

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Virgínia de Castilhos

Comparação da expressão gênica de *biglycan* (BGN) e S100 *calcium binding protein A4* (S100A4) entre amostras de câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna

Porto Alegre

2019

Virgínia de Castilhos

Comparação da expressão gênica de *biglycan* (BGN) e *S100 calcium binding protein A4* (S100A4) em amostras de câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia com ênfase em Bioinformática na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Gabriela Pasqualim

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Castilhos, Virgínia

Comparação da expressão gênica de biglycan (BGN) e S100 calcium binding protein A4 (S100A4) em amostras de câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna / Virgínia Castilhos. -- 2019.

39 f.

Orientador: Ilma Simoni Brum.

Coorientador: Gabriela Pasqualim.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Biotecnologia: Bioinformática, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Câncer de Próstata. 2. Hiperplasia Prostática Benigna. 3. Expressão gênica. 4. BGN. 5. S100A4. I. Brum, Ilma Simoni, orient. II. Pasqualim, Gabriela, coorient. III. Título.

Virgínia de Castilhos

COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *BIGLYCAN* (BGN) E *S100 CALCIUM BINDING PROTEIN A4* (S100A4) EM AMOSTRAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA E HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de **Bacharel(a)** em Biotecnologia.

Aprovado em: 12 de Dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gisele Branchini - UFCSPA

Nome do examinador - instituição

Dra. Lolita Schneider Pizzolato - Pós-Doutoranda Depto. Farmacologia ICBS/UFRGS

Nome do examinador - instituição

Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva Depto. Fisiologia/UFRGS

Nome do examinador - instituição (orientador)

RESUMO

Introdução: Alterações na proliferação celular do tecido prostático são muito prevalentes e afetam grande parte dos homens no Brasil e no mundo. Entre as alterações celulares da próstata mais importantes clinicamente estão a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP). Apesar de sua prevalência, as etiologias dessas doenças ainda são desconhecidas e as principais ferramentas diagnósticas aplicadas ao seu gerenciamento ainda são insatisfatórias. Assim, é de interesse da comunidade científica elucidar o notoriamente heterogêneo perfil molecular do CaP e também da HPB.

Métodos: A expressão gênica de BGN e S100A4 foi quantificada por RT-qPCR em 33 amostras de CaP primário e 23 amostras de HBP de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar diferenças entre os grupos e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados: Para o gene BGN infelizmente não foi possível atingir um nível de eficiência de reação comparável à reação do controle endógeno e que resultasse em dados de quantificação confiáveis. Já os níveis de expressão gênica de S100A4 foram analisados em CaP e BPH, mas não houve diferença significativa entre os grupos ($P = 0,091$).

Conclusão: Esses resultados contribuem para a caracterização do perfil molecular de doenças prostáticas.

Palavras Chave: Câncer de Próstata; Hiperplasia Prostática Benigna; Expressão gênica; BGN; S100A4.

ABSTRACT

Background: Alterations in prostatic tissue cell proliferation are very prevalent and will affect most men in Brazil and worldwide. The most clinically significant prostate cell abnormalities are benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer (PCa). Despite their prevalence, the etiologies of these diseases are still unknown and the main diagnostic tools applied to their management are still unsatisfying. Thus, it is in the interest of the scientific community to elucidate the notoriously heterogeneous molecular profile of PCa but also of BPH.

Methods: BGN and S100A4 gene expression was quantified by RT-qPCR in 33 primary PCa and 23 BPH samples obtained from patients at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Mann-Whitney test was used to compare the differences between groups and a p value <0.05 was considered statistically significant.

Results: For BGN it was unfortunately not possible to achieve a level of reaction efficiency comparable to the endogenous control that resulted in reliable quantification data. S100A4 gene expression levels were analyzed in PCa and BPH, but there was no significant difference between groups ($P = 0.091$).

Conclusion: These results contribute to the characterization of the molecular profile of prostatic diseases.

Key Words: Prostate Cancer; Benign Prostatic Hyperplasia; Gene Expression; BGN; S100A4.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	9
1.1	JUSTIFICATIVA	23
1.2	OBJETIVOS	24
2	MATERIAL E MÉTODOS	25
3	RESULTADOS	28
4	DISCUSSÃO	33
5	CONCLUSÕES	34
6	PERSPECTIVAS	35
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

Próstata

A próstata é uma glândula exócrina localizada próxima à bexiga e circundando a uretra que faz parte do trato reprodutivo masculino. Ela é composta por tecido glandular e estromal e envolta por uma pseudocápsula e é dividida em três zonas: zona central, zona de transição e zona periférica. Essas zonas têm origens embriológicas distintas e diferem também a nível anatômico, histológico, funcional e em sua suscetibilidade a diferentes quadros patológicos (TOIVANEN e SHEN, 2017).

A próstata é altamente suscetível à transformação oncogênica e as alterações na proliferação celular do tecido prostático são muito prevalentes e afetam grande parte dos homens no Brasil e no mundo. Essas doenças representam desafios significativos para os sistemas de saúde implementados e é provável que esses problemas aumentem no futuro com as mudanças demográficas previstas, levando a populações maiores de idosos em muitos países. Entre as alterações celulares da próstata mais importantes clinicamente estão a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP). Embora ambas ocorram na mesma população, tenham sintomas do trato urinário inferior e fatores de risco em comum não há evidência que sejam doenças relacionadas e podem inclusive ocorrer concomitantemente. Apesar das similaridades, essas condições prostáticas diferem notavelmente a nível de histologia e localização (ØRSTED e BOJESSEN, 2012). A grande maioria dos focos de CaP tem incidência na zona periférica (70%), uma parcela menor ocorre na zona de transição (25%) e a zona central tem uma incidência muito baixa de CaP (5%), semelhante às vesículas seminais. Já a HBP ocorre predominantemente na zona de transição (YACOUB e OTO, 2018).

Hiperplasia prostática benigna

A HPB consiste no aumento benigno do volume prostático, causado por nódulos microscópicos ou macroscópicos de hiperplasia na zona de transição prostática, a área da próstata que circunda diretamente a uretra, resultando no estreitamento uretral e em sintomas do trato urinário inferior que podem ser obstrutivos, irritativos ou mistos (ROEHRBORN,

2008). Não há relação direta entre o tamanho da próstata e a gravidade dos sintomas e quadros de HBP podem até ser assintomáticos. Entretanto, pode ser observada uma correlação entre gravidade dos sintomas e o avanço da idade e o grau histológico de inflamação prostática (EGAN, 2016). Embora a HBP possa causar morbidade e reduzir a qualidade de vida, não é uma doença letal. Apesar de sua prevalência, a etiologia exata da HBP é desconhecida. Além do aumento da idade e inflamação, os fatores de risco para o desenvolvimento da HBP incluem etnia, síndromes metabólicas como diabetes mellitus tipo 2, obesidade, fatores exógenos como nível de consumo de álcool e inatividade física, fatores genéticos hereditários e níveis hormonais (CHUGHAI et al., 2016). Como os casos de HPB diferem em idade, gravidade dos sintomas e resposta a diferentes formas de terapia, a forma de tratamento é individual para cada paciente e pode consistir em intervenção cirúrgica, farmacológica ou ambas, com acompanhamento urológico periódico (KIM, LARSON e ANDRIOLE, 2016).

Câncer de Próstata

O câncer é uma doença multifatorial caracterizada pelo crescimento descontrolado e disseminação de células anormais. Esse fenômeno biológico ocorre mediante a aquisição de capacidades biológicas específicas em estágios variados do desenvolvimento dos tumores humanos. Essas características fundamentais incluem reprogramação do metabolismo energético, evasão à destruição imunológica, sustentação da sinalização molecular proliferativa, inibição de supressores de crescimento, resistência à apoptose, imortalidade replicativa, indução de angiogênese, invasão e metástase. Esses processos foram estabelecidos na literatura científica como uma forma de racionalizar as complexidades da doença neoplásica e são favorecidos por características subjacentes como instabilidade genômica e inflamação (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

O termo Câncer de próstata indica uma neoplasia maligna da próstata. A grande maioria dessas neoplasias malignas são de origem e diferenciação epitelial e são carcinomas. Existem neoplasias malignas raras na próstata, como neoplasias mesenquimais malignas (sarcomas) e neoplasias hematolinfóides (linfomas) da próstata (LI et al., 2016), mas essas neoplasias não-epiteliais não serão discutidas neste trabalho. O termo CaP utilizado se refere a um adenocarcinoma, uma neoplasia maligna que se origina em tecido epitelial glandular, o tecido prostático.

A etiologia do CaP é complexa, multifatorial e infelizmente ainda pouco elucidada, principalmente quando comparada com cânceres em outras localizações primárias. Destaca-se que a predisposição genética no CaP é mais relevante que em outras localizações primárias (MUCCI et al., 2016) e que os hormônios andrógenos estão fortemente associados à carcinogênese prostática. Testosterona, dihidrotestosterona, androstenediol e androstenediona são exemplos de androgênios, hormônios esteroides que possuem papel fundamental no desenvolvimento, manutenção e regulação do fenótipo e fisiologia prostática. O entendimento da biossíntese, da via de sinalização molecular desses hormônios e de possíveis alterações adquiridas pelo tumor nesses processos são muito relevantes na gestão do CaP. Uma das principais características do CaP é a responsividade a variação nos níveis hormonais (DAI, HEEMERS e SHARIFI, 2017).

Outros fatores conhecidos que influenciam a emergência da neoplasia são o avanço da idade, etnia, equilíbrio de hormônios endógenos (além dos androgênios observa-se a influência de hormônios metabólicos como insulina), inflamação, obesidade e exposição a fatores exógenos como hábitos alimentares, consumo de álcool, tabagismo, fármacos, doenças sexualmente transmissíveis ou, em casos mais drásticos, produtos químicos como inseticidas e herbicidas ou radiação ionizante. O histórico familiar é uma ferramenta muito informativa no gerenciamento do CaP e pode refletir tanto fatores genéticos como ambientais. O conhecimento detalhado da epidemiologia do CaP e a avaliação dos fatores de risco podem ajudar a entender a conexão entre mutações genéticas e o papel do ambiente em desencadear essas mutações e/ou favorecer a progressão do tumor, assim como identificar homens em risco e estabelecer um protocolo mais eficaz de acompanhamento médico, triagem e prevenção (RAWLA, 2019).

Efetivamente, o CaP é caracterizado por ser heterogêneo em quase todos os aspectos, o que torna difícil a caracterização, detecção, avaliação do risco e escolha de tratamento do tumor. Entre eles heterogeneidade espacial e morfológica, o CaP pode se desenvolver em zonas prostáticas diferentes, com variação anatômica e funcional, o padrão de infiltração do tecido prostático não é uniforme e o tumor pode adquirir uma grande variedade de padrões morfológicos, que levaram ao desenvolvimento de um sistema de estadiamento que avalia dois padrões morfológicos e um sistema de amostragem aleatório mas representativo das diferentes regiões prostáticas em biópsia. Também se observa heterogeneidade na progressão clínica, na responsividade hormonal e nos níveis de agressividade tumoral. A nível molecular,

existem três principais tipos de heterogeneidade, inter-paciente (tumores de diferentes pacientes apresentam um conjunto único de alterações genéticas, apesar de similaridades entre si, ou que apresentam em geral alterações genéticas similares, mas adquiridas em ordem cronológicas diferentes), inter-tumoral (observado em casos de CaP multifocal, múltiplas regiões neoplásicas podem surgir e evoluir independentemente, dificultando o estabelecimento dos mecanismos de progressão da doença) e intra-tumoral (em um foco tumoral pode haver diferentes clones tumorais provenientes da mesma linhagem celular mas diferenciadas pela aquisição de mutações que levam a diferenças em plasticidade e diferenciação celular resultando em heterogeneidade funcional no microambiente tumoral) (TOLKACH e KRISTIANSEN, 2018).

O desenvolvimento do CaP começa através de uma neoplasia intraepitelial prostática (PIN), considerada uma lesão pré-cancerosa, e progride a adenocarcinoma localizado, seguido por adenocarcinoma invasivo e por fim adenocarcinoma metastático. A maioria dos tumores diagnosticados tem progressão lenta e indolente e estão associados a sintomas amenos. Porém, em alguns casos a progressão é rápida e agressiva, chegando ao quadro metastático e levando o paciente ao óbito. Metástase é a principal causa das mortes relacionadas ao CaP. Tecidos adjacentes ao tumor primário como vesículas seminais são as primeiras áreas a desenvolver novas lesões tumorais a partir do CaP, seguidos de metástases do fígado, pulmões e ossos (SHEN e ABATE-SHEN, 2010).

O escore de Gleason é o principal sistema de classificação histológica utilizada em CaP e é aplicado ao tecido prostático obtido por meio de ferramentas diagnósticas como biópsia e terapêuticas como cirurgia. A classificação é baseada na manutenção da arquitetura glandular e da morfologia celular prostática. As células do tumor são comparadas a células prostáticas normais sob microscópio e categorizadas quanto ao nível de diferenciação celular e ao padrão de crescimento no estroma prostático. A escala de graduação celular varia de 1 a 5, com o grau 1 sendo a forma mais similar à histologia prostática normal e 5 sendo a forma mais avançada do tumor. Na análise histopatológica do tecido prostático o patologista identifica o padrão primário (mais prevalente) e o padrão secundário (segundo mais prevalente) na escala de 1 a 5 e soma os resultados. O escore de Gleason é representado pelo resultado da soma, que pode variar de 2 a 10 e entre parênteses o grau histológico primário seguido pelo sinal “+” e pelo grau histológico secundário. Quanto mais baixo o escore de Gleason, melhor será o prognóstico do paciente, menor o risco à sobrevivência do paciente e mais

conservadora a indicação de tratamento. O resultado do escore de Gleason pode ser agrupado: Grupo 1: Gleason 6; Grupo 2: Gleason 7 (3+4); Grupo 3: Gleason 7 (4+3); Grupo 4: Gleason 8; Grupo 5: Gleason 9 e 10 (HUMPHREY, 2017).

O CaP ainda pode ser avaliado pelo Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos estabelecido pelas organizações American Joint Committee on Cancer (AJCC) e International Union Against Cancer (UICC). Esse sistema se baseia na localização anatômica e nas características patológicas da doença, levando em conta tamanho e desenvolvimento do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática da próstata (N), e a presença ou ausência de metástases a distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1. Geralmente, à medida que o tamanho do câncer primário (T) aumenta, o envolvimento regional dos linfonodos (N) e as metástases à distância (M) se tornam mais frequentes (TELLONI, 2017).

As principais opções terapêuticas para pacientes diagnosticados com CaP são terapia de privação androgênica (bloqueia os mecanismos de sinalização androgênica), intervenção cirúrgica (prostatectomia radical ou variações), radioterapia (que pode ser utilizada como ferramenta primária ou adjuvante à cirurgia) e monitoramento da progressão através de exames diagnósticos, acompanhamento médico e atenuação dos sintomas, geralmente com introdução de fármacos. Idealmente, tumores indolentes devem ser tratados conservadoramente e tumores agressivos devem ser tratados de forma mais severa. Em alguns casos, a combinação de mais de uma dessas alternativas pode ser indicada. A combinação de monitoramento da progressão e atenuação dos sintomas é a abordagem mais conservadora, causa menos desconforto e efeitos adversos e é indicada para quadros de baixo risco tendo em vista a manutenção da qualidade de vida do paciente. Já cirurgia e radiação são tratamentos eficazes para homens com câncer mais significativo clinicamente mas localmente contido. São procedimentos extenuantes aos pacientes, mas a evolução das técnicas utilizadas torna as abordagens cirúrgica e radioterápica cada vez mais precisas e minimiza os efeitos adversos. A terapia de privação androgênica é o tratamento mais convencional para quadros de CaP metastático. No entanto, é associada a toxicidade, efeitos adversos são praticamente inevitáveis e muitos tumores são ou desenvolvem resistência e param de responder ao tratamento. Logo, é importante para a efetividade do tratamento que o diagnóstico da neoplasia e a intervenção médica ocorram antes do desenvolvimento de lesões metastáticas. Dada a idade avançada dos pacientes acometidos com CaP, o tratamento deve ser escolhido

pelo médico urologista levando em consideração as prioridades do paciente, tentando alcançar o melhor prognóstico possível e buscando manter a qualidade de vida do paciente, que pode ser afetada negativamente tanto pelo efeito psicológico que é um diagnóstico de câncer quanto pelos sintomas da doença e pelos efeitos colaterais dessas formas de tratamento (LITWIN e TAN, 2017).

Existe grande interesse tanto clínico quanto econômico no desenvolvimento de novas formas de intervenções terapêuticas químicas para o CaP, especialmente visando a modelagem molecular de fármacos. Amplamente, o receptor de androgênio continua sendo o principal alvo molecular do desenvolvimento de fármacos, mas são necessários novos antagonistas com eficácia aprimorada para superar os mecanismos de resistência e com efeitos colaterais reduzidos. Além disso, outras abordagens para o desenvolvimento de fármacos são a via de reparo de danos ao DNA, mecanismos epigenéticos, imunoterapia e quimioterapia (NEVEDOMSKAYA, BAUMGART e HAENDLER, 2018).

No Brasil, o CaP é a neoplasia com a segunda maior incidência entre os homens, com 68.220 novos casos estimados por ano para o biênio de 2018-2019 (INCA, 2017). Em 2018, houve um total de 32.270 internações hospitalares pelo Sistema Único de Saúde em todo país, levando a um gasto de R\$ 99.140.879,85 no diagnóstico e tratamento do câncer de próstata (DATASUS - TABNET). No mundo, o Observatório Global do Câncer (Global Cancer Observatory) estima que foram diagnosticados 1.276.106 novos casos em 2018 e prevê que em 2040 serão registrados 2.293.818 novos casos devido ao aumento da população e aumento da expectativa de vida (BRAY et al., 2018; Global Cancer Observatory - Cancer today, 2019; Global Cancer Observatory - Cancer tomorrow, 2019).

O câncer de próstata é caracterizado pela impressionante variação geográfica nas taxas de incidência e mortalidade, mas é particularmente comum nos países desenvolvidos. As chances de diagnóstico de câncer de próstata aos 79 anos são de 1 em 47 entre os países com um índice sociodemográfico baixo-médio, em comparação com 1 em 6 entre os países com um alto índice sociodemográfico. A variação nas taxas de incidência entre populações pode ser atribuída a diferenças na intensidade da triagem e frequência na realização de exames diagnósticos, frequência populacional de características genéticas que influenciam a propensão ao desenvolvimento da doença e exposição a fatores de risco exógenos causada por diferenças culturais ou geográficas (PERNAR et al., 2018).

Diagnóstico

Atualmente, o diagnóstico dessas condições prostáticas é baseado em um exame clínico, o exame de toque retal (ETR), e um exame bioquímico, a detecção sorológica do antígeno prostático específico (PSA).

O antígeno prostático específico é uma serino-protease codificada pelo gene KLK3, expresso em abundância em células epiteliais prostáticas, o que confere um grau de especificidade para condições prostáticas ao marcador. Grande parte das moléculas de PSA sérico forma um complexo com inibidores de protease, α 1-antiquimotripsina e α 2-macroglobulina, e a quantificação dos níveis sanguíneos desse complexo proteico é denominada PSA total. O restante do PSA sérico é considerado biologicamente inativo e é chamado de PSA livre. Em geral, os níveis sanguíneos de PSA são baixos, mas aumentam em condições inflamatórias, de morte celular ou de disrupção da arquitetura histológica da próstata. Desde que foi demonstrado no final dos anos 80 que o nível de PSA sérico se correlaciona com o estágio do CaP, o PSA tem sido utilizado como indicador em vários estágios do gerenciamento do CaP, incluindo o diagnóstico e a detecção de recorrência após a terapia local (recidiva bioquímica). Embora o PSA seja um dos biomarcadores mais utilizados na detecção e tratamento do câncer de próstata, ele não é um biomarcador ideal e causa muitas controvérsias. Apesar da triagem relativamente generalizada com PSA, o CaP continua com alta taxa de mortalidade. A limitação do exame PSA é sua especificidade, não é um marcador específico de câncer. A HPB e a prostatite também podem causar elevação do PSA extracelular e estudos populacionais demonstraram que a faixa normal de PSA aumenta com a idade. Além disso, o CaP pode se desenvolver em homens sem elevar os níveis sorológicos de PSA. O PSA também não tem a capacidade de discriminar cânceres clinicamente importantes de tumores de baixo risco. Existem vários ensaios para detecção de PSA disponíveis, porém estudos mostram variabilidade entre os resultados obtidos por eles, comprometendo a confiabilidade da ferramenta (PEZARO, WOO e DAVIS, 2014; DUSKOVA e VESELY, 2015).

O ETR consiste na detecção tátil de nódulos e/ou aumento de volume na próstata. Entretanto, evidências sugerem que o exame pode resultar em um alto número de falsos positivos, levando a testes diagnósticos invasivos desnecessários que podem precipitar dor, desconforto e desperdício de recursos financeiros e clínicos. A divergência entre resultados

obtidos por diferentes profissionais da saúde, a variação entre as definições usadas para ETR anormal e a baixa padronização no treinamento de profissionais para a realização do ETR resultam em baixa sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo. Contudo, a heterogeneidade entre estudos que avaliam tanto os benefícios como as falhas do ETR leva à falta de consenso em apoiar ou refutar a utilidade clínica do ETR (NAJI et al., 2018).

Tanto ETR quanto PSA são indicadores facilmente obtidos mas limitados pela baixa discriminação entre as diferentes condições prostáticas que envolvem um quadro de inflamação e aumento do volume prostático e pelo baixo valor preditivo do desenvolvimento da doença e do prognóstico do paciente. Dessa forma, a relevância de ambos exames tem sido discutida pela comunidade médica e científica (BARRY e SIMMONS, 2017).

A confirmação do diagnóstico é realizada por exame histopatológico da biópsia prostática (BP). A BP consiste na coleta transretal ou transperineal de 12 fragmentos em uma disposição espacial representativa da próstata com o auxílio de ultrassom ou ressonância magnética. Esses fragmentos são preservados em formol e analisados histopatologicamente. A análise revela o tipo de doença prostática e no caso de CaP o tipo de câncer e o estadiamento, e através do método de amostragem consegue evitar a detecção de tumores não significantes clinicamente de forma satisfatória. A técnica é amplamente disponível e a metodologia é bem padronizada, facilitando o treinamento de profissionais tanto na realização do procedimento cirúrgico como na análise dos fragmentos (OMER e LAMB, 2019). A BP é o padrão-ouro no diagnóstico das diferentes doenças que afetam a próstata, mas é um método diagnóstico altamente invasivo, que precisa ser realizado sob anestesia em centro cirúrgico, com recuperação que inclui o uso temporário de leito hospitalar e de antibióticos e sujeita o paciente a complicações cirúrgicas como infecções, dor e aumento temporário dos sintomas urinários. Além disso, a BP não tem poder para diferenciar os diversos comportamentos clínicos e o níveis de risco que o CaP apresenta, limitando sua contribuição na escolha entre uma forma de tratamento mais agressiva ou mais conservadora (BORGHESI et al., 2017).

Além disso, CaP e HPB compartilham muitas similaridades como os sintomas do trato urinário inferior, o aumento da incidência com a idade, a associação hormonal e inflamatória e até alterações genéticas. As duas condições frequentemente coexistem, mas o gerenciamento clínico efetivo de cada uma delas depende de um diagnóstico preciso e de uma ferramenta diagnóstica com poder de discriminar entre elas (ALCARAZ et al. 2009).

Biomarcadores

Tendo em vista as deficiências das principais ferramentas diagnósticas aplicadas a HPB e CaP no contexto clínico atualmente, é necessária a descoberta de novos indicadores que possam informar a gestão dessas doenças. Um biomarcador é uma molécula indicadora de um parâmetro fisiológico, bioquímico ou anatômico clinicamente relevante que seja mais difícil ou mais caro de observar. Os biomarcadores podem ser usados na triagem, diagnóstico, caracterização e monitoramento de doenças, como indicadores de prognóstico, para desenvolver intervenções terapêuticas individualizadas, para prever e tratar reações adversas a medicamentos, para estudos farmacodinâmicos e de resposta à dose, entre outros. A descoberta de biomarcadores é feita através do estabelecimento da relação fisiopatológica entre o biomarcador e o fenômeno que ele descreve. Bons biomarcadores devem ser mensuráveis de maneira pouco invasiva, financeiramente viável e clinicamente acessível, com pouca ou nenhuma variabilidade independente ao fenótipo de interesse, devem ter uma razão de sinal para ruído alta e devem mudar rápida e confiavelmente em resposta a mudanças na condição patológica (ARONSON e FERNER, 2017).

A descoberta de novos biomarcadores que possam conquistar esses objetivos de forma não invasiva, praticável no contexto clínico e que sejam aplicáveis em etapas distintas do gerenciamento do CaP é de extrema importância (MCGRATH et al., 2016). Esforços similares estão obtendo resultados positivos em neoplasias em outras localizações primárias como o câncer de mama (NICOLINI, FERRARI e DUFFY, 2018).

As principais etapas do cuidado às doenças prostáticas beneficiadas por biomarcadores são antes da BP, estabelecendo um processo de triagem de pacientes mais eficiente para a indicação médica da BP, após o resultado negativo da BP, aumentando a confiabilidade do resultado, monitorando mais precisamente os riscos de desenvolvimento dessas doenças e auxiliando na decisão de repetir o exame ou não e após o resultado positivo da BP guiando a escolha do tratamento adequado e monitorando a possibilidade de recorrência. No caso do diagnóstico de CaP, biomarcadores têm ainda o potencial de contribuir para o estadiamento da doença, a estratificação dos riscos que esse diagnóstico representa, estimando o grau de agressividade da doença, indicando a possibilidade de resistência à terapia de privação androgênica, monitorando a recorrência tumoral e a recidiva bioquímica (CUCCHIARA et al., 2018).

As principais amostras clínicas exploradas na descoberta de biomarcadores de CaP são sangue, urina e tecido prostático. A coleta de sangue é considerada uma técnica minimamente invasiva, com tempo de análise rápido e que gera um indicador em tempo real de alterações nas condições fisiológicas que seja robusto e consistente o suficiente para que os resultados sejam reprodutíveis. Para o CaP, são utilizados exames de sangue (PSA) como ferramentas de diagnóstico e indicadores de recidiva. Já a urina é uma amostra clínica obtida de forma pouco invasiva em que o ruído experimental observado na detecção de biomarcadores é reduzido devido ao baixo conteúdo proteico. A amostra de urina ainda pode ser enriquecida de células prostáticas mediante estímulo prostático devido à proximidade anatômica da bexiga e da uretra com a próstata. A realização de exames diagnósticos menos invasivos aumenta a adesão e a disposição do paciente não diagnosticado a monitorar sua saúde prostática e manter o acompanhamento periódico com o médico urologista. O desenvolvimento de métodos de triagem baseados em análises de sangue e urina pode limitar a BP para casos em que essa ferramenta é realmente necessária, evitando desperdício de recursos financeiros e clínicos e desconforto para o paciente. Por outro lado, os biomarcadores baseados em amostra de tecido prostático são mais diversos em funcionalidade. Esses ensaios podem ser realizados a partir amostras de núcleos de BP ou de tecido prostático coletado em cirurgia como prostatectomia radical. No entanto, esses ensaios são os mais invasivos devido à natureza da extração de tecido prostático por ressecção cirúrgica. Atualmente, pacientes podem ser submetidos a um ou vários conjuntos de biópsias para o monitoramento das doenças prostáticas. Biomarcadores em tecido podem ser úteis para evitar a repetição de biópsias, após o diagnóstico por BP na decisão da abordagem terapêutica mais apropriada ou após a intervenção cirúrgica no estadiamento mais preciso da doença, indicação de agressividade tumoral e prognóstico. Testes em desenvolvimento em amostras de tecido prostático incluem análise de assinaturas de mRNA, DNA, metilação e proteínas (RICE e STOYANOVA, 2019).

As características heterogêneas do CaP, combinadas com as dimensões relativamente pequenas da próstata, são um grande impedimento na obtenção de material homogêneo suficiente para testes moleculares. Esses fatores têm sido os principais obstáculos na identificação dos genes e processos moleculares envolvidos na carcinogênese e na progressão do câncer. Felizmente, os avanços nas tecnologias de “molécula única” (single-molecule) e alta performance (high throughput) e como o sequenciamento de nova geração (NGS)

facilitam o estabelecimento de perfis genômicos, transcriptômicos, epigenéticos e metabolômicos dos tumores (HODGES, BACHERT e CHENG, 2017).

O interesse comercial e clínico na descoberta de biomarcadores para o CaP e no desenvolvimento de ensaios clínicos para sua detecção é alto, portanto a disponibilidade de testes moleculares indicadores de características de interesse no CaP aumenta a cada ano. Infelizmente a relevância dos testes propostos até o presente momento na literatura é questionável e a sua disponibilidade clínica e aplicabilidade são limitadas. Pesquisa científica que evidencie a especificidade e a sensibilidade desses testes e valide esses biomarcadores como representativos da doença em diferentes populações é de extrema importância (KRETSCHMER e TILKI, 2017). Esses fatores justificam a utilização clínica de ferramentas diagnósticas como PSA e variações desenvolvidas que mesmo não apresentando especificidade ou sensibilidade ótimas são amplamente acessíveis, abundantemente descritos na literatura e tanto suas falhas com suas qualidades são extensamente conhecidas (DUFFY, 2019).

S100A4

S100 *calcium binding protein* A4 (S100A4) é um gene localizado no cromossomo 1 no locus 1q21.3 que codifica a proteína homônima S100 *calcium binding protein* A4, membro da família proteica S100 de pequenas proteínas ligantes de cálcio, de localização subcelular no citoplasma, núcleo e/ou secretada para o meio extracelular, expressa ubiquamente e frequentemente superexpressa em tumores metastáticos, bem como em células normais com movimento desinibido, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos T (Gene 6275 - National Center for Biotechnology Information). O transcrito consiste em dois éxons codificadores, cada um contém DNA correspondente à região ao redor de um dos motivos que formam a região ligante de cálcio, e um pequeno éxon não codificante. Após a tradução, a proteína é clivada e perde a metionina amino-terminal resultando em um polipeptídeo de 100 aminoácidos. A estrutura secundária da proteína é predominantemente composta por alfa-hélice e sua estrutura tridimensional foi elucidada experimentalmente por cristalografia via difração de raio X com resolução de 1,5 Å (PDB 3C1V - GINGRAS et al., 2008). A proteína S100A4 forma um homodímero. Após a ligação do cálcio, o dímero sofre alterações conformacionais, permitindo a interação da proteína com diferentes alvos proteicos e

exercendo uma ampla gama de funções intracelulares e extracelulares (BARRACLOUGH, 1998). Sua função varia de acordo com sua interação com outras proteínas e sua localização subcelular e afeta vários processos celulares, como diferenciação celular, progressão do ciclo celular, polimerização da tubulina, angiogênese, autofagia e apoptose (DONATO et al., 2012).

A função mais bem estabelecida da S100A4 está associada à indução de metástases tumorais. No entanto, esta proteína também está envolvida na patogênese de doenças autoimunes, cardiovasculares, nervosas, pulmonares, gastroentéricas e metabólicas que incluem artrite reumatóide, psoríase, esclerose sistêmica, diabetes e alergias. S100A4 exibe atividades intra e extracelulares. Dentro da célula, a maior concentração da proteína está localizada no citoplasma, mas também é detectada no núcleo (o papel biológico de S100A4 nuclear permanece desconhecido). A interação de S100A4 com proteínas intracelulares modula processos como motilidade celular, invasividade, adesão e metástase. Além disso, a interação direta de S100A4 com a proteína supressora de tumor p53 indica sua participação em processos carcinogênicos fundamentais, como apoptose, proliferação e diferenciação celular. Sob condições não patológicas, a proteína está localizada principalmente dentro da célula, e os níveis da proteína extracelular e em fluidos corporais é baixo. A secreção de S100A4 no espaço extracelular ocorre em resposta a estresse fisiológico e celular. A externalização da S100A4 modula a expressão de várias moléculas, como citocinas e fatores de crescimento e está associada a inflamação, neoplasia, progressão metastática do câncer, angiogênese, invasão celular e quimiotaxia. S100A4 também pode ser detectada no plasma de pacientes com artrite reumatóide, psoríase e câncer em um agregado de alto peso molecular (oligômero) (AMBARTSUMIAN, KLINGELHÖFER e GRIGORIAN, 2019).

O fato de S100A4 ser superexpressa e desempenhar um papel central em várias condições patológicas, incluindo o câncer, a torna um alvo terapêutico atraente. Os efeitos fenotípicos das variações na expressão gênica e proteica de S100A4 são gerados por diversas vias de sinalização, interferindo com reguladores do ciclo celular, receptores de fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e indutores de angiogênese e linfangiogênese. Em virtude disso, a detecção de S100A4 pode vir a ser um biomarcador de prognóstico, de progressão e agressividade em neoplasias assim como se tornar um alvo molecular no design de fármacos para regular negativamente a sinalização molecular que contribui para o crescimento, invasão e metástase do câncer (SHERBET, 2009). A S100A4 é

considerada um potencial biomarcador em câncer pancreático (HUANG et al., 2016), gástrico (LING e LI, 2014) e colorretal (LIU et al., 2013).

No contexto de CaP, foi observado que a expressão gênica de S100A4 foi: maior em CaP quando comparada com tecido prostático normal e diretamente proporcional à presença de características malignas como desenvolvimento de metástase e velocidade de crescimento tumoral (KE et al., 1997); maior em CaP de alto grau (escore de Gleason 4 + 5) em comparação com o câncer de baixo grau (escore de Gleason 3 + 3), HBP e prostatite (GUPTA et al., 2003); maior em HPB em comparação a zona de transição normal (ZHAO et al., 2006). Até mesmo existem estudos em que a expressão gênica de S100A4 não foi observada em linhagens celulares de CaP devido a metilação (REHMAN et al., 2007).

Além disso, foi demonstrado que a expressão gênica de S100A4 em CaP diminui em resposta a tratamentos como: fitoterápico, resultando em inibição da progressão do CaP (SALEEM et al., 2005); relaxina, resultando em diminuição na capacidade de proliferação, formação de colônias, adesão e invasão in vitro e crescimento tumoral mais lento (AGOULNIK, 2011); mecanismos de sinalização de privação de glicose, correlacionado ao aumento da expressão de genes considerados supressores de tumor (LIN et al., 2012); sinvastatina, inibindo proliferação, migração e invasão celular (MIYAZAWA et al., 2016). Contrariamente, a expressão gênica de S100A4 em CaP aumenta em resposta a: indução do desenvolvimento de características neuroendócrinas em CaP resultando em maior índice proliferativo e maior potencial de metástase e resistência a medicamentos (TANG et al., 2009); indução de transição epitelio-mesenquimal com fatores de crescimento resultando em habilidade de invasão tecidual (AMATANGELO et al., 2012) e desenvolvimento de lesões metastáticas ósseas de CaP (SHAHRIARI et al., 2016).

Ainda, foi descrito que a supressão da expressão gênica de S100A4 em CaP resulta em: diminuição da capacidade celular de motilidade e invasão e do número de colônias formadas em cultura celular (SALEEM et al., 2006); inibição de angiogênese e redução de volume tumoral (OCHIYA, TAKENAGA e ENDO, 2013; ISHIKAWA et al., 2019); regressão tumoral e diminuição da capacidade metastática (SIDDIQUE et al., 2013). Também foi descrito que o bloqueio da ligação de S100A4 com receptores proteicos no meio extracelular reduz significativamente a vascularização e resulta em regressão tumoral (OCHIYA et al., 2015).

BGN

Biglycan (BGN) em humanos é um gene localizado no cromossomo X no locus Xq28 que codifica a proteína homônima *biglycan*, membro da família proteica de pequenos proteoglicanos ricos em leucina (SLRP), de localização subcelular na matriz extracelular e expresso ubiquamente, com destaque em tecido ósseo, cartilaginoso e conjuntivo (*Gene 633-National Center for Biotechnology Information*). A proteína possui função estrutural e de sinalização de estresse e lesão celular e regula uma série de processos biológicos como osteogênese, fibrinogênese do colágeno, estabilidade sináptica na junção neuromuscular, inflamação, imunidade inata e adquirida e atua como modulador de fatores de crescimento e da atividade de citocinas (NASTASE, YOUNG e SCHAEFER, 2012). Os mecanismos moleculares de atuação da proteína em câncer ainda não são claros, mas é possível que BGN possa alterar a proliferação tumoral através da modulação de receptores proteicos no microambiente tumoral. Existem evidências de que a superexpressão de *biglycan* no microambiente tumoral favorece a proliferação de células cancerígenas, modificando a sinalização intracelular e a matriz extracelular e leva a um prognóstico desfavorável (APPUNNI et al., 2019). No contexto de CaP, a expressão de BGN foi observada regulada positivamente pela presença de ErbB3 extracelular, identificada no sobrenadante de amostras de medula óssea de pacientes com metástases ósseas de câncer de próstata e relacionada ao aumento da invasividade de células tumorais em modelo animal (CHEN et al., 2007). A superexpressão de BGN também foi significativamente associada a prognóstico desfavorável em CaP e foi observado aumento dos níveis de expressão conforme a progressão do estadiamento patológico do tumor (JACOBSEN et al., 2017). Além disso, BGN está incluído em *Oncotype DX Prostate Cancer Assay*, uma ferramenta desenvolvida no intuito de estimar a agressividade do CaP através dos níveis de expressão gênica de um painel selecionado de genes em tecido de biópsia prostática por agulha (KNEZEVIC et al., 2013). Assim, do ponto de vista molecular, a expressão gênica de BGN pode ser indicativa de características neoplásicas e a proteína pode ser um potencial biomarcador de câncer, como investigado em câncer de pulmão (RANGEL et al., 2018), colorretal (QIAN et al., 2017), do endométrio (SUN et al., 2015) e gástrico (HU et al., 2014).

1.1 Justificativa

Considerando a alta incidência das alterações prostáticas no Brasil e no mundo, o custo intrínseco que isso traz ao Sistema Único de Saúde e a lacuna que existe nos métodos disponíveis clinicamente para diagnosticar, classificar e monitorar a condição de cada paciente, a necessidade da caracterização molecular do CaP e da HPB e o valor associado à descoberta de novos biomarcadores dessas patologias são inerentes.

O presente projeto dá continuação ao estudo descrito na tese de doutorado intitulada “Uso da técnica de espectrometria de massas para o estudo de proteínas relacionadas ao câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna” apresentada ao PPG Ciências Biológicas - Fisiologia (MARTINY, 2017). Esta tese identificou através de análise proteômica 2.400 proteínas em 6 amostras de tecido prostático, entre elas 77 diferentemente abundantes entre as amostras de HPB e CaP. Dessas proteínas, 21 tiveram sua expressão gênica avaliada por PCR em tempo real (RT-qPCR). Entre as proteínas analisadas estão S100A4 (mais abundante nas amostras de HPB) e BGN (mais abundante nas amostras de CaP). Ambas foram selecionadas para subsequente análise da expressão gênica com qPCR. O gene S100A4 foi estatisticamente mais expresso em amostras de HPB quando comparados com CaP. O gene BGN exibiu expressão elevada em CaP quando comparada com HPB, mas a diferença não é estatisticamente significativa. Além disso, para a maioria dos genes analisados, os resultados da expressão gênica e expressão proteica se mostraram conflitantes. Um dos possíveis motivos para essa discrepância é o pequeno número amostral disponível na época para as análises. Dessa forma, se faz necessário replicar os experimentos com um número amostral maior para avaliar a real relação entre expressão gênica e proteica desses genes em CaP e HPB e, futuramente, os mecanismos de regulação envolvidos. Com esse objetivo em mente, foram selecionados os genes biglycan (BGN) e S100 calcium binding protein A4 (S100A4) para análise complementar, tendo em vista os resultados obtidos no estudo, o papel desses genes no câncer e seu potencial como biomarcadores descritos na literatura.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica de BGN e S100A4 em amostras de tecido prostático provenientes de câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.

1.2.2 Objetivos específicos

- a. Quantificar a expressão gênica de BGN e S100A4 por PCR quantitativo em tempo real em amostras de tecido prostático com CaP e amostras com HPB;
- b. Comparar a nível de expressão gênica relativa dos genes BGN e S100A4 entre as amostras de câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna;
- c. Relacionar os dados de expressão gênica com dados clínicos relevantes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do Estudo

Estudo transversal para análise da expressão gênica em amostras de tecido prostático de indivíduos acometidos com câncer de próstata ou hiperplasia prostática benigna. Esse estudo é um seguimento do estudo submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e aprovado em seus aspectos éticos e científicos sob o número 11-0283.

Coleta das Amostras

As amostras de tecido prostático utilizadas neste trabalho foram obtidas de pacientes adultos do sexo masculino atendidos pelo Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), diagnosticados com hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata e submetidos a intervenção cirúrgica (ressecção transuretral de próstata ou prostatectomia radical) como forma de tratamento, sem diagnóstico de outra neoplasia concomitante ou doenças sexualmente transmissíveis e que não estivessem sob terapia hormonal, quimio ou radioterapia. Os pacientes selecionados e de acordo com a participação no estudo científico assinaram Termos de Consentimento Livre e Esclarecido. As amostras de tecido prostático de 10 mm x 5 mm de dimensão foram coletadas em condições estéreis em transoperatório com o auxílio da equipe médica responsável pelo procedimento cirúrgico. As amostras foram incubadas em RNAlater® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, USA) a 2 a 8 graus Celsius por pelo menos 24 horas mas não mais que 30 dias e armazenadas sem o RNA later a -80 graus Celsius. O caráter patológico de cada amostra foi confirmado pelo laudo anatomopatológico da análise do tecido prostático obtido em cirurgia emitido pelo serviço de patologia do HCPA.

Extração de mRNA e Síntese de cDNA

Para cada uma das 33 amostras de HPB e 35 amostras de CaP coletadas foi feita a extração do RNA total pelo método Trizol® (Life Technologies, CA, USA), seguida pela

quantificação do RNA obtido utilizando um espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). A partir de 2µg do RNA foi sintetizado o DNA complementar utilizando Oligo(dT) primers e o kit SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, CA, USA).

Análise da expressão gênica

A quantificação da expressão gênica dos genes BGN e S100A4 foi feita por PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando o kit SYBR™ Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) e volume de reação de 10µL. As reações tiveram 40 ciclos com anelamento dos primers e extensão da sequência a cada ciclo a 60°C por 90 segundos. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. O gene beta-2-microglobulina (B2M) foi escolhido como normalizador endógeno. A pertinência da utilização desse gene como normalizador endógeno na análise de expressão gênica em tecido prostático foi averiguada previamente através de ensaio de estabilidade (SOUZA et al., 2012) e esse gene é utilizado amplamente para esse propósito em trabalhos conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular Endócrino Tumoral. Primers específicos foram sintetizados para a utilização na reação de qPCR de acordo com as sequências:

Tabela 1: Sequência dos primers específicos

Gene	Sequência do Primer Forward	Sequência do Primer Reverse
B2M	5' CTATCCAGCGTACTCCAAAG 3'	5' ACAAGTCTGAATGCTCCACT 3'
S100A4	5' CCCTGGATGTGATGGTGTC 3'	5' CTTTCATCTGTCCTTTTCCCCAAG 3'
BGN 1	5' AGCTCCACTTGGACAACAAC 3'	5' GACAGAAGTCGTTGACACCC 3'
BGN 2	5' CATGAACTGCATCGAGATGGG 3'	5' TGTTGTGGTCTAGGTGGAGT 3'

Análise Estatística

O banco de dados foi elaborado em planilha eletrônica Microsoft Excel. O nível de expressão gênica foi calculado com o método do $2^{-\Delta\Delta CT}$. As características clínicas relevantes

de cada amostra foram obtidas do sistema AGHUse do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As características clínicas avaliadas foram PSA total pré-cirúrgico (ng/dL), idade (na data da cirurgia), e no caso de CaP escore de Gleason (determinado no laudo anatomopatológico da peça cirúrgica) e habilidade de invasão tecidual (amostras de tumores com laudo anatomopatológico de N>0 ou M>0 no Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos foram consideradas invasivas). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software IBM SPSS Statistics® (CA, USA). A normalidade da distribuição das variáveis foi analisada utilizando o teste de Shapiro-Wilk e os dados foram comparados com Teste de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

Caracterização das amostras

Considerando variações de eficiência nas reações de qPCR e o descarte de outliers (valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ fora do intervalo média $\pm 2,5 * \text{Desvios Padrão}$), o número amostral final de cada grupo foi reduzido. No grupo HPB n=23 e no grupo CaP n=33. O valor médio de PSA no grupo HPB foi 8,31 ng/dL com valor mínimo de 1,30 ng/dL e valor máximo de 35,0 ng/dL. A média de idade do grupo HPB foi 67,74 anos com idade mínima de 56 anos e máxima de 80 anos. Já para o grupo CaP, o valor médio de PSA foi 10,39 ng/dL com valor mínimo de 4,26 ng/dL e valor máximo de 40,48 ng/dL. A média de idade do grupo CaP foi 66,88 anos com idade mínima de 55 anos e máxima de 78 anos (Tabela 2). No grupo de CaP ainda foi descrita a invasividade tecidual de cada amostra, 9 amostras apresentaram habilidade invasiva e 24 amostras não, e o escore de Gleason, com 11 amostras padrão 6 (3+3), 13 amostras 7 (3+4), 8 amostras 7 (4+3) e 1 amostra 9 (4+5). As amostras foram classificadas em dois grupos conforme seu escore de Gleason, Gleason baixo (Gleason=6) e Gleason alto (Gleason \geq 7) (Tabela 3).

Tabela 2: Caracterização das amostras de HPB e CaP quanto a PSA e Idade

	HPB	CaP
PSA (ng/dL)	8,31 (1,30-35,0)	10,39 (4,26-40,48)
Idade	67,74 (56-80)	66,88 (55-78)

Dados apresentados em valor médio (mínimo-máximo)

Tabela 3: Caracterização do grupo CaP quanto a escore de Gleason e Classificação TNM

CaP	6 (3+3)	7 (3+4)	7 (4+3)	9 (4+5)	Não	Sim
Gleason	11 amostras (33,3%)	13 amostras (39,4%)	8 amostras (24,2%)	1 amostra (3,1%)	---	---
N>0 ou M>0	---	---	---	---	24 amostras (72,7%)	9 amostras (27,3%)

Dados apresentados em número de amostras (porcentagem)

Níveis de Expressão Gênica de BGN

Os dados obtidos na quantificação da expressão gênica de BGN não serão utilizados neste trabalho. Foi realizado o desenho e a compra de dois pares de primers específicos e para cada um deles foram feitas várias tentativas de padronização da reação de qPCR incluindo variações em master mix (SYBR™ Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) e GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, WI, USA)), temperatura de anelamento de primers (testes foram feitos com temperatura de anelamento variando de 53°C a 62°C), tempo de extensão da sequência (entre 60 e 120 segundos), número de ciclos (entre 40 e 45 ciclos) e quantidade dos primers (entre 0,625 pmol e 5 pmol de primer nos 10 µL de reação). Infelizmente não foi possível atingir um nível de eficiência de reação comparável à reação do controle endógeno e que resultasse em dados de quantificação confiáveis.

Níveis de Expressão Gênica de S100A4

A análise descritiva dos os valores relativos de expressão gênica ($2^{-\Delta\Delta CT}$ ou *Fold Change*) para cada grupo foi realizada. A média obtida para o grupo HPB foi 1,11391 com desvio padrão de 1,00123. A média obtida para o grupo CaP foi 0,64818 com desvio padrão de 0,57776. A normalidade da distribuição dos dados de expressão gênica foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, obtendo o valor de $p=0,02$ para HPB e $p=0,03$ para CaP. Como o valor de p foi menor que 0,05 a hipótese nula (dos dados seguirem uma distribuição normal) é rejeitada. Foi calculado também o logaritmo de $2^{-\Delta\Delta CT}$ na tentativa de obter uma distribuição normal. O teste de Shapiro-Wilk para os valores de logaritmo obteve $p=0,293$ para HPB e $p=0,036$ para CaP. Como a distribuição dos valores de logaritmo não é normal para o grupo CaP, impossibilitando o uso de testes paramétricos, os valores de logaritmo foram descartados (Figuras 1 e 2).

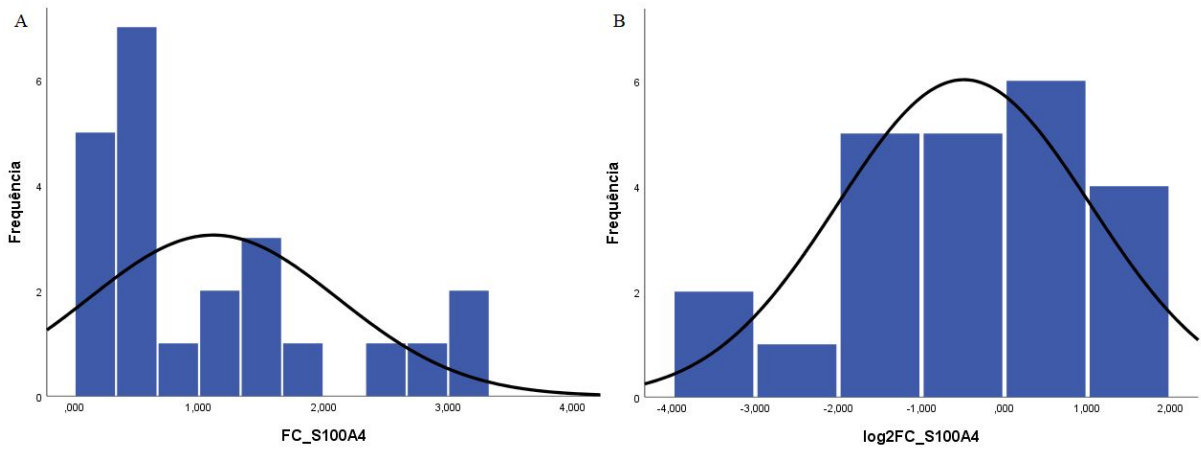


Figura 1: Distribuição os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (A) e logaritmo (B) para o grupo HPB

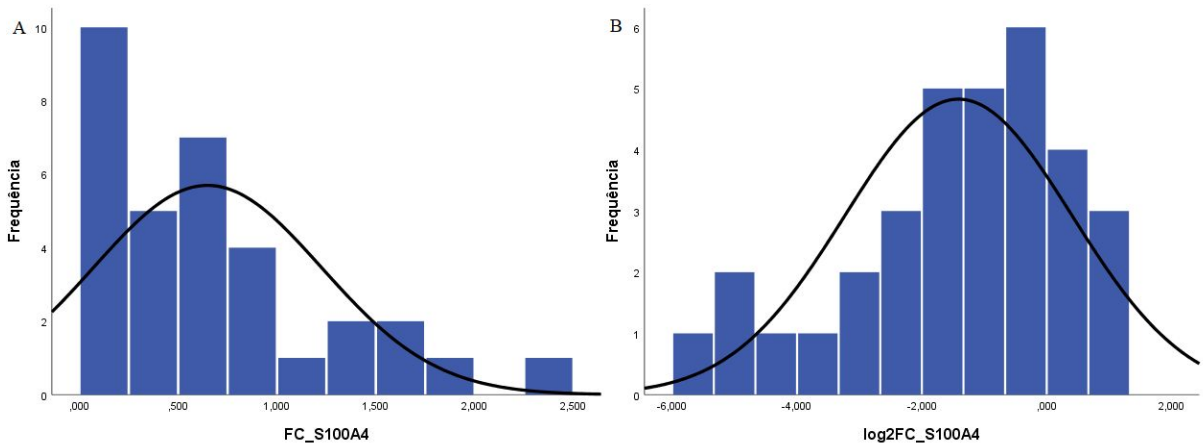


Figura 2: Distribuição os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (A) e logaritmo (B) para o grupo CaP

Tendo em vista a distribuição não normal dos dados, eles são mais apropriadamente descritos por mediana e amplitude interquartil. A mediana obtida para o grupo HPB foi 0,59000, com valor do primeiro quartil 0,36 e do terceiro quartil 1,59 e amplitude interquartil de 1,230. A mediana obtida para o grupo CaP foi 0,54000, com valor do primeiro quartil 0,19 e do terceiro quartil 0,94 e amplitude interquartil de 0,750. A comparação das distribuições amostrais dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ de cada grupo foi feita utilizando o teste de Mann-Whitney, o valor de p obtido foi 0,091 (Figura 3). Isso significa que não foi observada diferença significativa da expressão gênica de S100A4 entre as amostras de HPB e CaP.

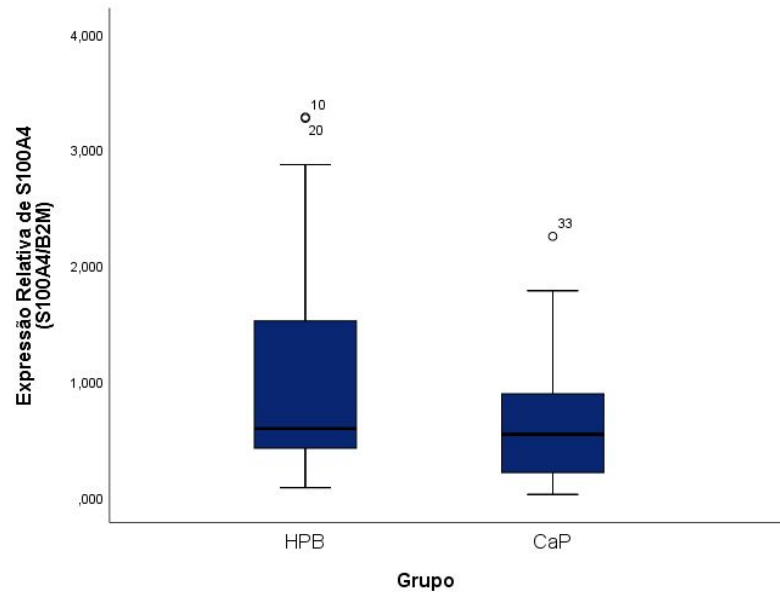


Figura 3: Comparação da expressão gênica relativa de S100A4 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Valores amostrais obtidos em HPB e CaP apresentados indicando Mediana e Intervalo Interquartil (25-75)

Foram comparados também os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre as amostras de CaP de baixo grau histológico (Gleason=6) com mediana 0,51000 (valor do primeiro quartil 0,06; do terceiro quartil 0,86; amplitude interquartil 0,800) e as amostras de CaP de alto grau histológico (Gleason \geq 7) com mediana 0,55000 (valor do primeiro quartil 0,2; do terceiro quartil 1,015; amplitude interquartil 0,815)(Figura 4). Os valores foram comparados pelo teste de Mann-Whitney e o valor de p obtido foi 0,665, indicando que a expressão gênica é similar nos dois grupos.

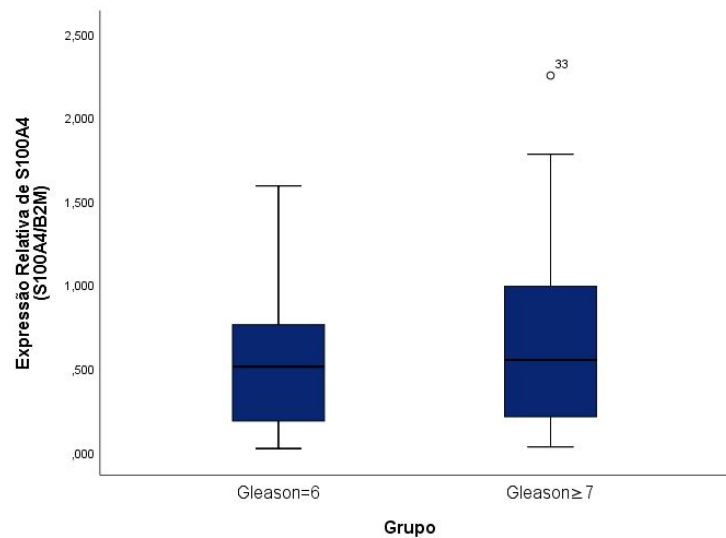


Figura 4: Comparação da expressão gênica relativa de S100A4 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Valores amostrais obtidos em CaP de baixo grau histológico (Gleason=6) e alto grau histológico (Gleason \geq 7) apresentados indicando Mediana e Intervalo Interquartil (25-75)

Finalmente, foram comparados os valores de expressão de S100A4 entre as amostras de CaP invasivas (mediana 0,21000; valor do primeiro quartil 0,075; do terceiro quartil 0,325; amplitude interquartil 0,250) e as localmente contidas (mediana 0,69000; valor do primeiro quartil 0,315; do terceiro quartil 1,3075; amplitude interquartil 0,992) utilizando-se a classificação TNM. O valor de p obtido foi 0,02, indicando expressão gênica significativamente maior em amostras de CaP localmente contido em comparação a amostras de CaP invasivo.

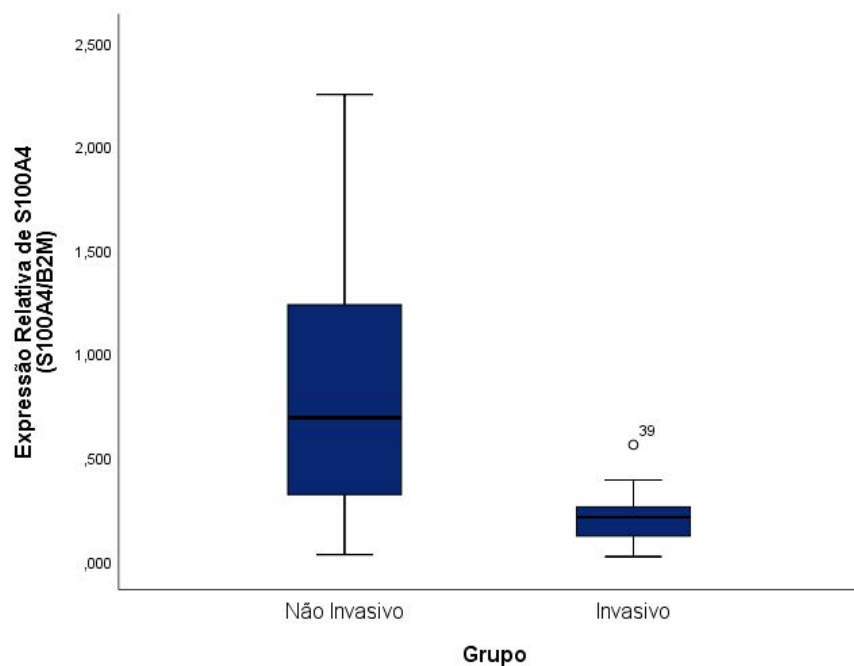


Figura 5: Comparação da expressão gênica relativa de S100A4 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Valores amostrais obtidos em CaP não-invasivo e invasivo apresentados indicando Mediana e Intervalo Interquartil (25-75)

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi quantificada a expressão gênica de BGN e S100A4 em amostras de CaP e HPB. Devido à baixa qualidade dos dados, os resultados obtidos para BGN não foram incluídos neste relato. A dificuldade de amplificação do gene do BGN pode ter ocorrido devido ao tempo de armazenamento das amostras, obtidas do banco amostral disponível no Laboratório de Biologia Molecular Endócrino Tumoral, e variabilidade característica no perfil molecular do CaP (TOLKACH e KRISTIANSEN, 2018), dificultando a observação de um padrão na regulação da expressão gênica de BGN em relação à presença das doenças prostáticas investigadas.

Já os resultados obtidos na quantificação da expressão de S100A4 foram analisados na tentativa de estabelecer um perfil transcricional mediante à presença de uma gama de características clínicas relevantes ao gene de estudo e às neoplasias prostáticas investigadas na literatura científica. Os níveis de expressão gênica de S100A4 foram primeiramente comparados entre as amostras de HPB e CaP. Os dados experimentais obtidos em cada grupo não apresentaram diferença estatística entre os níveis de expressão gênica de S100A4 dos dois grupos. Os dados da literatura são bastante heterogêneos em relação à expressão gênica de S100A4. Alguns relatos demonstram expressão aumentada em amostras de CaP quando comparadas a amostras de tecido prostático normal (KE et al., 1997); aumentada em amostras de HPB quando comparadas a amostras de tecido prostático normal (ZHAO et al., 2006); e comparável em amostras de HPB e em amostras de CaP de Gleason baixo (GUPTA et al., 2003). Ainda de acordo com a literatura, existem relatos sobre a alta variabilidade observada na expressão gênica de S100A4, incluindo trabalhos que observaram ausência completa de expressão gênica de S100A4 em linhagens celulares de CaP (REHMAN et al., 2007; SIDDIQUE et al., 2013). Os trabalhos que avaliaram expressão proteica de S100A4 observaram maior diferença em expressão proteica do que gênica em amostras de CaP, indicando diferença na eficiência de tradução entre os grupos comparados (KE et al., 1997; GUPTA et al., 2003; KWON et al., 2010), em concordância com a variabilidade entre os resultados de expressão gênica e proteica obtida por Martiny PB, et al., 2018.

A comparação dos níveis de expressão gênica de S100A4 entre grupos descritos como de baixo e alto Gleason também não obteve diferença significativa. Essa observação é contrária ao que foi descrito na literatura por GUPTA et al. em 2003 e indiretamente descrito

em outros trabalhos (SALEEM et al., 2005; KWON et al., 2010). Essa inconsistência pode ser justificada pela limitação na representatividade amostral de diferentes escores de Gleason (72,7% das amostras apresentaram padrão histológico primário 3 e apenas 1 amostra entre 33 apresentou escore total de Gleason maior que 7).

O aumento significativo dos níveis de expressão gênica de S100A4 em amostras localmente contidas quando comparadas com as amostras invasivas difere de alguns dados da literatura (KE et al., 1997; SHAHRIARI et al., 2016). Porém, tanto esses estudos como outros relacionando o aumento da expressão gênica de S100A4 com o aumento na capacidade invasiva do tumor (SALEEM et al., 2006; AGOULNIK, 2011; AMATANGELO et al., 2012; SIDDIQUE et al., 2013 MIYAZAWA et al., 2016) foram realizados em amostras pareadas, relatando aumento ou diminuição da expressão gênica a partir de um valor de base para cada amostra, mas que pode ser variável entre as amostras, levando em consideração a heterogeneidade molecular característica de CaP descrita anteriormente (TOLKACH e KRISTIANSEN, 2018) e observada inclusive nos níveis de detecção de moléculas como o PSA, utilizado amplamente como indicador de CaP (PEZARO, WOO e DAVIS, 2014; DUSKOVA e VESELY, 2015).

5. CONCLUSÕES

O gene que codifica a proteína S100A4 é expresso de forma similar nas amostras de HPB e CaP avaliadas neste trabalho, não diferindo também entre amostras de grau histológico baixo (Gleason 6) e alto (Gleason ≥ 7).

A expressão gênica do S100A4 foi maior em amostras de CaP localmente contido em comparação a amostras de CaP invasivo.

Não foi possível quantificar a expressão do BGN.

6. PERSPECTIVAS

Tendo em vista a alta incidência das alterações prostáticas no Brasil e no mundo, o custo intrínseco que isso traz ao Sistema Único de Saúde e a lacuna que existe nos métodos disponíveis clinicamente para diagnosticar, classificar e monitorar a condição de cada paciente, este trabalho contribuiu para a caracterização molecular do CaP e da HPB. Como existe grande potencial na utilização de S100A4 como alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos (SALEEM et al., 2005; AGOULNIK, 2011); MIYAZAWA et al., 2016; SALEEM et al., 2006; OCHIYA, TAKENAGA e ENDO, 2013; ISHIKAWA et al., 2019; SIDDIQUE et al., 2013; OCHIYA et al., 2015), perspectivas futuras incluem o estabelecimento de um nível de expressão gênica de S100A4 que possa ser considerado “normal”, a comparação entre os níveis de expressão gênica e proteica de S100A4 em amostras pareadas levando em consideração a heterogeneidade inter-paciente de CaP e em amostras não tão homogêneas histologicamente, e a investigação das moléculas que interagindo com S100A4 contribuem para o fenótipo observado. Além disso, tendo em vista as limitações experimentais desse trabalho na análise dos níveis de expressão gênica de BGN e o interesse observado na caracterização dos padrões moleculares de BGN em CaP (CHEN et al., 2007; KNEZEVIC et al., 2013; JACOBSEN et al., 2017), perspectivas futuras incluem a caracterização do perfil transcricional de BGN em CaP e HPB.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Toivanen, R. and Shen, M. (2017). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development*, 144(8), pp.1382-1398.
2. Ørsted, D. and Bojesen, S. (2012). The link between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 10(1), pp.49-54.
3. Yacoub, J. and Oto, A. (2018). MR Imaging of Prostate Zonal Anatomy. *Radiologic Clinics of North America*, 56(2), pp.197-209.
4. Roehrborn, C. (2008). Pathology of benign prostatic hyperplasia. *International Journal of Impotence Research*, 20(S3), pp.S11-S18.
5. Egan, K. (2016). The Epidemiology of Benign Prostatic Hyperplasia Associated with Lower Urinary Tract Symptoms. *Urologic Clinics of North America*, 43(3), pp.289-297.
6. Chughtai, B., Forde, J., Thomas, D., Laor, L., Hossack, T., Woo, H., Te, A. and Kaplan, S. (2016). Benign prostatic hyperplasia. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1).
7. Kim, E., Larson, J. and Andriole, G. (2016). Management of Benign Prostatic Hyperplasia. *Annual Review of Medicine*, 67(1), pp.137-151.
8. Hanahan, D. and Weinberg, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646-674.
9. Li, Y., Mongan, J., Behr, S., Sud, S., Coakley, F., Simko, J. and Westphalen, A. (2016). Beyond Prostate Adenocarcinoma: Expanding the Differential Diagnosis in Prostate Pathologic Conditions. *RadioGraphics*, 36(4), pp.1055-1075.
10. Mucci, L., Hjelmborg, J., Harris, J., Czene, K., Havelick, D., Scheike, T., Graff, R., Holst, K., Möller, S., Unger, R., McIntosh, C., Nuttall, E., Brandt, I., Penney, K., Hartman, M., Kraft, P., Parmigiani, G., Christensen, K., Koskenvuo, M., Holm, N., Heikkilä, K., Pukkala, E., Skytthe, A., Adami, H. and Kaprio, J. (2016). Familial Risk and Heritability of Cancer Among Twins in Nordic Countries. *JAMA*, 315(1), p.68.
11. Dai, C., Heemers, H. and Sharifi, N. (2017). Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(9), p.a030452.
12. Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, 10(2), pp.63-89.
13. Tolkach, Y. and Kristiansen, G. (2018). The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. *Pathobiology*, 85(1-2), pp.108-116.
14. Shen, M. and Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development*, 24(18), pp.1967-2000.
15. Humphrey, P. (2017). Histopathology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(10), p.a030411.
16. Telloni, S. (2017). Tumor Staging and Grading: A Primer. *Methods in Molecular Biology*, pp.1-17.
17. Litwin, M. and Tan, H. (2017). The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. *JAMA*, 317(24), p.2532.
18. Nevedomskaya, E., Baumgart, S. and Haendler, B. (2018). Recent Advances in Prostate Cancer Treatment and Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), p.1359.

19. INCA - Instituto Nacional de Câncer (2017). Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (RJ) [Acessado em 12 ago. 2019]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>
20. DATASUS - TABNET. Morbidade Hospitalar do SUS - por local de internação - Brasil. [online]. Parâmetros: Internações, Valor total segundo Região/Unidade da Federação; Capítulo CID-10: II. Neoplasias (tumores); Lista Morb CID-10: Neoplasia maligna da próstata, Hiperplasia da próstata; Período: 2018; [Acessado em 12 ago. 2019]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=6926>
21. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L. and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), pp.394-424.
22. Global Cancer Observatory (2019). Cancer today. [online] Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/home> [Acessado em 12 ago. 2019].
23. Global Cancer Observatory (2019). Cancer Tomorrow. [online] Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home> [Acessado em 12 ago. 2019].
24. Pernar, C., Ebot, E., Wilson, K. and Mucci, L. (2018). The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(12), p.a030361.
25. Pezaro, C., Woo, H. and Davis, I. (2014). Prostate cancer: measuring PSA. *Internal Medicine Journal*, 44(5), pp.433-440.
26. Duskova, K. and Vesely, S. (2015). Prostate Specific Antigen. Current clinical application and future prospects. *Biomedical Papers*, 159(1), pp.018-026.
27. Naji, L., Randhawa, H., Sohani, Z., Dennis, B., Lautenbach, D., Kavanagh, O., Bawor, M., Banfield, L. and Profetto, J. (2018). Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Annals of Family Medicine*, 16(2), pp.149-154.
28. Barry, M. and Simmons, L. (2017). Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality. *Medical Clinics of North America*, 101(4), pp.787-806.
29. Omer, A. and Lamb, A. (2019). Optimizing prostate biopsy techniques. *Current Opinion in Urology*, 29(6), pp.578-586.
30. Borghesi, M., Ahmed, H., Nam, R., Schaeffer, E., Schiavina, R., Taneja, S., Weidner, W. and Loeb, S. (2017). Complications After Systematic, Random, and Image-guided Prostate Biopsy. *European Urology*, 71(3), pp.353-365.
31. Alcaraz, A., Hammerer, P., Tubaro, A., Schröder, F. and Castro, R. (2009). Is There Evidence of a Relationship between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer? Findings of a Literature Review. *European Urology*, 55(4), pp.864-875.
32. Aronson, J. and Ferner, R. (2017). Biomarkers-A General Review. *Current Protocols in Pharmacology*, pp.9.23.1-9.23.17.
33. McGrath, S., Christidis, D., Perera, M., Hong, S., Manning, T., Vela, I. and Lawrentschuk, N. (2016). Prostate cancer biomarkers: Are we hitting the mark?. *Prostate International*, 4(4), pp.130-135.
34. Nicolini, A., Ferrari, P. and Duffy, M. (2018). Prognostic and predictive biomarkers in breast cancer: Past, present and future. *Seminars in Cancer Biology*, 52, pp.56-73.
35. Cucchiara, V., Cooperberg, M., Dall'Era, M., Lin, D., Montorsi, F., Schalken, J. and Evans, C. (2018). Genomic Markers in Prostate Cancer Decision Making. *European Urology*, 73(4), pp.572-582.

36. Rice, M. and Stoyanova, T. (2019). Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer. *Prostatectomy*.
37. Hodges, K., Bachert, E. and Cheng, L. (2017). Prostate Cancer Biomarkers: Current Status. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, 22(5-6), pp.253-269.
38. Kretschmer, A. and Tilki, D. (2017). Biomarkers in prostate cancer – Current clinical utility and future perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 120, pp.180-193.
39. Duffy, M. (2019). Biomarkers for prostate cancer: prostate-specific antigen and beyond. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 0(0).
40. Gene 6275 - National Center for Biotechnology Information. S100A4 S100 calcium binding protein A4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [online] [Acessado em 18 ago. 2019]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6275>
41. Gingras, A., Basran, J., Prescott, A., Kriajevska, M., Bagshaw, C. and Barsukov, I. (2008). Crystal structure of the Ca²⁺-form and Ca²⁺-binding kinetics of metastasis-associated protein, S100A4. *FEBS Letters*, 582(12), pp.1651-1656.
42. Barraclough, R. (1998). Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1448(2), pp.190-199.
43. Donato, R., Cannon, B., Sorci, G., RiuZZi, F., Hsu, K., J. Weber, D. and L. Geczy, C. (2012). Functions of S100 Proteins. *Current Molecular Medicine*, 13(1), pp.24-57.
44. Ambartsumian, N., Klingelhöfer, J. and Grigorian, M. (2019). The Multifaceted S100A4 Protein in Cancer and Inflammation. *Methods in Molecular Biology*, pp.339-365.
45. Sherbet, G. (2009). Metastasis promoter S100A4 is a potentially valuable molecular target for cancer therapy. *Cancer Letters*, 280(1), pp.15-30.
46. Huang, S., Zheng, J., Huang, Y., Song, L., Yin, Y., Ou, D., He, S., Chen, X. and Ouyang, X. (2016). Impact of S100A4 Expression on Clinicopathological Characteristics and Prognosis in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Disease Markers*, 2016, pp.1-9.
47. Ling, Z. and Li, R. (2014). Clinicopathological and Prognostic Value of S100A4 Expression in Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *The International Journal of Biological Markers*, 29(2), pp.99-111.
48. Liu, Y., Tang, W., Wang, J., Xie, L., Li, T., He, Y., Qin, X. and Li, S. (2013). Clinicopathological and prognostic significance of S100A4 overexpression in colorectal cancer: a meta-analysis. *Diagnostic Pathology*, 8(1).
49. Ke, Y., Jing, C., Barraclough, R., Smith, P., Davies, M. and Foster, C. (1997). Elevated expression of calcium-binding protein p9Ka is associated with increasing malignant characteristics of rat prostate carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 71(5), pp.832-837.
50. Gupta, S., Hussain, T., MacLennan, G., Fu, P., Patel, J. and Mukhtar, H. (2003). Differential Expression of S100A2 and S100A4 During Progression of Human Prostate Adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 21(1), pp.106-112.
51. Zhao, H., Ramos, C., Brooks, J. and Peehl, D. (2006). Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. *Journal of Cellular Physiology*, 210(1), pp.111-121.
52. Rehman, I., Goodarzi, A., Cross, S., Leiblich, A., Catto, J., Phillips, J. and Hamdy, F. (2007). DNA methylation and immunohistochemical analysis of the S100A4 calcium binding protein in human prostate cancer. *The Prostate*, 67(4), pp.341-347.
53. Saleem, M.; Adhami, V.M.; Ahmad, N.; Gupta, S.; Mukhtar, H. Prognostic significance of metastasis-associated protein S100A4 (Mts1) in prostate cancer progression and

- chemoprevention regimens in an autochthonous mouse model. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11, 147–153.
54. Agoulnik, A. (2011). Expression of LDL-A module of relaxin receptor in prostate cancer cells inhibits tumorigenesis. *International Journal of Oncology*.
 55. Lin, H., Kuo, Y., Weng, Y., Lai, I., Huang, T., Lin, S., Niu, D. and Chen, C. (2012). Activation of silenced tumor suppressor genes in prostate cancer cells by a novel energy restriction-mimetic agent. *The Prostate*, 72(16), pp.1767-1778.
 56. Miyazawa, Y., Sekine, Y., Kato, H., Furuya, Y., Koike, H. and Suzuki, K. (2016). Simvastatin Up-Regulates Annexin A10 That Can Inhibit the Proliferation, Migration, and Invasion in Androgen-Independent Human Prostate Cancer Cells. *The Prostate*, 77(4), pp.337-349.
 57. Tang, Y., Wang, L., Goloubeva, O., Khan, M., Lee, D. and Hussain, A. (2009). The relationship of neuroendocrine carcinomas to anti-tumor therapies in TRAMP mice. *The Prostate*, 69(16), pp.1763-1773.
 58. Amatangelo, M., Goodyear, S., Varma, D. and Stearns, M. (2012). c-Myc expression and MEK1-induced Erk2 nuclear localization are required for TGF-beta induced epithelial–mesenchymal transition and invasion in prostate cancer. *Carcinogenesis*, 33(10), pp.1965-1975.
 59. Gene 633 - National Center for Biotechnology Information. BGN biglycan [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/633> [Accessed 18 Aug. 2019].
 60. Nastase, M., Young, M. and Schaefer, L. (2012). Biglycan: a multivalent proteoglycan providing structure and signals. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 60(12), pp.963-975.
 61. Appunni, S., Anand, V., Khandelwal, M., Gupta, N., Rubens, M. and Sharma, A. (2019). Small Leucine Rich Proteoglycans (decorin, biglycan and lumican) in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 491, pp.1-7.
 62. Chen, N., Ye, X., Chu, K., Navone, N., Sage, E., Yu-Lee, L., Logothetis, C. and Lin, S. (2007). A Secreted Isoform of ErbB3 Promotes Osteonectin Expression in Bone and Enhances the Invasiveness of Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 67(14), pp.6544-6548.
 63. Jacobsen, F., Kraft, J., Schroeder, C., Hube-Magg, C., Kluth, M., Lang, D., Simon, R., Sauter, G., Izbicki, J., Clauditz, T., Luebke, A., Hinsch, A., Wilczak, W., Wittmer, C., Büscheck, F., Höflmayer, D., Minner, S., Tsourlakis, M., Huland, H., Graefen, M., Budäus, L., Thederan, I., Salomon, G., Schlomm, T. and Melling, N. (2017). Up-regulation of Biglycan is Associated with Poor Prognosis and PTEN Deletion in Patients with Prostate Cancer. *Neoplasia*, 19(9), pp.707-715.
 64. Knezevic, D., Goddard, A., Natraj, N., Cherbavaz, D., Clark-Langone, K., Snable, J., Watson, D., Falzarano, S., Magi-Galluzzi, C., Klein, E. and Quale, C. (2013). Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay – a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC Genomics*, 14(1), p.690.
 65. Rangel, M., de Sá, V., Prieto, T., Martins, J., Olivieri, E., Carraro, D., Takagaki, T. and Capelozzi, V. (2018). Biomolecular analysis of matrix proteoglycans as biomarkers in non small cell lung cancer. *Glycoconjugate Journal*, 35(2), pp.233-242.
 66. Qian, Z., Zhang, G., Song, G., Shi, J., Gong, L., Mou, Y. and Han, Y. (2017). Integrated analysis of genes associated with poor prognosis of patients with colorectal cancer liver metastasis. *Oncotarget*, 8(15).

67. Sun, H., Wang, X., Zhang, Y., Che, X., Liu, Z., Zhang, L., Qiu, C., Lv, Q. and Jiang, J. (2015). Biglycan enhances the ability of migration and invasion in endometrial cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293(2), pp.429-438.
68. Hu, L., Duan, Y., Li, J., Su, L., Yan, M., Zhu, Z., Liu, B. and Yang, Q. (2014). Biglycan enhances gastric cancer invasion by activating FAK signaling pathway. *Oncotarget*, 5(7).
69. Martiny, P.M. (2017). Uso da técnica de espectrometria de massas para o estudo de proteínas relacionadas ao câncer de próstata e hiperplasia prostática benigna. [Tese de Doutorado]. Porto Alegre (RS): Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS.
70. Souza, A.F., Brum, I.S., Neto, B.S., Berger, M. and Branchini, G. (2012). Reference gene for primary culture of prostate cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 40(4), pp.2955-2962.
71. Martiny, P.M. Alcoba, D.D., Silva Neto, B., Carvalho, P.C., Brum, I.S. A proteomic glimpse into the oncogenesis of prostate cancer *J Appl Biomed* 16:328-336, 2018.
72. Kwon, Y., Chang, I., Kim, K., Kim, Y., Myung, S., Kim, M. and Kim, T. (2010). Significance of S100A2 and S100A4 Expression in the Progression of Prostate Adenocarcinoma. *Korean Journal of Urology*, 51(7), p.456.