmente pré-analisados internamente.

Para uma análise comparável e classificação das amostras em conjunto, os dados gerados a partir do exoma sequenciado foram selecionados para o arquivo bed do painel TruSight Hereditary Cancer de 113 genes pelo software R.

Apenas variantes consideradas verdadeiramente germinativas e de confiança mínima foram classificadas posteriormente. O limite estabelecido foi de 30 leituras de profundidade e 28% para Variant Allele Frequency (VAF). As amostras devem apresentar filtros de qualidade *pass*, $mappq \geq 20$ e qualidade genotípica ≥ 99 . Variantes em genes associados à predisposição ao câncer de próstata, cujo VAF estava próximo de 30%, foram consideradas para uma análise mais abrangente através do Integrative Genomics Viewer (IGV) para confirmar sua veracidade como variante da linha germinativa.

As variantes raras foram avaliadas para frequências populacionais usando bancos de dados multiétnicos internacionais (GNOMAD e 1000 genomes) e bancos de dados brasileiros (ABraOM - Arquivo Brasileiro Online de Mutações - e SABE-WGS-1171 (hg38)), um conjunto de dados de variantes genômicas obtidas com WES/WGS de idosos da ABRaOM de 1.171 indivíduos mestiços não aparentados de São Paulo matriculados em 2010-2012. As variantes cuja frequência do Alelo Menor foi $< 5\%$ foram consideradas raras.

Variantes sinônimas, regiões não codificantes e variantes intrônicas localizadas além dos locais de splice canônicos (+-3) não foram analisadas. Os resultados das ferramentas de predição *in silico* recuperados pelo VEP (Annovar) contribuíram para a análise do efeito das variantes nos genes. Bancos de dados clínicos e literatura também foram avaliados.

As variações do número de cópias (CNV) foram avaliadas comparando a cobertura das regiões de todas as amostras e controles de referência interna, através do software NextGene. O grande rearranjo identificado foi confirmado pela técnica *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*-MLPA (FANCA SALSA® MLPA®

P031 e P032 Probemix; MRC-Holland, Amsterdã, Holanda). Os dados foram analisados no software Coffalyser.NET. Os valores foram considerados normais quando a relação ficou entre 0,7 e 1,3. Os valores acima foram considerados duplicações e abaixo, exclusões.

Todas as variantes identificadas pela plataforma foram nomeadas de acordo com a nomenclatura proposta pela *Human Genome Variation Society*, HGVS.

As variantes foram classificadas de acordo com as recomendações do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACGM) (RICHARDS ET.AL.,2015) em: variante patogênica, provavelmente patogênica, benigna, provavelmente benigna e de significado incerto (VSI).

4.10 Análise Estatística de Dados

As análises estatísticas foram realizadas através dos testes Qui-quadrado ou Exato de Fisher para variáveis categóricas utilizando o IBM SPSS Statistics versão 25. As associações foram consideradas estatisticamente significativas quando valor de $p < 0,05$. As curvas de sobrevivência foram geradas usando o método de Kaplan-Meier e comparadas usando o teste log-rank usando o software R (versão 4.2.1) e os pacotes R survival, survminer e ggplot2.

5. RESULTADOS

5.1 Características clínicas dos pacientes

Foram avaliados 69 pacientes retrospectivos e prospectivos, enriquecidos para casos de alto risco. A inclusão foi composta de casos retrospectivos proveniente de amostras de pacientes previamente armazenadas (n=29) e casos prospectivos (n=40) incluídos pelo Biobanco Institucional entre 2015 a agosto de 2020.

O grupo de pacientes incluídos é composto por, pelo menos, um indivíduo nascido em cada uma das 5 regiões geográficas brasileiras. A maioria dos pacientes nasceu nas regiões sudeste (48%) e nordeste (42%). Os pacientes eram nascidos principalmente nos estados de São Paulo (36.8%) e Bahia (20.6%) (Figura 8).

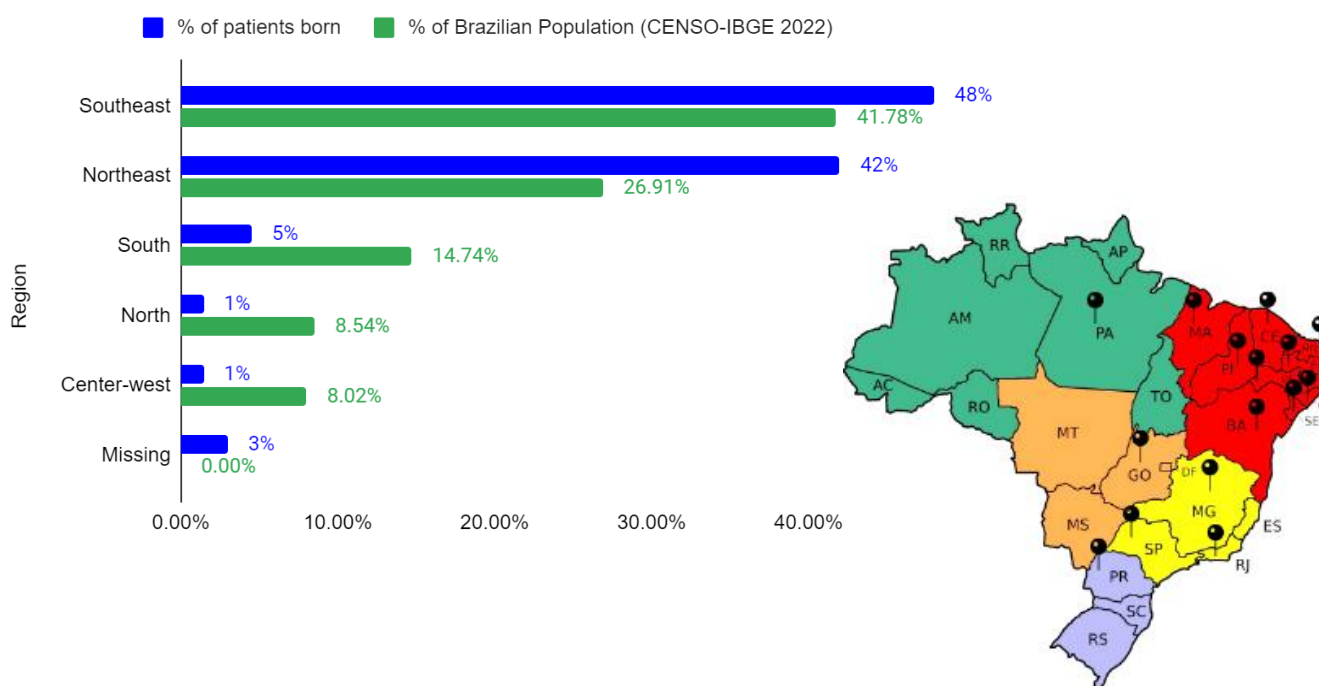


Figura 8. O mapa do Brasil indica os estados de nascimento dos pacientes incluídos no estudo. O gráfico de barras mostra a porcentagem de indivíduos por região geográfica brasileira e a porcentagem de pacientes incluídos no estudo, nascidos em cada região.

A idade mediana ao diagnóstico foi de 59 anos (51-81). Mais de 50% dos pacientes se autodeclararam pardos ou morenos (51,5%), seguidos de brancos (26%), pretos (19%), amarelos/asiáticos (1,5%), e indígenas (1,5%). Cinquenta e cinco por cento dos pacientes apresentavam história familiar de câncer, entre os quais, 30% tinham história familiar de câncer de próstata. Dentre todos, 9,5 % apresentavam familiares com diagnóstico em idade precoce (abaixo dos 60 anos de idade). História familiar de cânceres de mama, ovário, pâncreas, endométrio e colorretal foi identificada em 15%

dos pacientes. Obesidade e sobrepeso foram identificados em 58.6% dos pacientes, enquanto 34.8% apresentaram peso normal e 16% encontravam-se abaixo do peso ideal.

Neste estudo, 90% dos pacientes apresentaram metástases à distância ao diagnóstico, e 92,75% dos pacientes apresentavam doença agressiva. Oitenta e quatro por cento dos pacientes (58/69) tinham doença de altíssimo risco (T3b ou T4 and ISUP 5, Gleason score 9 ou 10; 2 ou 3 características do grupo de alto risco, ou >4 core-biópsias com ISUP 4 ou 5, Gleason score 8 a 10) e 8,7% (6/ 69) doença de alto risco (\geq Gleason score 8, ou T3, ou N1, ou M1, ou PSA >20 ng/dL).

Dentre os 7,3% pacientes remanescentes, que apresentavam doença de risco intermediário (n=4), e um paciente com doença de baixo risco. Dois pacientes relataram história familiar de câncer de próstata em familiares de 1º grau. Três pacientes foram diagnosticados abaixo dos 60 anos, sendo este o motivo da inclusão do paciente com doença de baixo risco (PSA inicial <10, e Gleason Score 6).

Excetuando-se um único tumor do tipo adenocarcinoma mucinoso da próstata, todos os demais pacientes possuíam tumores do tipo histológico acinar. Dentre estes, 5 pacientes apresentavam componente intraductal; um dos pacientes também apresentou diferenciação neuroendócrina, e outro, a presença de componente cribriforme. As características clínicas podem ser vistas em detalhe na tabela 1.

Todos os pacientes foram diagnosticados através de análise histopatológica do sítio primário, exceto dois pacientes, cujo diagnóstico foi realizado a partir dos sítios secundários. As amostras secundárias provenientes de medula óssea e ossos foram avaliadas histologicamente, comprovando o comprometimento do tecido com células compatíveis com adenocarcinoma de próstata.

Tabela 1- Características Clínicas dos pacientes

Características	Total	Carreadores	Não Carreadores	Valor de p (Teste exato de Fisher)
Pacientes incluídos	69	11	58	-
Idade mediana (diagnóstico)	59 (51-81)	64.5	65	-
Idade diagnóstico				
<=60 anos	17 (24.6%)	1 (9.1%)	16 (27.6%)	p= 0.270
>60 anos	52 (75.4%)	10 (90.9%)	42 (72.4%)	
História Familiar de Câncer				
Sim	38 (55%)	6 (54.5%)	32 (55.2%)	p=1.00
Não	31 (45%)	5 (45.5%)	26 (44.8%)	
História Familiar de Câncer (1° grau)				
Sim	28 (40%)	5 (45.5%)	23 (39.6%)	p=1.00
Não	41 (59.4%)	6 (54.5%)	35 (60.4%)	
História Familiar de CaP				
Sim	21 (30.4%)	3 (27.3%)	18 (31%)	p=0.714
Não	48 (69.6%)	8 (72.7%)	40 (69%)	
História Familiar de CaP (1° grau)				
Sim	15 (21.7%)	3 (27.3%)	12 (20.7%)	p=0.213
Não	54 (78.3%)	8 (72.7%)	46 (79.3%)	
História Familiar de CM ou CO ou CPa				
Sim	11 (16%)	3 (27.3%)	8 (13.8%)	p=1.00
Não	58 (84%)	8 (72.7%)	50 (86.2%)	
História Familiar de CCR ou CE				
Sim	4 (6%)	0	4 (6.9%)	p=0.236
Não	65 (94%)	11 (100%)	54 (93.1%)	
Sobrepeso/Obeso				
Sim	30 (43.5%)	6 (54.5%)	24 (41.4%)	p=0.672
Não	39 (56.5%)	5 (45.5%)	34 (58.6%)	
Doença de alto risco				
Sim	64 (92,75%)	11 (100%)	53 (91.4%)	p=0.585
Não	5 (7,45%)	0	5 (8.6%)	
Gleason Score				
≥8	39 (56.5%)	8 (72,7%)	31 (53.4%)	p=0.337
<8	30 (43.5%)	3 (27.3%)	27 (46.6%)	
Metástases à distância (<i>de novo</i>)				
Sim	43 (62.3%)	6 (54.5%)	37 (63.8%)	p=0.736
Não	26 (37.7%)	5 (45.5%)	21 (36.2%)	
Componente Intraductal				
Sim	5 (7.25%)	1 (9.1%)	4 (6.9%)	p=1.00
Não	64 (92.75%)	10 (90.9%)	54 (93.1%)	

Carreadores de variantes patogênicas/provavelmente patogênicas germinativas; CM, câncer de mama; CO, câncer de ovário, PaC, câncer de pâncreas; CCR, câncer colorretal; CE, câncer de endométrio; Valores de $p > 0.05$, considerados não estatisticamente significativos.

5.2 Pacientes carreadores de variantes patogênicas

Dezesseis por cento dos pacientes foram identificados como carreadores de variantes patogênicas/ aparentemente patogênicas.

As alterações identificadas, e as respectivas características clínicas dos pacientes carreadores estão indicadas na tabela 2.

Todos os carreadores de variantes patogênicas/provavelmente patogênicas (VGP) apresentavam doenças de alto risco, 54.5% metástases à distância ao diagnóstico, e 72% doença agressiva (Gleason score ≥ 8). Dentre os portadores de VGP, 54.5% estavam com sobrepeso ou obesos no momento do diagnóstico, e um paciente apresentou doença de diagnóstico antes dos 60 anos de idade. Não houveram diferenças estatisticamente significativas entre carreadores e não carreadores de VGP quanto à história familiar de câncer, IMC, ou prognóstico de alto risco (Table 1). Dentre os pacientes com metástases de novo, 14% eram portadores de VGP.

Seis portadores de VGP relataram história familiar de câncer; 5 em pelo menos um familiar de 1° grau com câncer. Dentre estes, 3 apresentavam história familiar de câncer de próstata, e um relatou história familiar de câncer de mama. Outro paciente relatou história familiar de câncer de pâncreas em familiar e 2° grau (sobrinha) (Tabela 2).

Seis pacientes eram portadores de VGP em genes classicamente relacionados à predisposição ao câncer de próstata: dois pacientes em *ATM* (*ATM* c.8264_8268del e *ATM* c.1236-2A>T), três pacientes em três genes distintos (*BRCA2* c.8351G>A, *MSH6* c.892C>T, and *PMS2* c.137G>T), e um paciente era portador de duas VGPs em dois genes simultaneamente (*CHEK2* c.470T>C and *FANCA* c.exons1-6del). Ademais, cinco pacientes eram portadores de VGPs em genes não relacionados à predisposição ao câncer de próstata: *CaSR* c.658C>T, *DICER1* c.757dup, *ERCC2* c.1703_1704del, *RINT1* c.1603C>T e *XPC* c.2251-1G>C (Tabela 2).

Setenta e um por cento dos genes afetados envolvem vias de reparo de DNA, especialmente a via de recombinação homóloga. As vias de mismatch repair e reparo por excisão de nucleotídeo também foram afetadas (Figura 9).

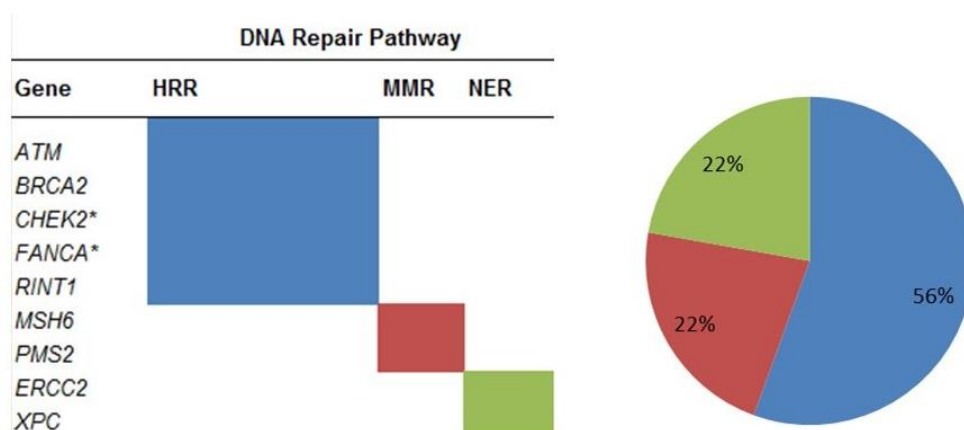


Figure 9. Distribuição das VGPs identificadas de acordo com a respectiva via de reparo de DNA. **CHEK2* e *FANCA* foram detectadas no mesmo paciente. HRR, Homologous recombination repair; MMR, Mismatch repair, NER, Nucleotide-excision repair.

Um paciente apresentou duas variantes patogênicas/provavelmente patogênicas: a variante missense *CHEK2* c.470T>C, e uma grande deleção compreendendo os éxons 1-6 em *FANCA*, confirmada por MLPA. O paciente em questão foi diagnosticado em estadiamento clínico avançado (IVB) aos 81 anos; e apresentava história familiar de câncer de pâncreas em sobrinha, diagnosticada aos 50 anos.

O paciente carreador da deleção *ATM* c.8264_8268del apresentou história familiar de câncer em 1° grau (pai com câncer de próstata e irmã com câncer de mama), Gleason score 10 e metástase óssea ao diagnóstico com progressão para Câncer de Próstata Resistente à Castração (mCPRC) com infiltração medular.

A variante de splice site *ATM* c.1236-2A>T foi identificada em um paciente com tumor não metastático extra prostático com invasão da vesícula seminal (T3b). O tumor apresentava grau histológico 3, e o paciente progrediu para recorrência bioquímica.

O portador da variante *BRCA2* c.8351G>A, nasceu no estado da Bahia, e apresentava história familiar de câncer em 1° e 2° graus de: próstata (pai), leucemia (mãe diagnosticada em idade precoce, 29 anos) e câncer ósseo (avô paterno, 35 anos). Este paciente é um fumante pesado (50 maços-ano). Ele apresentava metástases à distância em osso e linfonodos pulmonares, retroperitoneais e mediastinais. Ele tinha doença de alto risco e apresentou recorrência bioquímica.

O portador de *PMS2* c.137G>T apresentava pai com câncer colorretal e avô materno com câncer de pele. O paciente apresentava tumor T3a e padrão de Gleason 3 com 10% de componente mucinoso em idade precoce (60 anos). Fumou durante 27 anos cerca de 40 cigarros por dia, e consumiu bebidas alcoólicas dos 8 aos 61 anos, e não praticava atividades físicas.

O paciente portador da variante patogênica *MSH6* c.892C>T nasceu na região Nordeste (Pernambuco), autodeclarou-se pardo e foi diagnosticado aos 59 anos. Anteriormente, ele manteve hábitos pesados de fumar e beber (maço de 60 anos e 5 bebidas alcoólicas por dia) por 23 anos. Duas irmãs da paciente tiveram câncer de mama em idade precoce. Apresentou câncer de próstata letal com escore de Gleason 9 (4+5) diagnosticado em estágio IV em ossos, linfonodos, pulmão e peritônio.

Um paciente possuía dois VGPs: *CHEK2* c.470T>C e *FANCA* c.exons1-6del. Ele se autodeclarava branco e tinha uma sobrinha com diagnóstico de câncer de pâncreas aos 50 anos. Apresentou doença metastática para ossos e linfonodos intra-aórticos aos 81 anos e um segundo tumor primário de rim.

O paciente portador da variante no *CASR* autodeclarou-se marrom. Não apresentava hipercalemia. Não apresentava metástase à distância ao diagnóstico e foi estadiado IVA. O tumor tinha componente intraductal e escore de Gleason 9 (5+4).

O portador da duplicação *DICER1* autodeclarou-se pardo e tinha histórico familiar negativo de câncer. O paciente era ex-fumante há 29 anos e não praticava atividades físicas. Ele foi diagnosticado aos 68 anos com msCPC de novo (câncer de próstata sensível a metástases) de um tumor *primário Gleason Score 8(4+4)*.

O paciente portador do VGP no *ERCC2* se autodeclarou de “pele parda”, tinha histórico familiar negativo de câncer e era natural do Piauí. O paciente praticava atividades físicas com frequência. Apresentou tumor T3 com escore de Gleason 9 (4+5), e relatou presença de pólipos intestinais hiperplásicos. Não foi descrita história de câncer de pele na família do paciente.

O portador da variante *RINT1* nasceu na região Nordeste (PE). Ele apresentava doença metastática ao diagnóstico e tumor primário ISUP 5 sensível à terapia hormonal.

O paciente portador da variante no *XPC* se autodeclarou branco, tinha histórico familiar positivo de câncer de próstata em parentes de primeiro grau (dois irmãos), um irmão com leucemia e uma irmã com câncer de coluna cervical. Era ex-fumante (20 cigarros por dia) e praticava atividades físicas regularmente.

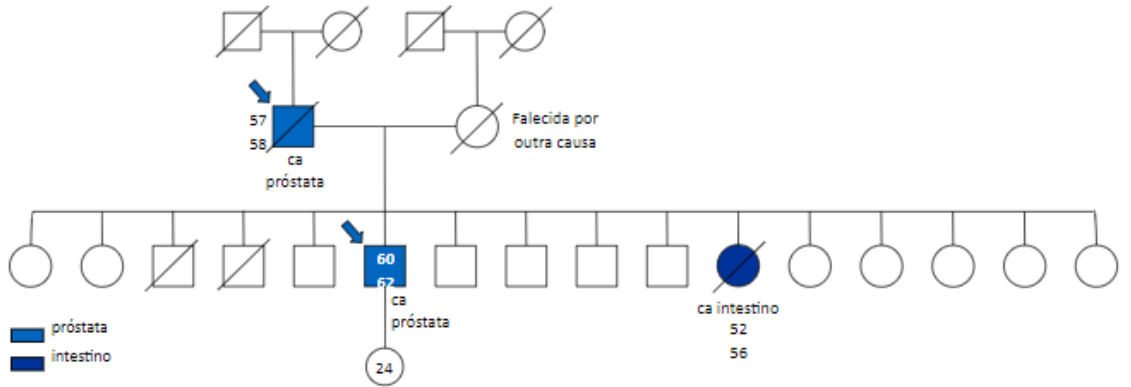
Sessenta e oito pacientes apresentavam adenocarcinomas acinares do tipo histológico usual, dentre os quais, 5 apresentavam componente intraductal, um deles com diferenciação neuroendócrina e outro com padrão cribriforme. Houve também um paciente que apresentava adenocarcinoma mucinoso da próstata. Este último paciente foi diagnosticado aos 50 anos. O tumor tinha grau histológico 3 (escore de Gleason 7, 4+3), e a lesão atingiu a uretra, causando redução do parênquima renal.

Cinco pacientes tinham tumores primários contendo a. Um paciente diagnosticado aos 61 anos apresentou tumor de grau 2 (escore de Gleason 7, 3+4) composto por 95% de adenocarcinoma acinar usual e 5% de adenocarcinoma ductal. Os outros quatro pacientes apresentavam tumores de grau 5 (escore de Gleason 9 e 10).

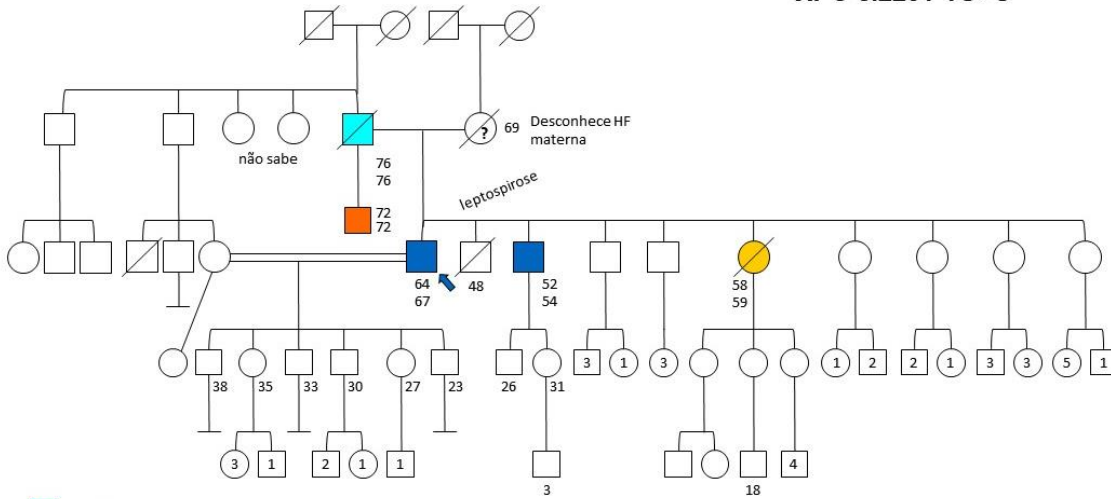
Todos os cinco pacientes portadores de VGPs em genes não clássicos do câncer de próstata foram autodeclarados pardos e a idade média no momento do diagnóstico foi de 65 anos (variação: 63-76). Três pacientes apresentavam história familiar negativa de câncer, aqueles portadores de VGP em *CaSR*, *DICER1* e *ERCC2*.

A seguir, exemplos de heredogramas de 3 pacientes portadores de variantes germinativas P/PP e VUS:

ATM c.8264_8268del



XPC c.2251-1G>C



MSH6 c.892C>T (p.R298*)

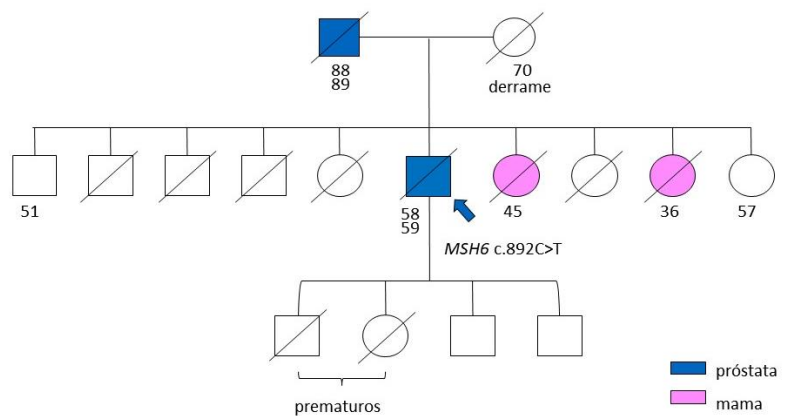


Figura 10- Heredogramas

Tabela 2. Características clínico-patológicas dos 11 pacientes portadores de variantes germinativas patogênicas/ provavelmente patogênicas (VGP).

Paciente	Gene	c.change	A.A change	Consequência	dbSNP	Classificação ACMG	IdadeDx	HF Câncer	IMC	EC	PSAi (ng/dL)	Gleason Escore
Associados com aumento do risco para o câncer de próstata												
#PCA1	<i>ATM</i>	c.8264_8268del	p.Y2755fs	Frameshift	rs730881294	Patogênica	60	Irmã, CM (50) Pai, CaP (66)	16	IVB	2118	10
#PCA2	<i>ATM</i>	c.1236-2A>T	NA	Splicing	rs80159221	Patogênica	62	Negativa	31.2	IIIB	4,74	7(4+3)
#PCA3	<i>BRCA2</i>	c.8351G>A	p.R2784Q	Missense	rs80359076	Provavelmente Patogênica	66	Pai, CaP (?) Mãe, Leucemia (29) Avô P, Ossos (35)	28.1	IVB	33,73	9
#PCA7	<i>CHEK2</i>	c.470T>C	p.I157T	Missense	rs17879961	Provavelmente Patogênica	81	Sobrinha, PaC (50)	29.5	IVB	54,6	8
	<i>FANCA</i>	c.exons 1-6del	-	Large deletion	-	Patogênica						
#PCA8	<i>MSH6</i>	c.892C>T	p.R298*	Stop codon	rs146816935	Patogênica	59	Irmã, CM (45) Irmã, CM (36)	22.9	IVB	545	9
#PCA9	<i>PMS2</i>	c.137G>T	p.S46I	Missense	rs121434629	Provavelmente Patogênica	60	Negativa	29	IIIB	5.77	7(4+3)
Não associados com aumento do risco para o câncer de próstata												
#PCA4	<i>CASR</i>	c.658C>T	p.R220W	Missense	NA	Patogênica	65	Negativa	27.3	IVA	47	9(5+4)
#PCA5	<i>DICER1</i>	c.757dup	p.Ile253fs	Frameshift	rs15553753	Patogênica	68	Negativa	32.8	IVB	1043	8
#PCA6	<i>ERCC2</i>	c.1703_1704del	p.F568Yfs*2	Frameshift	rs587778271	Patogênica	63	Negativa	22.3	IIIC	9.3	9 (4+5)
#PCA10	<i>RINT1</i>	c.1603C>T	p.R535*	Stop codon	rs764298491	Patogênica	76	irmão, UK (51)	ND	IVB	>1000	9(5+4)
#PCA11	<i>XPC</i>	c.2251-1G>C	-	Splicing	rs754673606	Patogênica	64	2 irmãos, CaP(?)	25	IIIB	8.47	7(3+4)

5.3 Variantes de Significado Incerto

Quarenta e nove dos 69 (71%) pacientes apresentavam uma Variante de Significado Incerto (VSI). Seis dos 69 pacientes (8,6%) também eram portadores de VGP. Entre todos os 69 pacientes, 29%, 23% e 18,8% eram portadores de uma, duas, três (ou mais) VSI, e 29% não eram portadores de VSI (Figura 10). Um dos pacientes era portador de seis VSI. Este paciente também era portador de VGP em *PMS2*.

No total, 107 VSI foram detectadas em 52 genes de predisposição ao câncer. Cinquenta e dois por cento dos genes apresentaram uma VSI; 19,2%, duas VSI; 17,3% tinham três VSI e 11,5% dos genes tinham 4 ou mais VSI (Figura 4; Tabela Suplementar S1). Os genes com maior número de VSI foram *ATM* (n=12), seguido de *FANCA* (n=6) (Figura 10). O tipo mais comum de VSI foi missense (n=105). Houve também duas variantes frameshift: uma inserção (*FANCL* c.1096_1099insATTA) e uma deleção (*TCHHL1* c.1395delA) (Tabela 3). A variante *FANCL* c.1096_1099insATTA foi identificada no paciente portador de VGP no gene *XPC*.

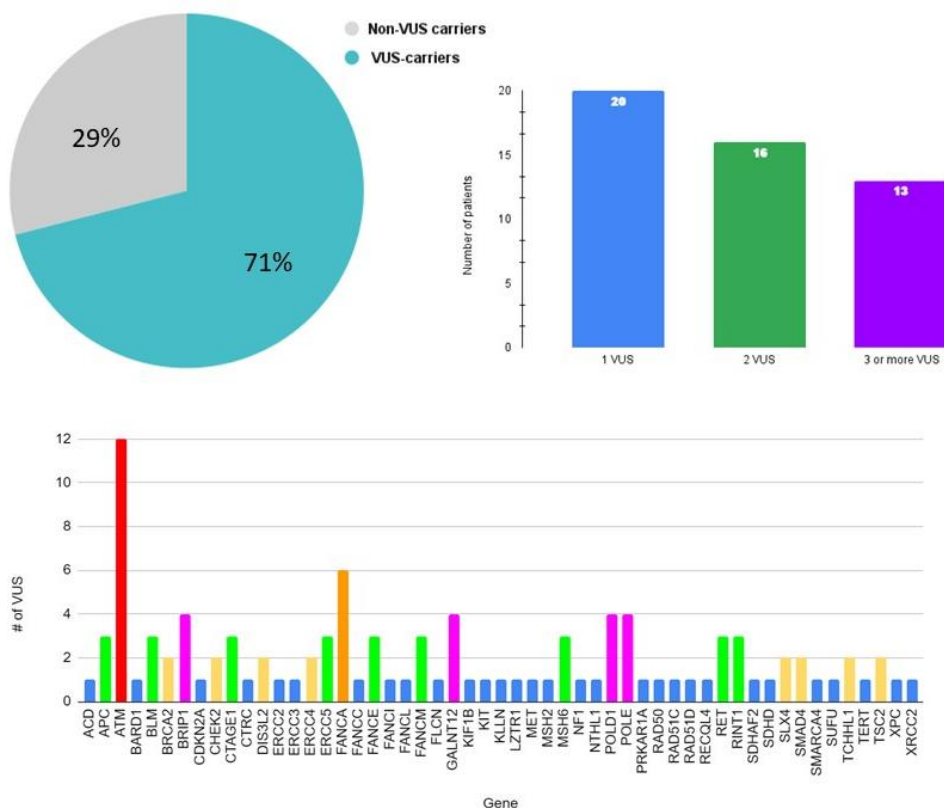


Figura 10. A, o número de variantes de significado incerto detectadas nos 69 pacientes com câncer de próstata sequenciados. B, distribuição dos 107 VUS detectados por gene. Rosa, 4 VSI; Verde, 3 VSI; Laranja, 2 VSI; Azul, 1 VSI.

Tabela 3 - Variantes de significado incerto identificadas (n=107)

Gene	VUS detected	AA change	dbSNP 20210213
<i>ACD</i>	c.22G>A	p.V8I	rs149365469
<i>APC</i>	c.4912A>G, c.5236A>G, c.7193C>T	p.M1638V, p.I1746V, p.S2398F	rs1765804123, rs786202076, rs150882838
<i>ATM</i>	c.1106C>T, c.2428A>G, c.5890A>G, c.320G>A , c.7313C>T , c.3240C>A	p.S369F, p.K810E, p.K1964E, p.C107Y, p.T2438I, p.D1080E	rs762557654, rs201909756, rs201963507, rs142358238, rs147604227, rs 149911447
<i>BARD1</i>	c.A2153A>G	p.N718S	rs773166130
<i>BLM</i>	c.543C>A , c.1556A>G	p.S181R, p.Y519C	rs761288442, rs1567041220
<i>BRCA2</i>	c.3299A>T, c.5612G>A	p.N1100I, p.S1871N	rs80358575, rs80358782
<i>BRIP1</i>	c.854A>G, c.316C>T, c.3651G>T, c.3275C>A	p.H285R, p.R106C, p.W1217C, p. P1092Q	rs141055990, rs587780247, rs542698396, rs587780830
<i>CDKN2A</i>	c.26T>A	p.M9K	rs145445140
<i>CHEK2</i>	c.88G>A, c.157T>A,	p.G30S, p.S53T	rs1555932749, rs371657037
<i>CTAGE1</i>	c.970A>G, c.772G>C, c.2069C>A	p.I324V, p.D258H, p.P690Q	rs12961009, rs2143794188
<i>CTRC</i>	c.761G>A	p.R254Q	rs755811899
<i>DIS3L2</i>	c.994G>C, c. 1691G>A	p.E332Q, p.G564D	rs916060836, NA
<i>ERCC2</i>	c.1937T>C	p.I646T	NA
<i>ERCC3</i>	c.1155C>G	p.D385E	NA
<i>ERCC4</i>	c.2164A>G, c.1102G>A	p.M722V, p.E368K	NA, rs148933357
<i>ERCC5</i>	c.1328C>G, c.2911A>G, c.2208G>C	p.T443S, p.T971A, p.L736F	NA, NA, rs201744259
<i>FANCA</i>	c.3524C>T, c.377C>T , c.1038G>C, c.2862C>G, c.4244T>G	p.P1175L, p.T126TM, p.W346C, p.F954L, p.F1415C	rs147017625, rs139160837, rs750257902, rs2038844439, rs201658945
<i>FANCC</i>	c.817G>A	p.E273K	rs143181565
<i>FANCE</i>	c.1141C>T, c.31G>A, c.1141C>T	p.R381C, p.A11T, p.R381C	rs371020401, rs753304968, rs371020401
<i>FANCI</i>	c.2543A>G, c.2849G>C	p.Q848R, p.S950T	NA, NA
<i>FANCL</i>	c.1099_1100insATTA	p.T367fs	NA

<i>FANCM</i>	c.2517T>G, c.4641T>A, c.1741C>T	p.I839M, p.N1547K, p.R581C	rs61744648, rs932577451, rs202171930
<i>FLCN</i>	c.833C>T	p.P278L	rs748031634
<i>GALNT12</i>	c.566A>G, c.1118G>A, c.3G>A, c.391G>C	p.N189S, p.R373H, p.M1I, p.D131H	rs183981750, rs920049418, rs267606839, rs1588444632
<i>KIF1B</i>	c.2896C>T	p.P966S	rs140733878
<i>KIT</i>	c.878A>G	p.N293S	rs137909416
<i>KLLN</i>	c.130G>C	p.G44R	NA
<i>LZTR1</i>	c.1990G>A	p.A664T	rs140874089
<i>MET</i>	c.3151G>A	p.V1051I	rs775997318
<i>MSH2</i>	c.2178G>C	p.M726I	rs587782396
<i>MSH6</i>	c.3350G>T, c.719G>A, c.884A>G	p.C1117F, p.R240Q, p.K295R	rs773245315, rs542848931, rs267608051
<i>NF1</i>	c.4526G>A	p.R1509H	rs546073780
<i>NTHL1</i>	c.113C>T	p.A38V	rs202082304
<i>POLD1</i>	c.1930G>A, c.2861C>G, c.2388+5G>A, c.189G>T, c.1322C>T	p.D644N, p.T954R, -, p.E63D, p.T441M	rs763465385, rs374016016, rs750085275, rs776773005, rs376711125
<i>POLE</i>	c.1553A>G, c.6775C>T, c.1021G>T, c.3880C>T	p.N518S, p.R2259W, p.A341S, p.R1294C	rs553123678, rs866548835, rs137860861, rs770966534
<i>PRKAR1A</i>	c.221G>A	p.R74H	rs200069356
<i>RAD50</i>	c.220C>G	p.Q74E	rs786201699
<i>RAD51C</i>	c.200A>G	p.E67G	rs375451955
<i>RAD51D</i>	c.70A>G	p.R24G	rs781611267
<i>RECQL4</i>	c.2816C>T	p.A939V	rs561220929
<i>RET</i>	c.973G>A, c.785T>C, c.3027G>A	p.A325T, p.V262A, p.M1009I	rs779719517, rs139790943, rs1007307889
<i>RINT1</i>	c.2134C>G, c.388G>A, c.1489C>T	p.L712V, p.A130T, p.P497S	rs139766063, rs138345617, NA
<i>SDHAF2</i>	c.331G>A	p.E111K	rs145616631

<i>SDHD</i>	c.281C>G	p.S94C	rs199754684
<i>SLX4</i>	c.3607C>G, c.3311G>A	p.P1203A, p.R1104Q	rs745508761, rs767093188
<i>SMAD4</i>	c.761C>T, c.875C>T	p.T254I, p.P292L	rs1599189610, rs786201404
<i>SMARCA4</i>	c.104C>T	p.S35L	rs563079629
<i>SUFU</i>	c.777C>G	p.I259M	rs749533220
<i>TCHHL1</i>	c.G829G>A, c.1395delA	p.E277K, p.S465fs	NA, NA
<i>TERT</i>	c.3184G>A	p.A1062T	rs35719940
<i>TSC2</i>	c.2054C>T, c.4106G>A	p.P685L, p.R1396Q	rs959165669, rs587778738
<i>XPC</i>	c.597A>C	p.K199N	rs587778759
<i>XRCC2</i>	c.613T>G	p.S205A	rs56103026

Negrito: Variantes de significado incerto detectadas em 2 pacientes; Vermelho: Variantes de significado incerto detectadas em 3 ou mais pacientes

5.4 Análise de Sobrevida

O seguimento mediano da coorte foi de 48,8 meses, e o tempo médio de sobrevida estimado foi de 82,86 meses (Figura 11). Houve diferença na sobrevida global (SG) de acordo com o estadiamento clínico e PSA inicial (PSAi). Pacientes com PSA inicial acima de 20 ng/dL apresentaram sobrevida global reduzida em comparação com PSA abaixo de 20 (Figura 12).

Não houveram diferenças estatisticamente significativas na sobrevida global em relação à idade (≥ 60 Vs < 60), IMC (Sobrepeso/obesidade Vs peso normal;/baixo peso), história familiar de câncer (HF Positiva Vs HF Negativa), Escore de Gleason (GS ≥ 8 Vs GS < 8), grupos prognósticos (Altíssimo Vs Risco Alto Vs Riscos Intermediário/baixo) (Figuras 13 e 14). Não houve diferença na sobrevida entre portadores e não portadores de VGP, mesmo entre portadores de VGPs em genes de Reparo por Recombinação Homóloga (Figura 15 e 16).

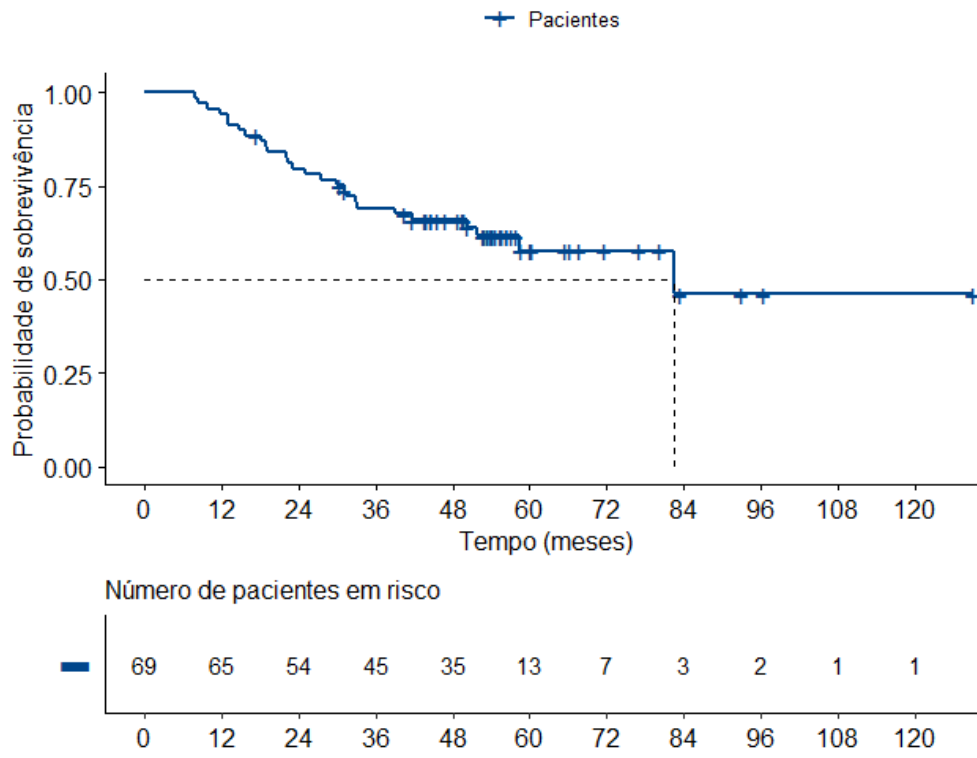
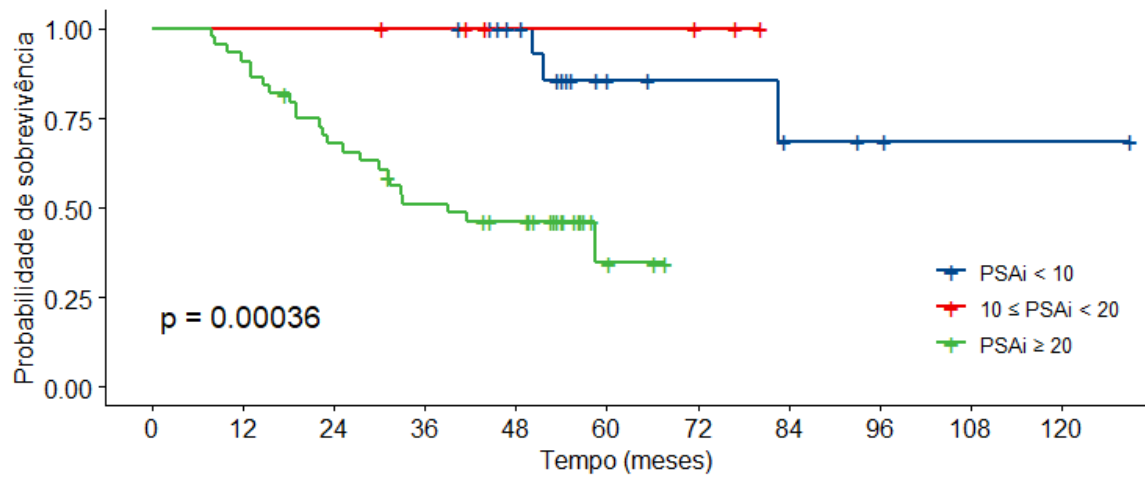
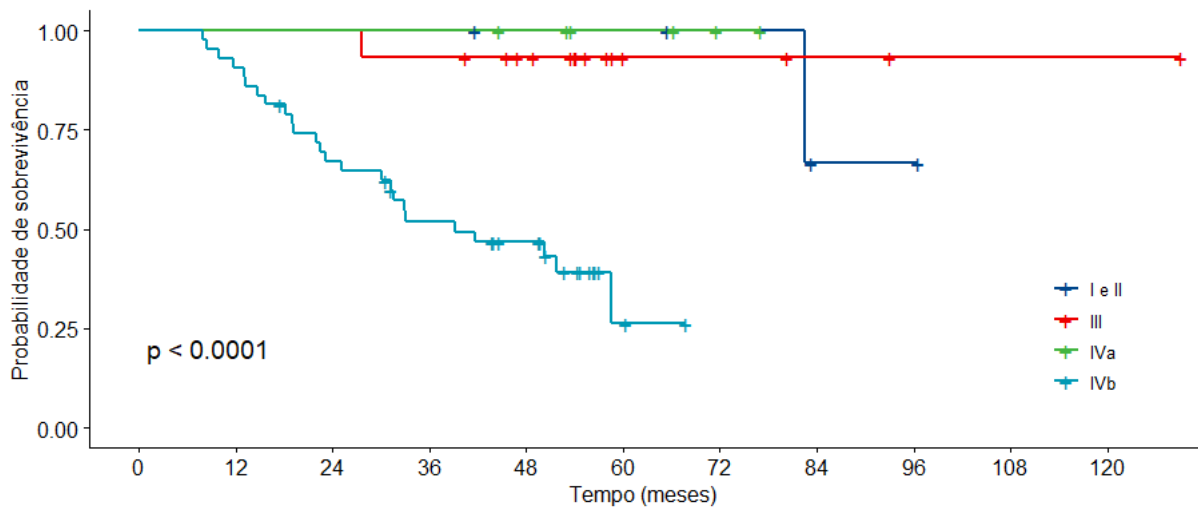


Figura 11. Sobrevida Global mediana estimada (n= 69).



Número de pacientes em risco

■	19	19	19	19	15	7	5	3	2	1	1
■	6	6	6	5	3	3	2	0	0	0	0
■	44	40	29	21	17	3	0	0	0	0	0
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120



Número de pacientes em risco

■	5	5	5	5	4	4	3	1	1	0	0
■	15	15	15	14	11	4	3	2	1	1	1
■	6	6	6	6	5	3	1	0	0	0	0
■	43	39	28	20	15	2	0	0	0	0	0
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120

Figura 12. Sobrevida Global de todos os pacientes de acordo com PSAi e Estadiamento Clínico.

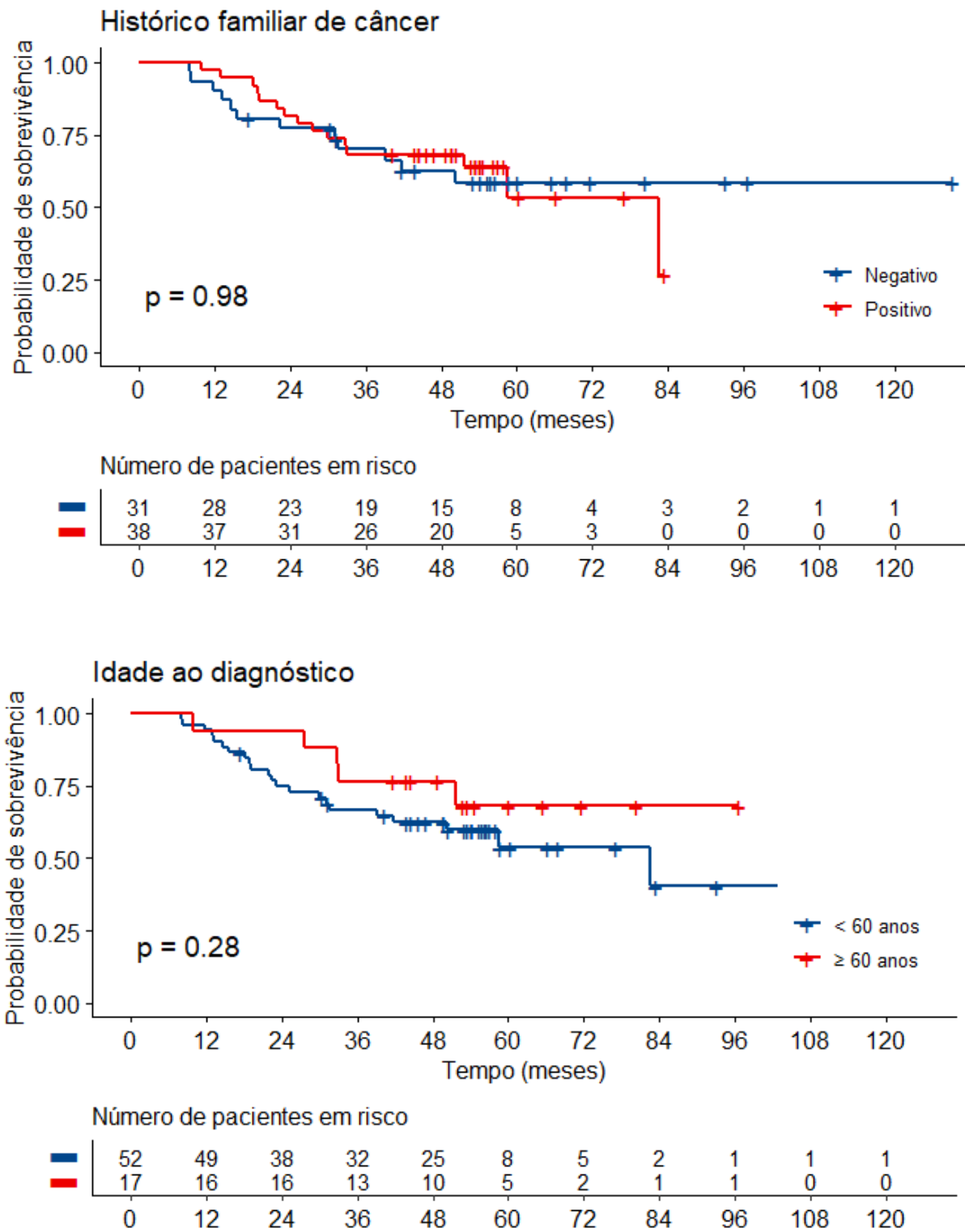
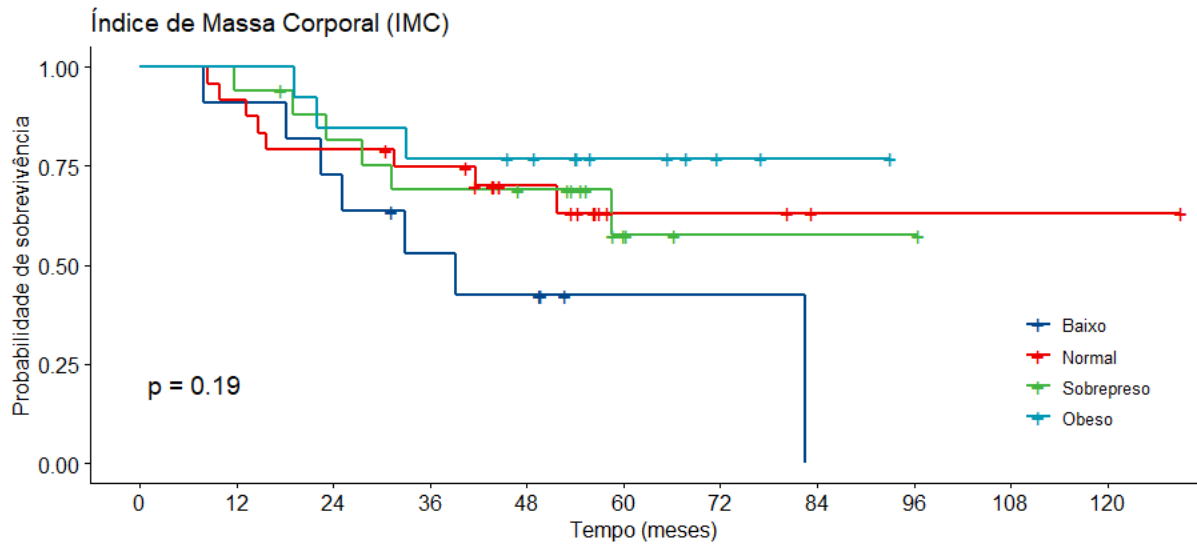
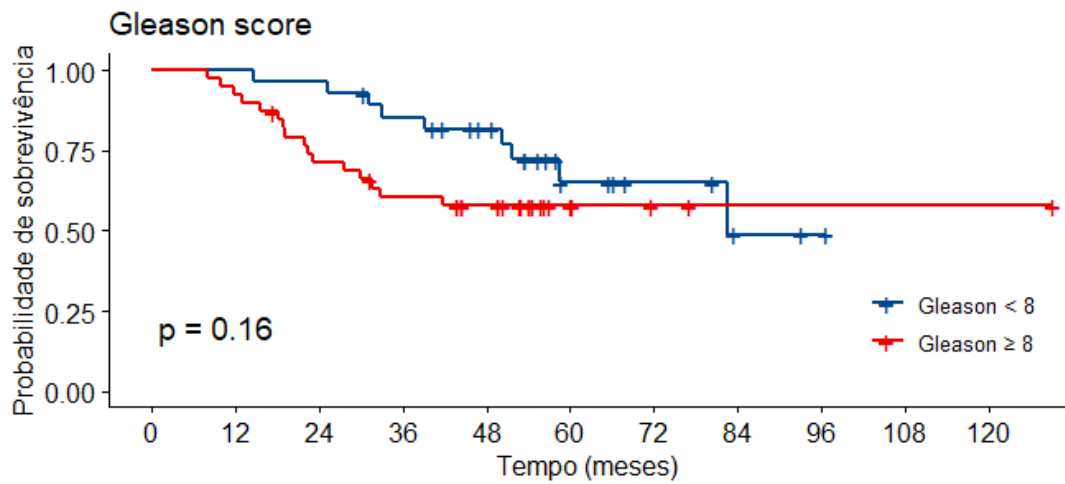


Figura 13. Sobrevida Global de todos os pacientes de acordo com histórico familiar de câncer e Idade ao diagnóstico.



Número de pacientes em risco

■	11	10	8	5	4	1	1	0	0	0	0
■	24	22	19	17	10	3	3	1	1	1	1
■	17	16	13	11	10	4	1	1	1	0	0
■	13	13	11	10	9	5	2	1	0	0	0
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120



Número de pacientes em risco

■	28	28	27	23	18	8	5	2	1	0	0
■	39	36	27	22	17	5	2	1	1	1	1
	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120

Figura 14. Sobrevida Global de todos os pacientes de acordo com Índice de massa corporal (IMC) e Gleason Score.

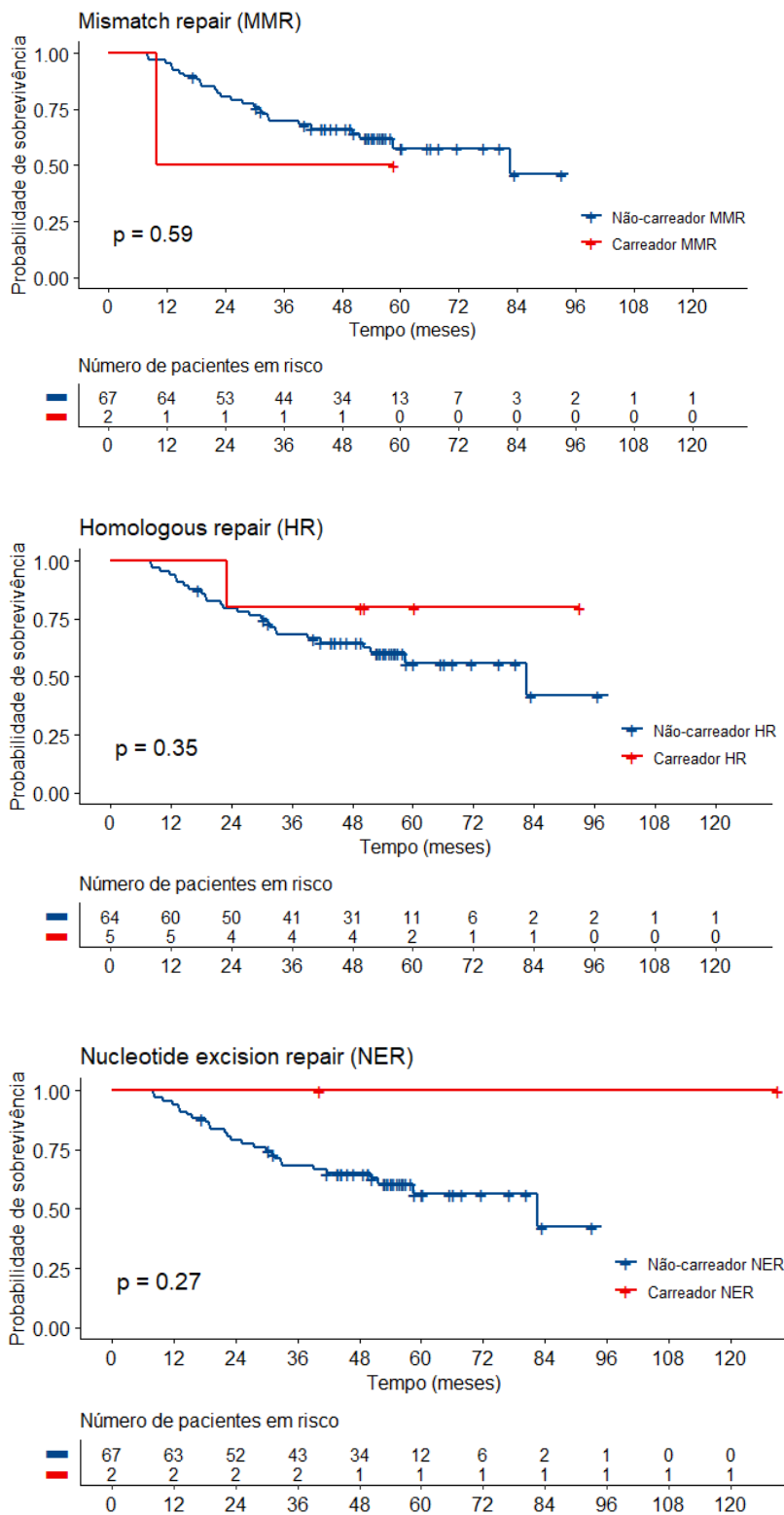


Figura 15. Sobrevida Global de todos os pacientes de acordo com genes do *Mismatch repair* (MMR), *Homologous repair* (HR) e *Nucleotide excision repair* (NER).

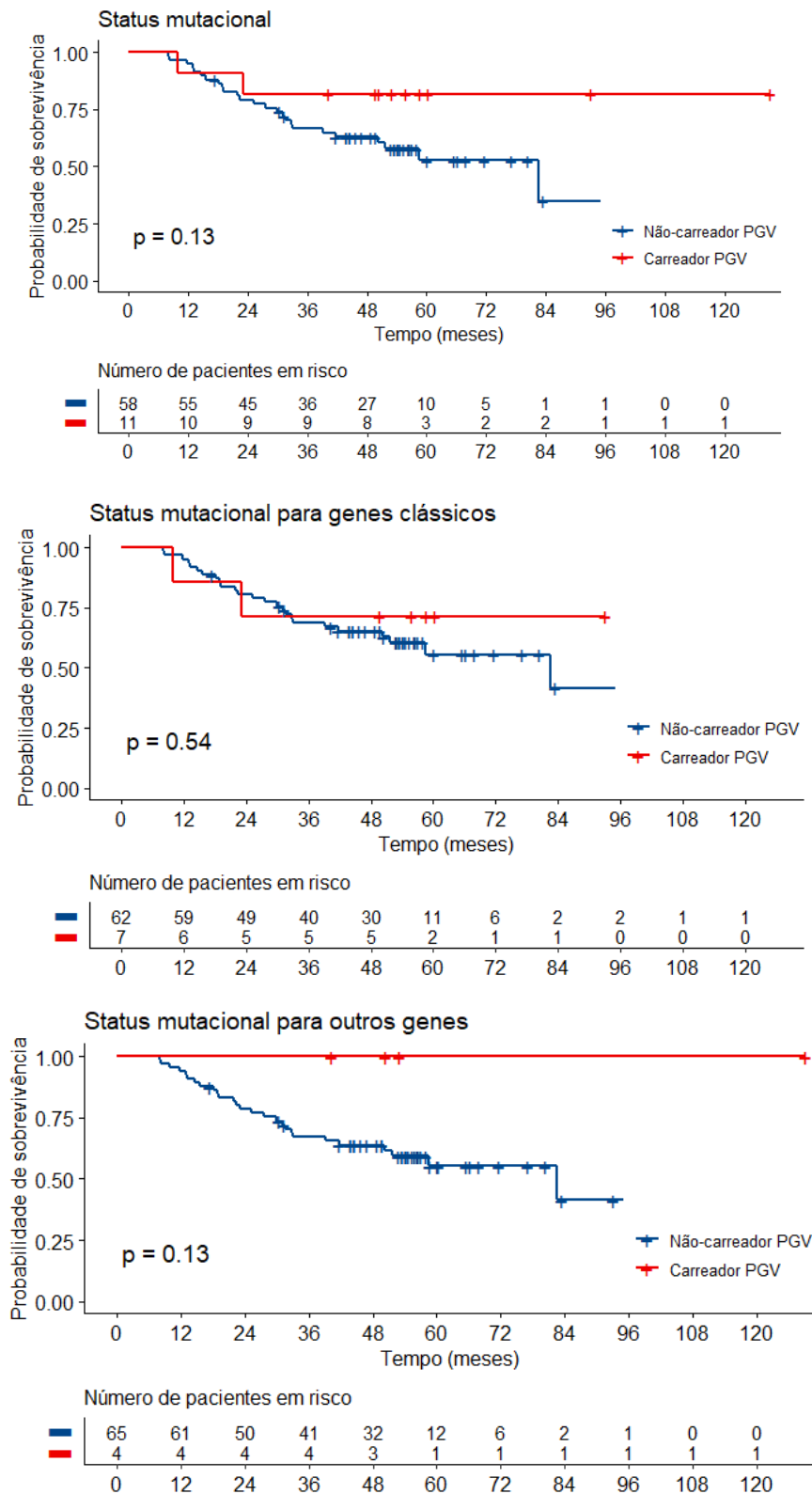


Figura 16. Sobrevida Global de todos os pacientes de acordo com genes do status mutacional, status mutacional para genes clássicos e status mutacional para outros genes.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisados 69 pacientes brasileiros miscigenados com câncer de próstata de alto risco. A idade mediana ao diagnóstico foi de 59 anos (51-81) e a maioria dos indivíduos se autodeclarou como pardos (51,5%). Dezesesseis por cento dos pacientes foram diagnosticados como portadores de variantes germinativas patogênicas e/ou provavelmente patogênicas em genes de predisposição ao câncer, incluindo *ATM*, *BRCA2*, *CASR*, *CHEK2*, *DICER1*, *ERCC2*, *FANCA*, *MSH6*, *PMS2*, *RINT1* e *XPC*. Esta coorte reflete pacientes com doença agressiva, visto que 93% dos pacientes têm doença de alto e altíssimo risco e 62%, metástase *de novo*. Além disso, 24,6% dos pacientes foram diagnosticados em idade precoce (<60 anos).

O interesse a respeito da predisposição genética do câncer de próstata vem crescendo nos últimos anos (ROBINSON ET AL., 2015; PRITCHARD ET AL., 2016), entretanto, a maioria dos estudos realizados até o momento ocorreram em caucasianos (KWON ET AL., 2020; PRITCHARD ET AL., 2016). No estudo realizado por KWON (2020), foi ressaltada a necessidade de estudos com maior diversidade populacional, devido à baixa representatividade de minorias étnicas, e conseqüentemente, a detecção aumentada de variantes de significado incerto (VSI) entre afro-americanos, hispânicos e asiáticos.

O desconhecimento da composição genética presente nas diferentes populações interfere na prevenção, estratificação e manejo do risco, visto que não é possível saber se determinada população apresenta um número reduzido de portadores de variantes patogênicas, e conseqüentemente, um menor risco para desenvolvimento da doença, como a população japonesa (MOMOZAWA ET AL., 2020), ou se aquela população está apenas sub-representada (LIU ET AL., 2020).

Nesta coorte brasileira, 8,7% dos pacientes eram portadores de VGPs em genes classicamente associados à predisposição ao câncer de próstata, tais como: *ATM*, *BRCA2*, *CHEK2*, *MSH6* e *PMS2* (NCCN Guidelines Version 2.2023 Prostate Cancer Early Detection, Access Dec 18, 2023).

As frequências de portadores de VGP não diferiram significativamente de acordo com idade ao diagnóstico, história familiar de câncer, metástase à distância (de novo) ou escore de Gleason. Entre os pacientes que relataram história familiar de algum tipo de câncer, 15,8% eram portadores de VGP. Em contraste, um estudo

anterior identificou 7,3% de portadores de VGP entre pacientes com câncer de próstata, que relataram história familiar de câncer de próstata em 3 parentes próximos (LEONGAMORN LERT ET. AL., 2014). Enquanto no presente estudo, consideraram-se pacientes que relataram histórico familiar de câncer, independentemente do tipo de câncer ou do número de membros da família afetados; e investigou-se a presença de variantes por meio de um painel gênico mais abrangente.

Aproximadamente 12% dos pacientes apresentaram variantes patogênicas em genes de reparo do DNA, em concordância com estudos anteriores (PRITCHARD ET.AL., 2016).

A alta frequência de pacientes portadores de VGPs, o panorama dos genes afetados e a prevalência de portadores por gene em nossa coorte foram semelhantes aos achados de outras coortes de pacientes com doença agressiva da Austrália, Finlândia, Estados Unidos, Reino Unido, Suécia e Sul África (PRITCHARD ET.AL., 2016, DARST ET.AL., 2021; GHEYBI ET.AL., 2023). A frequência de VGPs nessas coortes variou de 14,2 a 17,7% em homens de ascendência europeia e homens negros sul-africana, respectivamente (DARST ET.AL., 2021; GHEYBI ET.AL., 2023). Em contraste, em pacientes com doença localizada, uma proporção menor de portadores de VGP, 4,6% a 6%, foi relatada em pacientes israelenses e descendentes de europeus brancos (PRITCHARD ET. AL., 2016; SIEGELMANN-DANIELI ET AL., 2023).

Nesta coorte, não foi observada uma frequência considerável de variantes de *BRCA2*, em contraste com coortes anteriores, nas quais as prevalências variaram de 1,5 a 5,4% (DARST ET. AL.,2021, SIEGELMANN-DANIELI ET. AL., 2023; PRITCHARD ET AL., 2016, NICOLOSI ET.AL, 2019). Entretanto, estas coortes incluíam principalmente descendentes europeus brancos e judeus Ashkenazi, o que pode explicar esta diferença, uma vez que estes grupos étnicos apresentam uma maior prevalência de VGPs em *BRCA* (PRITCHARD ET. AL., 2016, NICOLOSI ET.AL., 2019; DARST ET.AL., 2021).

A variante *BRCA2* c.8351G>A, detectada em um paciente, foi relatada previamente em pacientes com câncer de próstata (KOTE-JARAI ET.AL., 2011), mama e ovário (FERNANDES ET.AL., 2016; MAISTRO, 2016; SOLANO ET. AL., 2021, MAZZONETTO ET AL., 2022), incluindo pacientes do Brasil (FERNANDES

ET.AL., 2016; MAISTRO, 2016; MAZZONETTO ET AL., 2022). Diferentes ensaios funcionais demonstraram que a proteína alterada p.Arg2487Gln prejudica a atividade de recombinação homóloga do BRCA2. A variante também conferiu sensibilidade aos compostos de platina e resposta aos inibidores de PARP. Todas essas evidências corroboram com a patogenicidade desta variante (MESMAN ET. AL., 2019, HART ET. AL., 2019).

O único gene alterado em dois pacientes diferentes foi ATM, o qual está entre os genes mais afetados em pacientes com câncer de próstata com prevalência de 0,7% (SIEGELMANN-DANIELI ET. AL., 2023) A 2,03% em diferentes estudos (NICOLOSI ET. AL., 2019; DARST ET. AL., 2021; PRITCHARD ET. AL. 2016).

ATM é um gene de moderada a alta penetrância para o desenvolvimento de câncer de próstata, aumentando o risco em aproximadamente 3 vezes (OR 2.58, 95% CI 1.93–3.44) (HALL ET. AL., 2021). Os dois pacientes portadores de VGP em ATM, em nosso estudo, apresentaram doença de início precoce (60 e 62 anos), em concordância com dados anteriores (KARLSSON ET.AL. 2021).

Ambas as variantes foram previamente detectadas em indivíduos portugueses com câncer de próstata familiar (PAULO ET. AL., 2023), e *ATM* c.8264_8268del (p.Tyr2755fs) também foi detectada em um paciente de um estudo realizado na Ilha da Madeira, que relatou nacionalidade/etnia brasileira (MIGUEL ET.AL., 2021).

O gene *CHEK2* é um supressor tumoral, que atua na identificação de dano ao DNA, mediante sinalização de ATM, com posterior ativação da via de reparo e de parada de ciclo (MATSUOKA ET. AL., 2000). Cerca de 2% dos indivíduos com câncer de próstata metastático ao diagnóstico apresentam variantes patogênicas em *CHEK2* (PRITCHARD ET AL., 2016). A primeira associação de *CHEK2* e o risco aumentado para câncer de próstata provém da identificação de 4,8% de variantes em pacientes com câncer de próstata, versus controles não afetados (DONG ET.AL., 2003). A variante *CHEK2* c.470T>C, identificada no estudo, é uma mutação fundadora para o câncer de próstata de origem europeia com odds ratio de 1,8 (95% CI = 1.51-2.14, p= 0.00) (SEPPÄLÄ ET. AL., 2003; CYBULSKI ET. AL., 2004; BELL ET AL., 2007; WANG ET, AL., 2015). Devido a sua presença em 5 a 5,4% de indivíduos saudáveis, a variante *CHEK2* c.470T>C é identificada em nosso paciente é uma mutação fundadora de origem europeia com prevalência elevada mesmo entre a população não afetada, portanto, considerada uma variante de baixa penetração para risco de câncer de próstata (SEPPÄLÄ ET. AL., 2003; CYBULSKI ET. AL., 2004; BELL ET AL.,

2007). O paciente afetado também possuía um VGP em FANCA (uma grande deleção dos exons 1 a 6). Variantes do FANCA estão associadas ao aumento do risco de câncer de próstata em diferentes coortes (PRICHARD ET. AL., 2016, GIRI ET.AL., 2022). Dois pacientes abrigando simultaneamente variantes somáticas em FANCA e CHEK2 foram relatados anteriormente, no entanto, o único que respondeu à inibição de PARP foi aquele que também apresentou uma variante somática patogênica em BRCA2 [39].ância para câncer de próstata (SEPPÄLÄ ET. AL., 2003; CYBULSKI ET. AL., 2004).

Dois pacientes apresentaram variantes nos genes de reparo de incompatibilidade: MSH6 e PMS2. A variante MSH6 c.892C> T foi uma das primeiras variantes a ser associada ao risco de câncer de próstata em portadores de VGPs em genes de reparo de incompatibilidade (ROSTY ET.AL., 2014). Os VGPs em PMS2 foram previamente detectados em pacientes com câncer de próstata, e o PMS2 c.137G> T foi identificado como a variante mais comum em 61 famílias portadoras de VGPs no PMS2 (PANDEY, RANGARAJAN, AND ZAKALIK, 2022). Além disso, foi observada uma frequência diferencial de variantes de PMS2 em pacientes com câncer de próstata em relação à ancestralidade; com maior frequência de variantes de PMS2 em afro-americanos em relação aos homens com câncer de próstata de ascendência europeia (KOHAAR ET. AL., 2021).

Não há evidências bem estabelecidas, que relacionem os demais genes identificados entre os portadores de VGPs (CaSR, DICER1, ERCC2, RINT1 e XPC) com uma susceptibilidade elevada ao câncer da próstata.

O gene CaSR (receptor sensível ao cálcio) codifica um receptor transmembrana, amplamente expresso no tecido da próstata, que regula a homeostase do cálcio através do hormônio da paratireóide. Não há evidências de que alterações no CaSR elevem o risco de desenvolvimento de câncer de próstata, porém, a expressão do gene CaSR tem sido associada a papel oncogênico de progressão letal e desenvolvimento de metástases em tumores de câncer de próstata (FENG ET. AL., 2014; AHEARN ET. AL., 2016, TENNAKOON ET. AL., 2016; SILVESTRI ET. AL., 2023). Em dados provenientes do banco de dados COSMIC, variantes somáticas no CaSR estão presentes em 3,75% das amostras de câncer de próstata, incluindo a variante missense CaSR c.658C>T detectada em nossa coorte, que é relatada em dois pacientes com diagnóstico de melanoma e carcinoma espinocelular da boca. A

VGP detectada também foi reportada anteriormente como deletéria em pacientes com hipercalcemia e hiperparatireoidismo (SCHWARZ ET.AL., 2000; FESTEN-SPANJER ET. AL., 2007; HANNAN ET AL. 2012), mas esta condição não foi observada em nosso paciente.

DICER1 codifica uma endorribonuclease com papel na produção de microRNA (ZHANG ET.AL., 2004). A síndrome de predisposição de *DICER1* eleva o risco de um amplo espectro de tumores, tais como, blastoma pleuropulmonar (PPB), cistos pulmonares, neoplasia da glândula tireóide, tumores ovarianos, nefroma cístico e sarcomas, mas não abrange câncer de próstata (SLADE ET.AL., 2011; GONZÁLEZ ET AL., 2022). Uma análise robusta das variantes da linhagem germinativa de *DICER1* na coorte TCGA, incluiu 440 pacientes com câncer de próstata, e não identificou nenhum VGP *DICER1* (KIM ET. AL., 2019). Além disso, numa coorte de 102 portadores não probando de *DICER1* VGP, houve um excesso não significativo de tumores de cancro da próstata (STEWART ET AL., 2019), e os dados não permitem uma associação com o risco de predisposição ao câncer de próstata (KIM ET AL, 2019; STEWART ET. AL 2019). Além disso, mesmo os portadores de VGP já associados à síndrome de predisposição *DICER1* apresentam um risco modesto de desenvolver tumores (SLADE ET.AL. 2011). A variante *DICER1* c.757dup transportada por nosso paciente foi relatada anteriormente em Clinvar em um indivíduo com síndrome *DICER1*. Não há registros da variante na base de dados COSMIC (COSMIC,<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic> (Dec. 20, 2023)).

O splicing acceptor *XPC* c.2251-1G> C foi relatado anteriormente em dois pacientes sul-africanos com câncer de mama de ascendência africana, mas não foi associado ao aumento do risco de câncer de mama (EYGELAAR, VAN RENSBURG, & JOUBERT, 2022). Esta é uma antiga mutação fundadora da África Centro-Oeste associada ao Xeroderma Pigmentoso que também foi detectada em homozigose na população brasileira com diagnóstico da doença (CASTRO ET. AL., 2012; SARASIN A, MUNIER P, CARTAULT, 2019). Outras variantes patogênicas no *XPC* também foram identificadas em pacientes com câncer de próstata (DARST ET.AL., 2021). Além disso, a associação de diferentes polimorfismos de *XPC* com a suscetibilidade ao câncer de próstata (PC) foi testada em diferentes populações, e o polimorfismo de *XPC* mais investigado, Lys939Gln, não foi associado à suscetibilidade ao PC (HIRATA ET. AL., 2007, WU ET. AL., 2015), enquanto o polimorfismo *XPC*-PAT foi associado

ao aumento do risco de cancro da próstata em pessoas tunisinas, chinesas e indianas (LIU ET. AL., 2012, MANDAL ET AL.2012, SAID ET.AL., 2019). Além disso, o gene XPC apresenta mutações somáticas em 6% das amostras de tumores de próstata testadas no banco de dados COSMIC, porém a variante detectada em nossa coorte não foi representada.

Variantes em *ERCC2* foram previamente detectadas em pacientes com câncer de próstata agressivos e não agressivos, incluindo a variante frameshift identificada (DARST ET. AL., 2021). A variante frameshift *ERCC2* c.1703_1704del foi relatada em pacientes com câncer de mama e codifica uma proteína que prejudica a atividade de NER (RUMP ET.AL., 2016). Esta variante também foi detectada em duas amostras de tumores, uma de cancro da mama e uma de sarcoma de Ewing, na base de dados COSMIC.

RINT1 (interator RAD50 1) codifica uma proteína que interage com a proteína Rad50 e tem um papel na progressão do ciclo celular no ponto de verificação G2/M, em resposta a danos no DNA (XIAO ET. AL., 2001). Estudos funcionais com variantes do *RINT1* mostraram atividade supressora de tumor (LIN ET. AL., 2007). Além disso, variantes em *RINT1* foram relatadas em famílias com câncer de mama hereditário inexplicável (PARK ET. AL., 2014; SHAHI ET. AL, 2019) e famílias com tumores do espectro da Síndrome de Lynch, mas sem variantes em genes de reparo de incompatibilidade (PARK ET. AL., 2014). A variante nonsense detectada em nosso paciente (*RINT1* c.1603 C> T) também foi relatada em uma amostra de carcinoma de bexiga e uma de câncer de pulmão de células escamosas, no banco de dados COSMIC (COSMIC,<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic> (Dec. 20, 2023)).

As frequências de portadores de VGP não diferiram significativamente em função da idade ao diagnóstico, história familiar de câncer, metástase à distância (de novo) ou escore de Gleason. Entre os pacientes que relataram histórico familiar de algum tipo de câncer, 15,8% eram portadores de VGP. Em contraste, um estudo anterior identificou 7,3% de portadores de VGP entre pacientes com câncer de próstata que relataram histórico familiar de câncer de próstata em 3 parentes próximos (LEONGAMORNLETT ET.AL., 2014). Em vez disso, no presente trabalho, consideramos pacientes que relataram histórico familiar de câncer, independentemente do tipo de câncer ou do número de familiares afetados.

Observamos uma elevada taxa de portadores de VSI (71%). Em pacientes brasileiras com câncer de mama, a taxa de VSI também foi elevada (46,1%)

(GUINDALINI ET.AL., 2022). Essa elevada taxa de VSI pode ser parcialmente devida à sub-representação da população brasileira nos estudos de sequenciamento, combinada com um painel mais abrangente de genes analisados no presente trabalho. A taxa de VSI em homens brancos de ascendência europeia variou de 16 a 37%, dependendo do número de genes analisados, mas permanece menor do que a taxa de VSI germinativa em homens europeus não-brancos, ao estratificar pacientes com PC por ascendência: africanos de 37 a 55,3%; 33% nos habitantes das ilhas do Pacífico Asiático e 21,5% nos homens hispânicos (GIRI ET.AL., 2019; LEDET ET.AL., 2021; KWON ET. AL., 2015).

Na presente coorte, não houve diferenças na sobrevida global entre portadores e não portadores de VGP em todos os genes e nos genes de reparo de DNA. Estas descobertas contrastam com dados anteriores que mostraram portadores de pelo menos uma variante patogênica em genes de reparação de ADN como mais significativamente associados a cânceres da próstata letais (PLYM ET. AL., 2022). Apesar disso, os genes afetados mais associados à doença agressiva foram BRCA2 e PALB2, o primeiro, detectado em apenas um paciente e o segundo, ausente nesta coorte (DARST ET AL., 2021).

Nosso estudo tem algumas limitações. No Brasil, cerca de dois terços da população utiliza o sistema público de saúde que, até o momento, não oferece aconselhamento e testes genéticos. Realizamos uma pesquisa unicêntrica no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, vinculado ao Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, que é o maior complexo de saúde pública da América Latina HC-ICESP (<https://icesp.org.br/>). Apesar disso, acreditamos que tivemos uma boa representatividade do povo brasileiro, pois a maioria dos pacientes nasceu nas regiões Sudeste e Nordeste, as mais populosas do país, segundo o último censo demográfico brasileiro (CENSO-IBGE, 2022). Em estudos anteriores analisando cânceres hereditários de ovário e gástrico, tivemos um cenário semelhante, onde 50% e 30-40% dos pacientes relataram ter nascido nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, respectivamente (MAISTRO ET.AL.,2016; GUINDALINI ET.AL., 2019). Além disso, analisamos uma pequena coorte de pacientes, principalmente com doença agressiva. Entretanto, no Brasil, a maioria dos estudos avaliou o perfil de mutações germinativas no câncer de mama, com menor atenção dada ao câncer de próstata. Dados recentes do estudo PROSPECT sobre o perfil genético de pacientes com câncer de próstata resistente à castração metastático da América Latina, incluindo 35

homens brasileiros, detectaram 20% de portadores de VGP em habitantes da região Sul, que abriga indivíduos principalmente de ascendência europeia (KOOP ET AL., 2023). Outro estudo incluiu 15 pacientes com câncer de próstata em uma coorte apresentando principalmente câncer de mama; no entanto, não houve resultados genéticos específicos para o primeiro tipo de tumor. Além disso, a origem étnica autodeclarada pelos pacientes era em sua maioria desconhecida. No presente trabalho, caracterizamos a coorte de pacientes por meio de um questionário avaliando local de nascimento e características étnicas autorreferidas, que podem estar relacionadas à ascendência genética, uma vez que já observamos anteriormente associação entre cor da pele autodeclarada (branca, parda, amarelo e preto) com estimativas genéticas de ancestralidade, utilizando marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) de polimorfismos de pequena inserção-deleção (INDEL), em um estudo que avaliou 192 pacientes com câncer de pâncreas incluídos na mesma instituição (ICESP) (Rodrigues et.al, Dados não publicados). Portanto, acreditamos que tínhamos uma coorte constituída principalmente por homens mestiços.

Os pontos fortes de nosso estudo são a caracterização de cada paciente quanto à história familiar de câncer, estadiamento do tumor e origem étnica. Nossa coorte é predominantemente composta por homens autodeclarados como miscigenados, com câncer de próstata agressivo, avaliados através de um painel abrangente de genes de predisposição ao câncer.

7. CONCLUSÃO

No presente estudo, investigou-se uma coorte de pacientes brasileiros miscigenados com câncer de próstata, enriquecida para doença agressiva. Dezesseis por cento dos pacientes eram carreadores de variantes patogênicas/provavelmente patogênicas, em sua maioria em genes de reparo de DNA. Identificaram-se VGP em genes classicamente associados ao risco de câncer de próstata, e novos candidatos. Tais achados enfatizam a importância da realização de estudos futuros para melhor avaliar a contribuição genética para o desenvolvimento do câncer de próstata.

8. REFERÊNCIAS

ABRaOn: <https://abraom.ib.usp.br/>

Ahearn, T. U., Tchakian, N., Wilson, K. M. et. al. Calcium-Sensing Receptor Tumor Expression and Lethal Prostate Cancer Progression. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2016, 101(6), 2520–2527.

Amin MB, Greene FL, Edge SB, et.al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):93-99. doi: 10.3322/caac.21388. Epub 2017 Jan 17. PMID: 28094848.

Bell DW, Kim SH, Godwin AK, et.al. Genetic and functional analysis of CHEK2 (CHK2) variants in multiethnic cohorts. *Int J Cancer*. 2007,121(12):2661-2667.

Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Aug 4;91(15):1310-6. doi: 10.1093/jnci/91.15.1310. PMID: 10433620.

Breyer JP, Avritt TG, McReynolds KM, et.al. Confirmation of the HOXB13 G84E germline mutation in familial prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Aug;21(8):1348-53. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0495. Epub 2012 Jun 19. PMID: 22714738; PMCID: PMC3415588.

Castro E, Eeles R. The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2012, 14(3):409-14.

Cheng HH, Sokolova AO, Schaeffer et. al. Germline and Somatic Mutations in Prostate Cancer for the Clinician. *J Natl Compr Canc Netw*. 2019 May 1;17(5):515-521. doi: 10.6004/jnccn.2019.7307. PMID: 31085765.

COSMIC, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic> (Dec. 20, 2023)

Cybulski C, Huzarski T, Górski B, et. al. A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res*. 2004, 64(8):2677-9.

da Silva FC, de Oliveira LP, Santos EM, et al. Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. *Fam Cancer*. 2010 Dec;9(4):563-70. doi: 10.1007/s10689-010-9373-2. PMID: 20697958.

Darst BF, Dadaev T, Saunders E, et al. Germline Sequencing DNA Repair Genes in 5545 Men With Aggressive and Nonaggressive Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2021, 113(5):616-625.

Darst BF, Hughley R, Pfennig A et. al. A Rare Germline HOXB13 Variant Contributes to Risk of Prostate Cancer in Men of African Ancestry, *European Urology*, Volume 81, Issue 5, 2022, Pages 458-462, ISSN 0302-2838, <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.12.023>.

de Oliveira JM, Zurro NB, Coelho AVC, et al. The genetics of hereditary cancer risk syndromes in Brazil: a comprehensive analysis of 1682 patients. *Eur J Hum Genet*. 2022 Jul;30(7):818-823. doi: 10.1038/s41431-022-01098-7. Epub 2022 May 9. PMID: 35534704; PMCID: PMC9259741.

Dominguez-Valentin, M., Joost, P., Therkildsen, C. et al. Frequent mismatch-repair defects link prostate cancer to Lynch syndrome. *BMC Urol* 16, 15 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12894-016-0130-1>

Dong X, Wang L, Taniguchi K, et.al. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet*. 2003 Feb;72(2):270-80. doi: 10.1086/346094. Epub 2003 Jan 17. PMID: 12533788; PMCID: PMC379222.

Easton DF, Steele L, Fields P, Ormistin W, Averill D, Daly PA, et al. Cancer risks in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12–13. *Am J Hum Genet* 1997;61:120–8.

Eeles R, Goh C, Castro E, et al. The genetic epidemiology of prostate cancer and its clinical implications. *Nat Rev Urol*. 2014, 11(1):18-31.

Ewing CM, Ray AM, Lange EM, et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. *N Engl J Med*. 2012, 366(2):141-149.

Eygelaar D, van Rensburg EJ, Joubert F. Germline sequence variants contributing to cancer susceptibility in South African breast cancer patients of African ancestry. *Sci Rep*. 2022 Jan 17;12(1):802. doi: 10.1038/s41598-022-04791-1. PMID: 35039564; PMCID: PMC8763903.

Feng, J., Xu, X., Li, B., et al. Prostate cancer metastatic to bone has higher expression of the calcium-sensing receptor (CaSR) than primary prostate cancer. *Receptors Clin Investig*. 2014;1(6):e270.

Fernandes GC, Michelli RA, Galvão HC, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget*. 2016, 7(49):80465-80481.

Festen-Spanjer B, Haring CM, Koster JB, Mudde AH. Correction of hypercalcaemia by cinacalcet in familial hypocalciuric hypercalcaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008, 68(2):324-325.

Gheybi K, Jiang J, Mutambirwa SB, et al. Evaluating Germline Testing Panels in Southern African Males With Advanced Prostate Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2023;21(3):289-296.e3.

Giri VN, Hegarty SE, Hyatt C, et. Al. Germline genetic testing for inherited prostate cancer in practice: Implications for genetic testing, precision therapy, and cascade testing. *Prostate*. 2019, 79(4):333-339.

GNOMAD link <https://gnomad.broadinstitute.org/>

González IA, Stewart DR, Schultz KAP, et al. DICER1 tumor predisposition syndrome: an evolving story initiated with the pleuropulmonary blastoma. *Mod Pathol*. 2022, 35(1):4-22.

Grindedal EM, Møller P, Eeles R, et. al. Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Sep;18(9):2460-7. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0058. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19723918.

Guindalini RSC, Cormedi MCV, Maistro S, et al. Frequency of CDH1 germline variants and contribution of dietary habits in early age onset gastric cancer patients in Brazil. *Gastric Cancer*. 2019;22(5):920-931. doi:10.1007/s10120-019-00945-9

Guindalini RSC, Viana DV, Kitajima JPFW, et al. Detection of germline variants in Brazilian breast cancer patients using multigene panel testing. *Sci Rep*. 2022 Mar 9;12(1):4190.

Hall, M. J., Bernhisel, R., Hughes, et al. (2021). Germline Pathogenic Variants in the Ataxia Telangiectasia Mutated (*ATM*) Gene are Associated with High and Moderate Risks for Multiple Cancers. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 14(4), 433–440. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-20-0448>

Hannan FM, Nesbit MA, Zhang C, et al. Identification of 70 calcium-sensing receptor mutations in hyper- and hypo-calcaemic patients: evidence for clustering of extracellular domain mutations at calcium-binding sites. *Hum Mol Genet*. 2012, 21(12):2768-2778.

Hart, S. N., Hoskin, T., Shimelis, H., et. al.. Comprehensive annotation of BRCA1 and BRCA2 missense variants by functionally validated sequence-based computational prediction models. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*.2019, 21(1), 71–80.

HC-ICESP. <https://icesp.org.br/>

Hirata H, Hinoda Y, Tanaka Y, et al. Polymorphisms of DNA repair genes are risk factors for prostate cancer. *Eur J Cancer*. 2007, 43(2):231-237.

Hjelmborg JB, Scheike T, Holst K, et al. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014 Nov;23(11):2303-10. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0568. Epub 2014 May 8. PMID: 24812039; PMCID: PMC4221420.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019.

Humphrey PA, Moch H, Cubilla AL, et al.. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. *Eur Urol.* 2016 Jul;70(1):106-119. doi: 10.1016/j.eururo.2016.02.028. Epub 2016 Mar 17. PMID: 26996659.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Demográfico 2022: População e domicílios- Primeiros resultados. Rio de Janeiro, 2023.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro : INCA, 2022

Ittmann M. (2018). Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(5), a030346. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030346>

John E. Niederhuber, James O, et al. *Abeloff's Clinical Oncology*. 6th Edition - January 8, 2019

Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2005 Sep;5(9):689-98. doi: 10.1038/nrc1691. PMID: 16110319.

Karlsson Q, Brook MN, Dadaev T, et al. Rare Germline Variants in ATM Predispose to Prostate Cancer: A PRACTICAL Consortium Study. *Eur Urol Oncol.* 2021,4(4):570-579.

Kim, J, Schultz, KAP, Hill, DA, Stewart, DR. The prevalence of germline *DICER1* pathogenic variation in cancer populations. *Mol Genet Genomic Med.* 2019; 7:e555.

Klein EA. Prostate cancer: Risk stratification and choice of initial treatment. In Savarese DMF, ed. *UpToDate*. Waltham, Mass.: UpToDate, 2021. <https://www.uptodate.com>. Last updated May 7, 2021. Accessed August 30, 2021. NCCN. v4-2023

Kohaar I, Zhang X, Tan SH, et al. Germline mutation landscape of DNA damage repair genes in African Americans with prostate cancer highlights potentially targetable RAD genes. *Nat Commun.* 2022, 13(1):1361.

Kopp RM, Verson CA, Angel M, et al. Prevalence of HRR gene mutations in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: Germline results from the Latin-American observational study PROSPECT. *Journal of Clinical Oncology.* 2023, 41:6_suppl, 226

Kote-Jarai Z, Leongamornlert D, Saunders E, et al. BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: implications for genetic testing in prostate cancer patients. *Br J Cancer.* 2011, 105(8):1230-1234.

Kurihara S, Matsui H, Ohtake N, et al. Variants in *HOXB13*, G132E and F127C, Are Associated With Prostate Cancer Risk in Japanese Men. *Cancer Diagn Progn.* 2022 Sep 3;2(5):542-548. doi: 10.21873/cdp.10139. PMID: 36060024; PMCID: PMC9425588.

Kwon, D. H., Borno, H. T., Cheng, H. H et al. Ethnic disparities among men with prostate cancer undergoing germline testing. *Urologic oncology*, 2020, 38(3), 80.e1–80.e7

Labidi-Galy SI, Olivier T, Rodrigues M, et al. Location of Mutation in *BRCA2* Gene and Survival in Patients with Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res.* 2018 Jan 15;24(2):326-333. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2136. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29084914.

Lang SH, Swift SL, White H, Misso K, Kleijnen J, Quek RGW. A systematic review of the prevalence of DNA damage response gene mutations in prostate cancer. *Int J Oncol.* 2019 Sep;55(3):597-616. doi: 10.3892/ijo.2019.4842. Epub 2019 Jul 16. PMID: 31322208; PMCID: PMC6685596.

Ledet EM, Burgess EF, Sokolova AO, et al. Comparison of germline mutations in African American and Caucasian men with metastatic prostate cancer. *Prostate.* 2021, 81(7):433-439.

Leongamornlert D, Mahmud N, Tymrakiewicz M, et al. Germline BRCA1 mutations increase prostate cancer risk. *Br J Cancer.* 2012 May 8;106(10):1697-701. doi: 10.1038/bjc.2012.146. PMID: 22516946; PMCID: PMC3349179.

Leongamornlert, D, Saunders, E, Dadaev, T, et al. Frequent germline deleterious mutations in DNA repair genes in familial prostate cancer cases are associated with advanced disease. *British journal of cancer.* 2014, 110(6), 1663–1672.

Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000, 343(2):78-85.

Lin X, Qu L, Chen Z, et al. A novel germline mutation in HOXB13 is associated with prostate cancer risk in Chinese men. *Prostate*. 2013;73(2):169-175. doi:10.1002/pros.22552

Lin, X, Liu, CC, Gao, et al. RINT-1 serves as a tumor suppressor and maintains Golgi dynamics and centrosome integrity for cell survival. *Molecular and cellular biology*, 2007, 27(13), 4905–4916.

Liu X, Takata S, Ashikawa K, et al. Prevalence and Spectrum of Pathogenic Germline Variants in Japanese Patients With Early-Onset Colorectal, Breast, and Prostate Cancer. *JCO Precis Oncol*. 2020 Nov;4:183-191. doi: 10.1200/PO.19.00224. PMID: 35050733.

Liu Y, Chen Z, Wei Q, et al. Poly (AT) polymorphism in the XPC gene and smoking enhance the risk of prostate cancer in a low-risk Chinese population. *Cancer Genet*. 2012, 205(5):205-211.

Maistro S, Teixeira N, Encinas G, et al. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. *BMC Cancer*. 2016,16(1):934.

Mandal RK, Gangwar R, Kapoor R, et al. Polymorphisms in base-excision & nucleotide-excision repair genes & prostate cancer risk in north Indian population. *Indian J Med Res*. 2012,135(1):64-71.

Marlin R, Créoff M, Merle S, et al. Mutation HOXB13 c.853delT in Martinican prostate cancer patients. *Prostate*. 2020;80(6):463-470. doi:10.1002/pros.23960

Mateo J, Carreira S, Sandhu S, et al. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2015,373(18):1697-708.

Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, et al. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10389-94. doi: 10.1073/pnas.190030497. PMID: 10973490; PMCID: PMC27034.

Maxwell KN, Cheng HH, Powers J, et al. Inherited TP53 Variants and Risk of Prostate Cancer. *Eur Urol*. 2022 Mar;81(3):243-250. doi: 10.1016/j.eururo.2021.10.036. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34863587; PMCID: PMC8891030.

Mazzonetto P, Milanezi F, D'Andrea M, et al. BRCA1 and BRCA2 germline mutation analysis from a cohort of 1267 patients at high risk for breast cancer in Brazil. *Breast Cancer Res Treat*. 2023, 199(1):127-136.

Mesman RLS, Calléja FMGR, Hendriks G, et al. The functional impact of variants of uncertain significance in BRCA2. *Genet Med*. 2019, 21(2):293-302.

Miguel I, Rodrigues F, Fragoso S, et al. Hereditary breast cancer and ancestry in the Madeira archipelago: an exploratory study. *Ecancermedicalscience*. 2021,15:1261.

Momozawa Y, Iwasaki Y, Hirata M, et al. Germline Pathogenic Variants in 7636 Japanese Patients With Prostate Cancer and 12 366 Controls. *J Natl Cancer Inst*. 2020,112(4):369-376.

Mucci LA, Hjelmborg JB, Harris JR, et al. Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries [published correction appears in *JAMA*. 2016, 23;315(8):822]. *JAMA*. 2016;315(1):68-76.

Na R, Wei J, Sample CJ, Gielzak M, et al. The HOXB13 variant X285K is associated with clinical significance and early age at diagnosis in African American prostate cancer patients. *Br J Cancer*. 2022, 126(5):791-796.

NCCN guideline version 2.2023 Prostate cancer early detection, www.nccn.org/guidelines/ access Dec 8, 2023

Nicolosi P, Ledet E, Yang S, et al. Prevalence of Germline Variants in Prostate Cancer and Implications for Current Genetic Testing Guidelines. *JAMA Oncol*. 2019,5(4):523-528.

Nyberg T, Frost D, Barrowdale D, et al. Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. *Eur Urol*. 2020 Jan;77(1):24-35. doi: 10.1016/j.eururo.2019.08.025. Epub 2019 Sep 6. PMID: 31495749; PMCID: PMC6926480.

Pandey S, Rangarajan T, and Zakalik D Clinical characteristics of patients with *PMS2* mutations. *Journal of Clinical Oncology*. 2022, 40:16_suppl, 10610

Park, DJ, Tao, K, Le Calvez-Kelm, F, et al. Rare mutations in RINT1 predispose carriers to breast and Lynch syndrome-spectrum cancers. *Cancer discovery*. 2014, 4(7):804–815.

Paulo P, Cardoso M, Brandão A, et al. Genetic landscape of homologous recombination repair genes in early-onset/familial prostate cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2023 Dec;62(12):710-720. doi: 10.1002/gcc.23190. Epub 2023 Jul 12. PMID: 37436117.

Pilie, PG, Giri, VN, Cooney, KA. HOXB13 and other high penetrant genes for prostate cancer. *Asian J Androl*. 18(4):530-32, 2016.

Plym, A., Dióssy, M., Szallasi, Z. et al. DNA Repair Pathways and Their Association With Lethal Prostate Cancer in African American and European American Men, *JNCI Cancer Spectrum*, 2022, 6(1):pkab097.

Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, et al. Inherited DNA-Repair Gene Mutations in Men with Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2016, 375(5):443-453.

Pritchard, C. C., Morrissey, C., Kumar, A., et al. (2014). Complex MSH2 and MSH6 mutations in hypermutated microsatellite unstable advanced prostate cancer. *Nature communications*, 5, 4988. <https://doi.org/10.1038/ncomms5988>

Raymond VM, Mukherjee B, Wang F, et al. Elevated risk of prostate cancer among men with Lynch syndrome. *J Clin Oncol*. 2013 May 10;31(14):1713-8. doi: 10.1200/JCO.2012.44.1238. Epub 2013 Mar 25. PMID: 23530095; PMCID: PMC3641694.

Rebello, R.J., Oing, C., Knudsen, K.E. et al. Prostate cancer. *Nat Rev Dis Primers* 7, 9 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>

Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015, 17(5):405-424.

Robinson D, Van Allen EM, Wu YM, et al. Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*. 2015,161(5):1215-1228. Erratum in: *Cell*. 2015,162(2):454.

Rosty C, Walsh MD, Lindor NM, et al. High prevalence of mismatch repair deficiency in prostate cancers diagnosed in mismatch repair gene mutation carriers from the colon cancer family registry. *Fam Cancer*. 2014, 13(4):573-582.

Rump, A, Benet-Pages, A, Schubert, S, et al. Identification and Functional Testing of ERCC2 Mutations in a Multi-national Cohort of Patients with Familial Breast- and Ovarian Cancer. *PLoS genetics*. 2016, 12(8); e1006248

Said R, Bougatef K, Setti Boubaker N, et al. Polymorphisms in XPC gene and risk for prostate cancer. *Mol Biol Rep*. 2019, 46(1):1117-1125.

Sarasin A, Munier P, Cartault F. How history and geography may explain the distribution in the Comorian archipelago of a novel mutation in DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Genet Mol Biol*. 2019, 13;43(1 suppl 1):e20190046.

Schwarz P, Larsen NE, Lønborg Friis IM, et al. Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism associated with mutations in the human Ca²⁺-sensing receptor gene in three Danish families. *Scand J Clin Lab Invest*. 2000, 60(3):221-227.

Seppälä EH, Ikonen T, Mononen N, et al. CHEK2 variants are associated with hereditary prostate cancer. *Br J Cancer*. 2003, 89(10):1966-1970.

Shahi RB, De Brakeleer S, Caljon B, et al. Identification of candidate cancer predisposing variants by performing whole-exome sequencing on index patients from BRCA1 and BRCA2-negative breast cancer families. *BMC Cancer*. 2019,19(1):313.

Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin*. 2023 Jan;73(1):17-48. doi: 10.3322/caac.21763. PMID: 36633525.

Siegelmann-Danieli N, Neiman V, Bareket-Samish A, et al. Whole exome germline sequencing in early-onset prostate cancer patients: Genomic findings and clinical outcomes. *Prostate*. 2024, 84(1):39-46.

Silvestri, R, Nicolì, V, Gangadharannambiar, P. et al. Calcium signalling pathways in prostate cancer initiation and progression. *Nat Rev Urol*. 2023, 20, 524–543.

Slade I, Bacchelli C, Davies H, et al. DICER1 syndrome: clarifying the diagnosis, clinical features and management implications of a pleiotropic tumour predisposition syndrome. *J Med Genet*. 2011, 48(4):273- 278.

Solano AR, Mele PG, Jalil FS, et al. Study of the Genetic Variants in *BRCA1/2* and Non-*BRCA* Genes in a Population-Based Cohort of 2155 Breast/Ovary Cancer Patients, Including 443 Triple-Negative Breast Cancer Patients, in Argentina. *Cancers (Basel)*. 2021,13(11):2711.

Song, S. H., Kim, H. M., Jung, Y. J., et al. (2023). Germline DNA-Repair Genes and HOXB13 Mutations in Korean Men with Metastatic Prostate Cancer: Data from a Large Korean Cohort. *The world journal of men's health*, 41(4), 960–968. <https://doi.org/10.5534/wjmh.220190>

Soravia, C., van der Klift, H., Brundler, et al. (2003). Prostate cancer is part of the hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) tumor spectrum. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 121A(2), 159-162. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20106>.

Souza AM de, Resende SS, Sousa TN de, et al. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet Mol Biol*. 2019, 42(3):495–508.

Stewart DR, Best AF, Williams GM, et al. Neoplasm Risk Among Individuals With a Pathogenic Germline Variant in DICER1. *J Clin Oncol*. 2019, 37(8):668-676.

Stormorken AT, Müller W, Lindblom A, et al. The inframe MSH2 codon 596 deletion is linked with HNPCC and associated with lack of MSH2 protein in tumours. *Fam Cancer*. 2003;2(1):9-13. doi: 10.1023/a:1023362205205. PMID: 14574162.

Struewing JP, Brody LC, Erdos MR, et al. Detection of eight BRCA1 mutations in 10 breast/ovarian cancer families, including 1 family with male breast cancer. *Am J Hum Genet.* 1995 Jul;57(1):1-7. PMID: 7611277; PMCID: PMC1801253.

Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021; 71: 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Tennakoon, S., Aggarwal, A., Kállay, E. The calcium-sensing receptor and the hallmarks of cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2016, 1863 (6): 1398-1407 (Part B).

Tulinius H, Egilsson V, Olafsdottir GH, et al. Risk of prostate, ovarian and endometrial cancer among relatives of women with breast cancer. *BMJ* 1992;305:855–7

Verze, P., Cai, T. & Lorenzetti, S. The role of the prostate in male fertility, health and disease. *Nat Rev Urol* 13, 379–386 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.89>

Wang Y, Dai B, Ye D. CHEK2 mutation and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Sep 15;8(9):15708-15. PMID: 26629066; PMCID: PMC4658955.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 1995 Dec 21-28;378(6559):789-92. doi: 10.1038/378789a0. Erratum in: *Nature* 1996 Feb 22;379(6567):749. PMID: 8524414.

Wu H, Lv Z, Wang X, et al. Lack of association between XPC Lys939Gln polymorphism and prostate cancer risk: an updated meta-analysis based on 3039 cases and 3253 controls. *Int J Clin Exp Med.* 2015, 8(10):17959-17967.

Xiao J, Liu CC, Chen PL, et. al. RINT-1, a novel Rad50-interacting protein, participates in radiation-induced G(2)/M checkpoint control. *J Biol Chem.* 2001, 276(9):6105-6111.