

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

Mônica Wlach

**ANÁLISE DE miRNAs COMO BIOMARCADORES PARA CÂNCER DE  
PRÓSTATA**

Porto Alegre

2023

Mônica Wlach

**ANÁLISE DE miRNAs COMO BIOMARCADORES PARA CÂNCER DE  
PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Fisiologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva

Coorientador(a): Profa. Dra. Gabriela Pasqualim

Porto Alegre

2023

## CIP - Catalogação na Publicação

Wlach, Mônica  
Análise de miRNAs como biomarcadores para câncer de  
próstata / Mônica Wlach. -- 2023.  
60 f.  
Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva.

Coorientadora: Gabriela Pasqualim.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Câncer. 2. Próstata. 3. Biomarcador. 4. miRNA.  
I. Brum da Silva, Ilma Simoni, orient. II. Pasqualim,  
Gabriela, coorient. III. Título.

Mônica Wlach

**ANÁLISE DE miRNAs COMO BIOMARCADORES PARA CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Fisiologia.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Nome do professor - instituição

---

Nome do professor - instituição

---

Nome do professor – instituição (orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Profa. Ilma Simoni Brum da Silva, e coorientadora, Profa. Gabriela Pasqualim, por toda orientação e ensinamentos durante o período de realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde, pela oportunidade de estudar e desenvolver um trabalho com ensino público de qualidade.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), especialmente ao Serviço de Urologia e ao Prof. Brasil Silva Neto, que possibilitou a colaboração e disponibilizou todas as ferramentas necessárias para que esse trabalho fosse viável.

Às fontes de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), por financiarem os gastos gerados para a realização desta pesquisa.

À Dra. Sara Hartke, pelo imenso suporte em todos os experimentos laboratoriais realizados, e ensinamentos compartilhados.

Aos colegas de laboratório, não só pelo auxílio nas etapas do trabalho, mas também pela amizade e parceria criada ao longo deste período.

E, especialmente, à minha família e namorado, por todo apoio emocional, financeiro, e pela torcida de sempre.

## RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer mais incidente na população masculina mundial. O rastreamento de CaP consiste na determinação sérica do antígeno prostático específico (PSA) e no exame de toque retal (DRE), e o diagnóstico padrão-ouro é a biópsia de próstata. A determinação dos níveis de PSA não é uma abordagem com alta especificidade. Para evitar o sobrediagnóstico e sobretratamento de pacientes com CaP, é necessário validar novos biomarcadores mais sensíveis e específicos para a doença. Nesse aspecto, os miRNAs têm sido amplamente estudados como possíveis biomarcadores para diversos tipos de câncer, incluindo o CaP. O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão de miRNAs em tecido prostático e sangue em amostras de pacientes com CaP e pacientes com hiperplasia prostática benigna (HPB). Foram coletadas amostras de tecido prostático e sangue de 66 pacientes submetidos à cirurgia de próstata, sendo 33 diagnosticados com CaP e 33 com HPB. A extração de RNA foi realizada de forma automatizada com o kit comercial MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA) e, nesta etapa, foi adicionado uma solução de RNA exógeno (cel-miR-39) para servir como controle de todas as etapas dos experimentos. A conversão do RNA e síntese de cDNA foi feita com o TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA). As qPCRs foram realizadas no termociclador StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific, EUA), empregando-se os reagentes TaqMan Fast Advanced Master Mix e TaqMan Advanced miRNAs Assays (Thermo Fisher Scientific, EUA). As expressões relativas dos miRNAs foram calculadas utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ . Para esse cálculo, foi utilizado como controle um miRNA endógeno e expresso de forma estável entre os grupos analisados. Além disso, foi preparada uma amostra calibradora para cada tipo de tecido biológico, contendo um *pool* de RNAs de pacientes de ambos os grupos analisados. Para investigar o poder discriminatório dos miRNAs entre os grupos, foram geradas curvas ROC (*receiver-operating characteristic*) e calculadas as áreas sob as curvas (*areas under the curves* – AUC). Para avaliar o poder discriminatório da combinação dos alvos, foram realizadas análises de regressão logística. No plasma, apenas o miR-375-3p demonstrou maior expressão no grupo CaP em comparação ao grupo HPB. No tecido prostático, os três miRNAs analisados estavam significativamente mais expressos no CaP do que na HPB. Apesar da ampla utilização do PSA sérico no rastreamento e monitoramento do

CaP, na amostragem deste estudo, a utilização do miRNA plasmático 375-3p, e dos miRNAs teciduais 375-3p, 21-5p e 200b-3p, de forma individual ou combinada, permitiram uma melhor diferenciação entre os pacientes com CaP e os pacientes com HPB do que a utilização única do PSA sérico. A partir dos resultados deste trabalho, podemos sugerir o miR-375-3p como um possível biomarcador não-invasivo para o diagnóstico e manejo do câncer de próstata.

*Palavras-chave:* miRNAs. Câncer de próstata. Biomarcadores. Diagnóstico.

## ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the second most incident cancer in the male population worldwide. PCa screening involves the measurement of prostate-specific antigen (PSA) levels in the blood and digital rectal examination (DRE), with the gold standard for diagnosis being prostate biopsy. PSA level determination lacks high specificity. To prevent overdiagnosis and overtreatment of PCa patients, it is essential to validate new biomarkers that are more sensitive and specific to this disease. In this context, microRNAs (miRNAs) have been extensively studied as potential biomarkers to multiple types of cancer, including PCa. The aim of this study was to evaluate the expression of miRNAs in prostate tissue and blood in samples from patients with PCa and patients with benign prostatic hyperplasia (BPH). Prostate tissue and blood samples were collected from 66 patients undergoing prostate surgery, 33 diagnosed with PCa and 33 with BPH. RNA extraction was performed using the MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), with the addition of an exogenous RNA solution (cel-miR-39), to serve as a control for all experimental steps. RNA conversion and cDNA synthesis were carried out using the TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). qPCRs were conducted on the StepOne thermocycler (Thermo Fisher Scientific, USA), using TaqMan Fast Advanced Master Mix and TaqMan Advanced miRNAs Assays (Thermo Fisher Scientific, USA). Relative miRNA expressions were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  method, with an endogenous miRNA stably expressed across the analyzed groups as a control. Additionally, a calibrator sample was prepared for each biological specimen, containing a pool of RNAs from patients from both analyzed groups. To investigate the discriminatory potential of miRNAs between the analyzed groups, receiver-operating characteristic (ROC) curves were generated, and areas under the curves (AUCs) were calculated. Logistic regression analyses were performed to assess the discriminatory potential of target combinations. In plasma, only miR-375-3p showed significant overexpression in the PCa group compared to the BPH group. In prostate tissue, all three analyzed miRNAs were significantly overexpressed in PCa. Despite the widespread use of serum PSA in PCa screening and monitoring, in this study, the use of plasma miRNA-375-3p and tissue miRNAs 375-3p, 21-5p, and 200b-3p, either individually or combined, performed better differentiation between PCa and BPH patients than the use of serum PSA. Based on the results of this study, miR-375-3p is



suggested as a potential non-invasive biomarker for the diagnosis and management of prostate cancer.

*Key-words:* miRNAs. Prostata cancer. Biomarker. Diagnosis.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Biogênese dos miRNAs.....	17
Figura 2 – Representação gráfica da expressão relativa dos miRNAs no plasma e tecido prostático entre os grupos CaP e HPB.....	27
Figura 3 – Curvas ROC para análise dos miRNAs no plasma e no tecido prostático para discriminar amostras com CaP de HPB.....	28
Figura 4 – Curva ROC múltipla da combinação dos miRNAs plasmáticos e PSA para diferenciar indivíduos com CaP e HPB.....	30
Figura 5 – Curva ROC múltipla da combinação dos miRNAs teciduais e PSA para diferenciar indivíduos com CaP e HPB.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos grupos de risco para câncer de próstata.....	14
Tabela 2– miRNAs analisados.....	23
Tabela 3 – Caracterização da amostra.....	25
Tabela 4 – Expressão relativa dos miRNAs entre CaP e HPB no plasma e no tecido prostático.....	26
Tabela 5 – Valores de sensibilidade e especificidade dos miRNAs analisados e PSA a partir da análise das curvas ROC.....	29
Tabela 6 – Análise das curvas ROC dos miRNAs plasmáticos e PSA testados em combinação.....	30
Tabela 7 – Análise das curvas ROC dos miRNAs teciduais e PSA testados em combinação.....	31
Tabela 8 – Expressão dos miRNAs plasmáticos de acordo com o Escore de Gleason da peça cirúrgica.....	32
Tabela 9 – Expressão dos miRNAs teciduais de acordo com o Escore de Gleason da peça cirúrgica.....	33

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	24
2.1. Câncer de próstata .....	24
2.2. Hiperplasia prostática benigna .....	26
2.3. Rastreamento e diagnóstico .....	26
2.4. Os miRNAs.....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	30
3.1. Objetivo geral .....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1. Desenho e população do estudo .....	31
4.2. Critérios de inclusão e exclusão .....	31
4.3. Coleta do material biológico .....	31
4.4. Quantificação dos níveis dos miRNAs alvo por qPCR .....	32
a) Extração de RNA total .....	32
b) Síntese de cDNA.....	33
c) qPCR .....	33
<b>5. ANÁLISE DOS RESULTADOS, NORMALIZAÇÃO E ESTATÍSTICA</b> .....	34
<b>6. ASPECTOS ÉTICOS</b> .....	35
<b>7. RESULTADOS</b> .....	36
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	44
8.1. miRNAs como biomarcadores de CaP .....	45
8.2. Combinação dos miRNAs para o diagnóstico .....	50
<b>9. CONCLUSÃO</b> .....	53
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b> .....	54
<b>11. APÊNDICES</b> .....	58
11.1. Apêndice I. Carta de aprovação do projeto de pesquisa. ....	58
11.2. Apêndice II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	59

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o tipo de câncer mais prevalente, o segundo mais incidente, e a sexta maior causa de morte por câncer na população masculina mundial (FERLAY et al., 2021). A estimativa de ocorrência de CaP nos Estados Unidos para o ano de 2023 era de aproximadamente 288.300 novos casos e cerca de 34.700 mortes pela doença. Cerca de 1 a cada 8 homens foi diagnosticado com câncer de próstata, e aproximadamente 6 em 10 casos são homens com mais de 65 anos de idade, sendo raro em homens com menos de 40 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023). No Brasil, estima-se para o triênio de 2023 a 2025 uma incidência de 71.730 casos de câncer de próstata, o que corresponde a um risco estimado de 67,86 casos novos a cada 100 mil homens (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2022).

Os métodos mais utilizados, disponíveis atualmente para o rastreamento de câncer de próstata consistem na determinação sérica do antígeno prostático-específico (PSA) e no exame de toque retal (DRE). O rastreamento se resume à testagem para detectar câncer na população antes do surgimento de sintomas, mas não é capaz de confirmar a presença de um tumor, necessitando de outros testes para o diagnóstico, caso o paciente apresente alguma anormalidade nos testes de rastreamento. A biópsia de próstata é o padrão-ouro e o único exame capaz de diagnosticar com precisão o câncer de próstata. Em conjunto, outros exames podem ser realizados para auxiliar o diagnóstico de modo geral, como exames de imagem (ressonância magnética e ultrassom) (SHAROVA et al., 2016).

A determinação dos níveis de PSA não é uma abordagem com alta especificidade. Este marcador pode se apresentar alterado em diferentes condições. A hiperplasia prostática benigna (HPB), por exemplo, é a causa mais comum de elevação dos níveis de PSA, podendo ser confundida com suspeita de câncer e frequentemente resultar na indicação de realização de biópsia. De fato, muitas biópsias desnecessárias são realizadas, causando estresse para os pacientes e um alto custo financeiro e logístico para o sistema de saúde. O desenvolvimento de biomarcadores mais apropriados, possivelmente presentes em biópsias líquidas, poderia melhorar muito o manejo de pacientes tanto de CaP quanto de HPB. Um biomarcador pode ser definido como “uma propriedade biológica humana ou animal cuja medida *in vitro* ou identificação é útil para a prevenção, diagnóstico, prognóstico,

tratamento e acompanhamento de uma doença humana ou animal, e para o entendimento dela” (FUENTES-ARDERIU, 2013). Nesse sentido, têm se gerado um grande interesse nos microRNAs (miRNAs) e no seu potencial de suprir essa demanda.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1. Câncer de próstata**

A próstata é uma glândula masculina localizada na parte inferior do abdômen que envolve a uretra e que produz parte do sêmen. Quase todos os tipos de câncer de próstata são adenocarcinomas, que se desenvolvem a partir das células glandulares produtoras do líquido prostático que é adicionado ao sêmen. Em alguns casos, o tumor cresce e se espalha de forma rápida, mas a maioria tem crescimento lento (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2023; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023). No estágio inicial, o CaP pode ser assintomático e frequentemente não tem uma progressão muito significativa, muitas vezes necessitando tratamento mínimo ou nenhum tratamento. No entanto, alguns sintomas incômodos podem surgir, como: dificuldade de urinar, aumento da frequência urinária e noctúria. É importante salientar que esses são sintomas que também ocorrem na hiperplasia prostática benigna (RAWLA, 2019).

Ainda não existe uma maneira de prevenir o CaP, mas é possível adotar hábitos que possam reduzir os riscos de desenvolver a doença. Limitar o consumo de alimentos ricos em gordura, aumentar o consumo de vegetais e frutas e praticar exercícios físicos são exemplos. Mudança no estilo de vida é a estratégia mais interessante para a prevenção do CaP e que proporcionaria muitos benefícios aos homens, com um impacto positivo na saúde pública. Considerando que a carcinogênese prostática dura muitos anos, a modificação de hábitos diários pode representar uma abordagem viável e econômica para prevenir ou retardar o desenvolvimento desse tipo de câncer. O CaP é considerado um câncer da terceira idade, já que 75% dos casos diagnosticados mundialmente ocorrem em homens a partir dos 65 anos e, portanto, a idade também é considerada um fator de risco importante (RAWLA, 2019).

Após receber o diagnóstico de CaP, determinar o estadiamento da doença é uma etapa fundamental para definir o plano terapêutico do paciente. O Escore de Gleason é utilizado para classificar histologicamente os tumores de acordo com o seu grau de diferenciação, ou seja, o quão anormais as células cancerígenas aparentam ser microscopicamente. Tumores com Escore de Gleason mais altos são mais indiferenciados e mais prováveis de crescerem e se disseminarem rapidamente. Como o CaP é um câncer heterogêneo, geralmente existem áreas com diferentes graus de diferenciação (de 1 a 5), então o Escore de Gleason é composto pela soma das duas áreas mais prevalentes no tumor, sendo o primeiro número designado para o grau mais presente. Mais recentemente, surgiu um novo método de classificação de risco dos cânceres de próstata (EPSTEIN et al., 2016), baseado no Escore de Gleason e variando de 1 (provável crescimento e propagação lentos) a 5 (provável crescimento e propagação rápidos), de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1. Classificação dos grupos de risco para câncer de próstata.

<b>Risk Group*</b>	<b>Grade Group</b>	<b>Gleason Score</b>
Low/Very Low	Grade Group 1	Gleason Score $\leq 6$
Intermediate (Favorable/Unfavorable)	Grade Group 2	Gleason Score 7 (3 + 4)
	Grade Group 3	Gleason Score 7 (4 + 3)
High/Very High	Grade Group 4	Gleason Score 8
	Grade Group 5	Gleason Score 9-10

Fonte: Prostate Cancer Foundation (<https://www.pcf.org/about-prostate-cancer/diagnosis-staging-prostate-cancer/gleason-score-isup-grade/>)

O diagnóstico do CaP resulta essencialmente da confirmação histopatológica da biópsia, principalmente em pacientes com níveis de PSA entre 4 e 10 ng/mL. As principais opções terapêuticas para o CaP incluem prostatectomia cirúrgica, terapia neoadjuvante e radioterapia, e envolvem muitos efeitos adversos. Por vezes, ocorre sobrediagnóstico e sobretratamento, e pacientes são submetidos a intervenção cirúrgica ou farmacológica sem a real necessidade (VANACORE et al., 2017). De forma geral, melhorar o manejo do câncer de próstata vai fornecer benefícios individuais e sociais devido ao grande impacto dessa doença (CANNISTRACI et al., 2014).

## 2.2. Hiperplasia prostática benigna

A HPB é uma das doenças mais comuns em homens, e é considerada uma condição natural do envelhecimento masculino. Ela é caracterizada pela proliferação de células da zona de transição da próstata, gerando um aumento da glândula que começa a provocar sintomas do trato urinário inferior, podendo haver a necessidade de intervenção cirúrgica, porém a mortalidade associada à HPB é muito rara. Os sintomas da retenção urinária causada pela proliferação celular na HPB incluem jato urinário fraco, esforço para urinar, urgência urinária, incontinência urinária, noctúria, disúria e hematória. Esses sintomas não são específicos da hiperplasia, podendo ocorrer também no câncer de próstata (LIMA; ALVES, 2013).

## 2.3. Rastreamento e diagnóstico

Muitos casos de CaP são detectados baseados em níveis elevados de PSA (>4 ng/mL), uma glicoproteína normalmente expressa pelo tecido prostático (RAWLA, 2019). Desde que o PSA foi introduzido no rastreamento de CaP, houve uma melhora tanto na detecção precoce quanto nos quadros de mortalidade pela doença, mas o nível sérico desse biomarcador pode ser uma consequência de diferentes eventos como hiperplasia prostática benigna, ejaculação, trauma, inflamação e infecção, ou uso de medicamentos (CANNISTRACI et al., 2014; CASTILLEJOS-MOLINA; GABILONDO-NAVARRO, 2016; FERRO et al., 2016). Portanto, mesmo que valores elevados de PSA indiquem uma alta probabilidade de detecção de câncer em uma biópsia, não é possível utilizá-los para discriminar o CaP de processos inflamatórios ou hiperplásicos, por isso a biópsia do tecido prostático é o padrão para confirmar a presença do câncer (RAWLA, 2019; SHAROVA et al., 2016).

Quando há suspeita de CaP por elevação do PSA ou alterações no toque retal após um achado benigno, a chance de o diagnóstico de câncer ocorrer na rebiópsia é de cerca de 10% (LIMA; ALVES, 2013). Da mesma forma que o PSA não apresenta alta especificidade, o exame de toque retal não é muito sensível, e como o PSA é influenciado por alterações não-neoplásicas, os pacientes acabam sendo submetidos a biópsias repetitivas. Inclusive, é possível que mesmo após a avaliação do tecido biopsiado, o diagnóstico continue inconclusivo, causando muito estresse nos pacientes (CANNISTRACI et al., 2014; FABRIS et al., 2016). Ferramentas melhores e menos invasivas para a detecção do CaP são necessárias. Além disso, o prognóstico



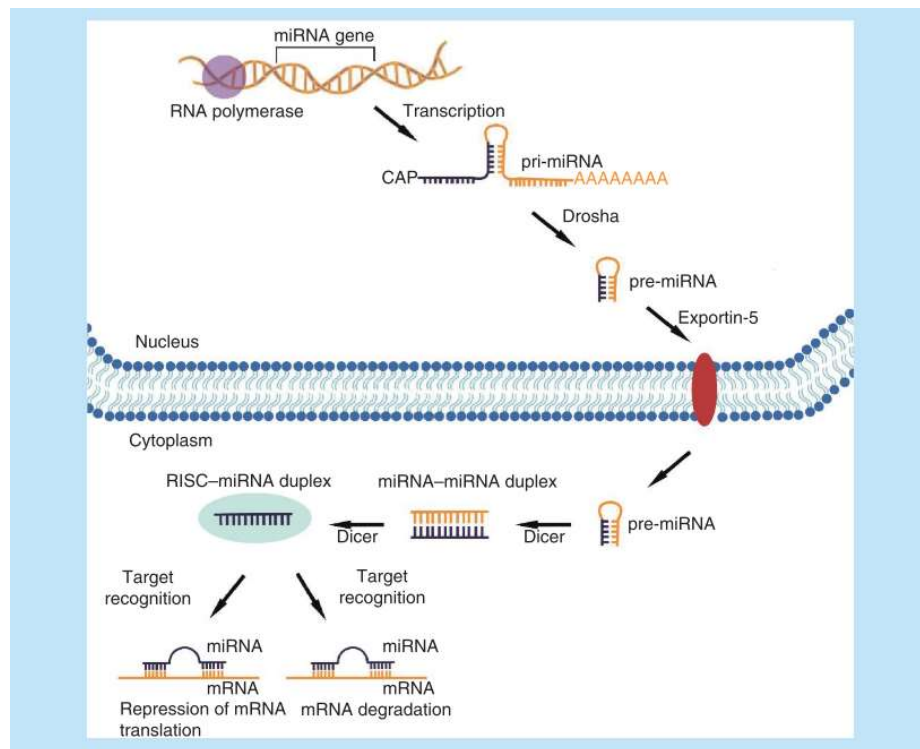
do CaP é altamente heterogêneo, enquanto um câncer pode ser agressivo e necessitar de tratamento imediato para prevenção de disseminação, outro pode ser mais leve e nem sequer progredir para uma doença clinicamente significativa (HALDRUP et al., 2014). Portanto, o rastreamento em massa baseado no PSA acaba se tornando uma prática cara e que pode resultar em sobrediagnóstico e consequente sobretratamento de casos que não precisariam de intervenção, pois além do seu papel no diagnóstico, o PSA também é usado para monitorar a progressão da doença (PAYNE; CORNFORD, 2011). O grande problema do sobrediagnóstico no câncer de próstata é o que isso significa em termos de qualidade de vida para o paciente (KLOTZ, 2013).

#### 2.4. Os miRNAs

Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificadores, de aproximadamente 21 a 23 nucleotídeos, que controlam a expressão gênica de maneira pós-transcricional (BLONDAL et al., 2013). Essas moléculas estão envolvidas em diversos processos celulares como diferenciação, proliferação e apoptose e, portanto, a associação entre miRNAs e doenças humanas, particularmente o câncer, já é bem estabelecida (CHEN; CALIN; MENG, 2014). Além disso, os miRNAs estão presentes em fluidos biológicos como plasma e soro com uma certa estabilidade, chamando atenção para o seu potencial como biomarcadores para diversas patologias (BLONDAL et al., 2013).

A biogênese dos miRNAs é um processo complexo (Figura 1). De forma resumida, eles se originam no núcleo com a formação do miRNA primário (pri-miRNA), previamente transcrito pela RNA polimerase II (Pol II). Esse pri-miRNA é identificado e clivado por uma proteína (Drosha) para obter o miRNA precursor (pre-miRNA) que, por sua vez, é transportado para fora do núcleo com o auxílio de outras proteínas. No citoplasma, o pre-miRNA é clivado novamente por outra enzima (Dicer), tornando-se um RNA de dupla fita de aproximadamente 22 nucleotídeos. Posteriormente, esse RNA de dupla fita é reconhecido por uma enzima, principalmente pela Argonata, podendo uma das fitas ser degradada, enquanto a outra forma o complexo RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA). Após serem incorporados ao complexo RISC, os miRNAs podem exercer a função silenciadora em seus alvos de RNA mensageiro (mRNA) correspondentes (FILELLA; FOJ, 2017; VANACORE et al., 2017).

Figura 1. Biogênese dos miRNAs.



Fonte: DILSIZ, 2020

A associação entre miRNAs circulantes e o desenvolvimento, progressão e tratamento de câncer tem sido muito investigada. Biomarcadores diagnósticos são aqueles que monitoram populações de risco, detectando o câncer nos seus estágios iniciais e discriminando entre doenças benignas e malignas. Já os biomarcadores prognósticos são usados para prever o seguimento da doença, estimando a sua progressão e recorrência. E os biomarcadores de resposta a tratamento são aqueles que podem monitorar a sensibilidade de terapias e a resposta a tratamentos específicos a fim de influenciar as decisões médicas. Os miRNAs são muito estudados como biomarcadores para todas essas finalidades (CHEN; CALIN; MENG, 2014).

Acredita-se que os miRNAs controlam cerca de 60% de todos os genes codificadores de proteína humanos, tendo diferentes funções que vão variar de acordo com os seus alvos. Essas moléculas quando muito expressas ou pouco expressas são extremamente importantes para o desenvolvimento do câncer por alterarem a expressão de oncogenes, genes supressores de tumor e, portanto, vias de sinalização envolvidas na tumorigênese. Os chamados “onco-miRNAs” são super expressos em células cancerígenas e a sua principal função é a degradação do mRNA de genes supressores de tumor, diminuindo sua atividade e, assim, favorecendo a formação e

crescimento de tumores. Já os miRNAs supressores de tumor, quando altamente expressos, inibem o crescimento tumoral pela inativação da expressão de oncogenes, estando frequentemente pouco expressos no câncer (DILSIZ, 2020).

Os miRNAs podem estar presentes na circulação de diferentes formas: vazamento passivo de células que sofrem algum tipo de lesão, inflamação crônica, apoptose ou necrose; secreção ativa através vesículas de membrana derivadas de células, como micropartículas, exossomos e corpos apoptóticos; secreção ativa por um complexo proteína-miRNA, onde os miRNAs podem se associar com proteínas como a lipoproteína de alta densidade (HDL) ou a própria Argonauta (KAMAL; SHAHIDAN, 2020). Esses miRNAs “móveis” podem ser chamados de “hormomirs” por possuírem características de hormônios, podendo agir localmente ou longe de onde foram liberados, com a finalidade de manter a homeostase normal ou influenciar o desenvolvimento e progressão de doenças como o câncer (SELTH; TILLEY; BUTLER, 2012).

A ideia de validar biópsias líquidas para a detecção de câncer é empolgante e está ganhando popularidade devido a vantagem de ser minimamente invasiva, de fácil realização, indolor, não necessitar de muito volume de amostra, ter menor custo, alta acurácia e alto rendimento (DILSIZ, 2020). Apesar dos vários estudos realizados nas últimas décadas tentando entender a relação dos miRNAs com o CaP, ainda existe uma grande variabilidade nos dados reportados (SHARMA; BARUAH, 2019). Isso provavelmente ocorre devido à inconsistência metodológica entre diferentes estudos, a falta de genes apropriados para normalização e amostragens pouco representativas (SELTH; TILLEY; BUTLER, 2012). Entender o papel de alguns miRNAs e a implicação deles no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata poderia levar a uma melhora no curso da doença e a descobrir novas opções terapêuticas. Muitas pesquisas têm demonstrado que os miRNAs são úteis para o diagnóstico e prognóstico de CaP (VANACORE et al., 2017).

Um estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa investigou a expressão de miRNAs entre casos de CaP (biópsia positiva) e controles (biópsia negativa). Em amostras de tecido de próstata, foram identificados seis miRNAs diferentemente expressos entre os grupos: miR-148<sup>a</sup>-3p, miR-18<sup>a</sup>-5p, miR-200b-3p, miR-205-5p, miR-21-5p e miR-375-3p. Em amostras de plasma, apenas cinco

apresentaram diferença entre casos e controles: miR-100-5p, miR-200b-3p, miR-214-3p, miR-375-3p e miR-548am-5p. Todos esses miRNAs foram mais expressos em pacientes com câncer do que no grupo controle, com exceção do miR-205-5p (no plasma), que foi mais expresso no grupo controle. Desses alvos, quatro passaram por uma fase de validação (miR-21-5p, miR-375-3p, miR-200b-3p e miR-548am-5p), onde nas amostras de tecido se mantiveram mais expressos em CaP o miR-21-5p (AUC: 0,740), miR-375-3p (AUC: 0,815) e miR-200b-3p (AUC: 0,680), e nas amostras de sangue, apenas o miR-375-3p (AUC: 0,677) continuou mais expresso em CaP do que em controles (PAIVA et al., 2020).

Utilizando essa referência, o presente estudo selecionou três alvos (miR-21-5p, miR-375-3p e miR-200b-3p) que se destacaram para serem analisados no tecido prostático e sangue de pacientes com CaP e pacientes com HPB. Como o câncer de próstata é comumente “mimetizado” pela hiperplasia prostática benigna, e o PSA não é um biomarcador eficiente para diferenciar essas duas patologias, acredita-se que para obter resultados mais conclusivos, o grupo controle deve ser composto por pacientes com HPB (ABRAMOVIC et al., 2021).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a expressão de miRNAs em tecido prostático e sangue em amostras de pacientes com câncer de próstata e pacientes com hiperplasia prostática benigna.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- a) Comparar a expressão dos miRNAs analisados em tecido prostático e sangue entre os grupos;
- b) Avaliar se a combinação de miRNAs expressos nos diferentes grupos indica melhor especificidade;
- c) Avaliar a possível proposição desses miRNAs como biomarcadores precoces de CaP.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Desenho e população do estudo

O estudo realizado foi do tipo transversal. As coletas foram realizadas no período de agosto de 2022 a agosto de 2023. Foram avaliadas amostras de indivíduos adultos do sexo masculino atendidos no Serviço de Urologia do HCPA (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), que realizaram cirurgias de prostatectomia simples ou ressecção transuretral de próstata para HPB, e prostatectomia radical para CaP. Após aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram coletadas amostras de tecido prostático e sangue de todos os pacientes que concordaram em participar do estudo. Foram recrutados 66 pacientes, sendo 33 do grupo CaP e 33 do grupo HPB. O tamanho amostral foi calculado baseado nos valores de expressão relativa do miR-21-5p, obtido em trabalho prévio do grupo, submetido a publicação (PAIVA et al., 2020), considerando um poder estatístico de 90% e nível de significância de  $p \leq 0,05$  para a variável expressão de miRNA no tecido prostático.

### 4.2. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo os indivíduos do sexo masculino que tiveram indicação clínica de realizar cirurgia de próstata e que consentiram a participação no estudo.

Foram excluídos do estudo os indivíduos com diagnóstico de outros carcinomas.

### 4.3. Coleta do material biológico

A coleta do tecido prostático foi realizada no momento da cirurgia pelo médico urologista responsável. Foram coletados fragmentos de tecido prostático de pacientes com CaP e pacientes com HPB. Os fragmentos coletados de CaP foram devidamente identificados e divididos em dois fragmentos menores, um deles foi colocado individualmente em um microtubo de 1,5 mL contendo 500  $\mu$ L de RNA later (solução estabilizadora de RNA), e outro foi colocado em um tubo de formol e foi enviado para análise anatomopatológica. Essa análise anatomopatológica é apenas um controle interno sobre a coleta do tecido, verificando se o fragmento coletado na cirurgia pertencia, de fato, a uma área neoplásica da próstata. A coleta de sangue também foi

realizada durante a cirurgia e foi feita pelo médico anestesista responsável, onde foi coletado um tubo de EDTA de 4 mL de sangue total de cada paciente.

Os materiais biológicos coletados para este estudo foram imediatamente enviados ao laboratório para serem processados e armazenados corretamente para análise posterior. Os fragmentos de tecido ficaram armazenados em geladeira por 24 horas no RNA later, e após, o RNA later foi removido, e o fragmento foi congelado no ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O sangue total foi processado para separar o plasma em até 2 horas após a coleta. Primeiro, o sangue foi centrifugado a 1.900 g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , seguido de uma nova centrifugação a 16.000 g por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , para remover ao máximo os restos celulares. O plasma foi armazenado em alíquotas no ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso.

A partir da confirmação dos resultados do exame anatomopatológico da peça cirúrgica, os pacientes foram divididos em dois grupos, pacientes com CaP ou pacientes com HPB. Para o grupo CaP, os pacientes foram subdivididos de acordo com o estadiamento do tumor em dois grupos: risco baixo, composto pelo Escore de Gleason igual ou menor que 7 (3+4); e risco alto, composto pelo Escore de Gleason igual ou maior que 7 (4+3) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2023).

#### 4.4. Quantificação dos níveis dos miRNAs alvo por qPCR

##### a) *Extração de RNA total*

A extração do RNA total das amostras de tecido prostático e plasma sanguíneo foi realizada com os reagentes MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA), de forma automatizada no Extracta 96 (Loccus, BR), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante.

Durante a etapa de lise das amostras, foi adicionada uma solução de RNA exógeno, *Caenorhabditis elegans* miR-39 (cel-miR-39), obtendo-se uma concentração final de 1 pM de cel-miR-39 em cada amostra a ser extraída. A finalidade deste procedimento foi utilizar este RNA sintético como controle interno da eficiência do processo de extração e do ensaio de qPCR. Neste caso, um controle exógeno é um oligonucleotídeo de RNA sintético com uma sequência alvo de miRNA que não está presente na amostra humana a ser analisada. Além do normalizador exógeno, também foi utilizado um normalizador endógeno, o miR-24-3p, que é um miRNA que está expresso de forma estável nos grupos analisados, o chamado de gene

“*housekeeping*”. O miR-24-3p foi escolhido como normalizador nesse estudo devido a sua expressão em estudo anterior realizado pelo grupo (PAIVA et al., 2020). O RNA extraído foi imediatamente armazenado a -80°C até o uso.

#### *b) Síntese de cDNA*

Foi realizado o processo de transcrição reversa (RT) dos miRNAs contidos no RNA total extraído dos dois espécimes clínicos para síntese do cDNA. A conversão de RNA para cDNA foi realizada com o uso do TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Para amostras de tecido, o *input* inicial de RNA foi 2 µl com concentração de 5 ng/µL. Para o plasma, o *input* inicial foi 2 µl da eluição do RNA da etapa de extração. Foi realizada uma etapa de pré-amplificação do cDNA para aumentar a sua quantidade antes da análise de expressão gênica por qPCR, uma vez que a quantidade de miRNAs após a extração é baixa. A reação de pré-amplificação é uma das etapas que está inserida no kit de conversão, de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs originados foram armazenados a temperatura de -20°C até o momento da amplificação por PCR em tempo real (qPCR).

#### *c) qPCR*

As qPCRs dos produtos originados no passo anterior foram realizadas em um termociclador StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific, EUA), empregando-se os kits TaqMan Fast Advanced Master Mix e sondas TaqMan Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, EUA). As sondas foram selecionadas a partir de resultados de um *screening* realizado anteriormente pelo grupo de pesquisa. Nessa etapa, também foram utilizadas as sondas do cel-miR-39 e miR-24-3p como normalizadores exógeno e endógeno da reação, respectivamente. As sequências dos miRNAs alvos e os códigos de catálogo dos ensaios utilizados estão descritos na Tabela 2. Os resultados foram analisados com o auxílio do software ThermoCloud (ThermoFischer).

Tabela 2. miRNAs analisados

miRNA	Sequência 5´ 3´	Ensaio TaqMan
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	477975_mir
hsa-miR-375-3p	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	478074_mir
hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAUAUGAUGA	477963_mir
hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	477992_mir
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG	478293_mir

## 5. ANÁLISE DOS RESULTADOS, NORMALIZAÇÃO E ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados de qPCR, as expressões relativas dos miRNAs das amostras foram calculadas usando o método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , descrito por Livak e Schmittgen (2001), e a expressão foi considerada detectada quando os valores de Ct fossem  $\leq 35$ .

Nesse estudo foram preparadas duas amostras calibradoras, uma para cada espécime clínico (tecido e plasma), a partir de um *pool* de RNAs, combinando-se tanto amostras de pacientes com CaP quanto de pacientes com HPB. A expressão relativa dos miRNAs foi calculada com base nas etapas:

- a) Primeiro, o Ct do miRNA alvo foi normalizado em relação ao miRNA normalizador ou de referência (miR-24-3p), tanto para a amostra teste quando para o calibrador:

$$\Delta Ct_{(amostra)} = Ct_{(miR\ alvo, amostra)} - Ct_{(miR\ ref, amostra)}$$

$$\Delta Ct_{(calibrador)} = Ct_{(miR\ alvo, calibrador)} - Ct_{(miR\ ref, calibrador)}$$

- b) Posteriormente, normalizou-se o  $\Delta Ct$  da amostra em relação ao  $\Delta Ct$  do calibrador:



$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(amostra)} - \Delta Ct_{(calibrador)}$$

c) E por fim, calculou-se a razão de expressão:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{razão de expressão normalizada}$$

O resultado da razão de expressão é dado em *fold change*, a quantidade relativa do miRNA alvo em comparação ao calibrador, sendo ambos normalizados pela expressão do miRNA de referência.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o pacote estatístico SPSS (v.18.0) para Windows (SPSS, 2009). Os dados qualitativos foram descritos em frequências absolutas e relativas. A distribuição de normalidade dos dados quantitativos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo descritos como média e desvio padrão ou mediana e IQR. As diferenças nos níveis de miRNA entre os grupos de amostras foram avaliadas usando-se o teste T de Student ou o teste U de Mann-Whitney, conforme normalidade. Para investigar o poder discriminatório dos miRNAs desregulados entre as amostras de pacientes com CaP e com HPB, foram geradas curvas ROC (*receiver-operating characteristic*) e calculadas as áreas sob as curvas (*areas under the curves* – AUCs). Para combinação dos biomarcadores foi aplicada a análise de regressão logística. Diferenças estatisticamente significativas foram estabelecidas em  $p \leq 0,05$ .

## 6. ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (Apêndice I) e todos os pacientes foram consultados sobre a utilização do material para fins de pesquisa científica, através da assinatura do TCLE. Caso concordassem com a participação no estudo, assinavam o TCLE (Apêndice II). O trabalho foi realizado em concordância com a resolução CNS 441/2011, que regulamenta a pesquisa em seres humanos. Os pesquisadores declaram conhecer e cumprir os requisitos da Lei Geral de proteção de Dados (Lei Nº 13.709, de 14 de agosto de 2018) quanto ao tratamento de dados pessoais que foram utilizados para a execução do presente projeto de pesquisa.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- ABRAMOVIC, I. et al. MiR-182-5p and miR-375-3p Have Higher Performance Than PSA in Discriminating Prostate Cancer from Benign Prostate Hyperplasia. **Cancers**, v. 13, n. 9, 2021.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer types**. Atlanta: American Cancer Society, 2023. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/types/prostate-cancer.html#>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- BIDARRA, D. et al. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Metastasis Development Prediction. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 2019.
- BLONDAL, T. et al. Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. **Methods**, v. 59, n. 1, 2013.
- BRASE, J. C. et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 3, p. 608–616, 2011.
- BRYANT, R. J. et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 4, p. 768–774, 2012.
- CANNISTRACI, A. et al. MicroRNA as New Tools for Prostate Cancer Risk Assessment and Therapeutic Intervention: Results from Clinical Data Set and Patients' Samples. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- CASTILLEJOS-MOLINA, R. A.; GABILONDO-NAVARRO, F. B. Prostate cancer. **Salud pública de México**, v. 58, n. 2, p. 279–284, 2016.
- CHEN, M.; CALIN, G. A.; MENG, Q. H. Circulating microRNAs as promising tumor biomarkers. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 67, p. 189–214, 2014.
- CORTEZ, M. A. et al. MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 8, p. 467–477, 2011.
- DAMODARAN, M. et al. Differentially expressed miR-20, miR-21, miR-100, miR-125a and miR-146a as a potential biomarker for prostate cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 4, p. 3349–3356, 2021.
- DILSIZ, N. Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. **Future Science OA**, v. 6, n. 4, 2020.
- EPSTEIN, J. I. et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 244–252, 2016.
- FABRIS, L. et al. The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers. **European Urology**, v. 70, n. 2, p. 312–322, 2016.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 2021.

FERREIRA DE SOUZA, M. et al. Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0184094, 2017.

FERRO, M. et al. Biomarkers in localized prostate cancer. **Future Oncology**, v. 12, n. 3, p. 399–411, 2016.

FILELLA, X.; FOJ, L. MiRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 55, n. 5, p. 715–736, 2017.

FUENTES-ARDERIU, X. What is a biomarker? It's time for a renewed definition. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 9, p. 1689–1690, 2013.

HALDRUP, C. et al. Profiling of circulating microRNAs for prostate cancer biomarker discovery. **Drug Delivery and Translational**, v. 4, p. 19–30, 2014.

HE, S. et al. The expression of miR-375 in prostate cancer: A study based on GEO, TCGA data and bioinformatics analysis. **Pathology Research and Practice**, v. 215, n. 6, 2019.

HUANG, X. et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as Prognostic Markers in Castration-resistant Prostate Cancer. **European Urology**, v. 67, n. 1, p. 33–41, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Câncer. Tipos de câncer. **Câncer de próstata**. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>. Acesso em: 15 nov. 2023.

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

JIN, W. Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial–Mesenchymal Transition. **Cells**, v. 9, n. 217, p. 1–23, 2020.

JOKOVIĆ, S. M. et al. MiR-375 and miR-21 as Potential Biomarkers of Prostate Cancer: Comparison of Matching Samples of Plasma and Exosomes. **Genes**, v. 13, n. 12, 2022.

KAMAL, N. N. S. B. N. M.; SHAHIDAN, W. N. S. Non-exosomal and exosomal circulatory MicroRNAs: Which are more valid as biomarkers? **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2020.

KHAN, M. M. et al. Identification of Potential Key Genes in Prostate Cancer with Gene Expression, Pivotal Pathways and Regulatory Networks Analysis Using Integrated Bioinformatics Methods. **Genes**, v. 13, n. 655, 2022.

KLOTZ, L. Prostate cancer overdiagnosis and overtreatment. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 20, n. 3, p. 204–209, 2013.

LI, C. et al. Roles and mechanisms of exosomal non-coding RNAs in human health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–31, 2021.

LI, T. et al. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 383, n. 3, p. 280–285, 2009.

LI, T. et al. MiR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. **Journal of Urology**, v. 187, n. 4, p. 1466–1472, 2012.

LIMA, H.; ALVES, R. S. **UROLOGIA Brasil**: Hiperplasia prostática benigna: epidemiologia, patologia, fisiopatologia, quadro clínico e diagnóstico. 1ª ed. São Paulo: PlanMark, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression. Data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 24, n. 4, p. 402–408, 2001.

MISHRA, S. et al. Androgen receptor and microRNA-21 axis downregulates transforming growth factor beta receptor II (TGFBR2) expression in prostate cancer. **Oncogene**, v. 33, n. 31, p. 4097–4106, 2014.

Paiva, Rodrigo Minuto. **Avaliação de microRNAs como biomarcadores moleculares no câncer de próstata**. 2020. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 14 de dezembro de 2020.

PAIVA, R. M. et al. Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review. **Clinical and Translational Oncology**, v. 22, n. 11, p. 2061–2073, 2020.

PAYNE, H.; CORNFORD, P. Prostate-specific antigen: An evolving role in diagnosis, monitoring, and treatment evaluation in prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 29, n. 6, p. 593–601, 2011.

PEŁKA, K. et al. miR-96-5p, miR-134-5p, miR-181b-5p and miR-200b-3p heterogenous expression in sites of prostate cancer versus benign prostate

hyperplasia—archival samples study. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 155, n. 3, p. 423–433, 2021.

RAWLA, P. Epidemiology of prostate cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p. 63–89, 2019.

REIS, S. T. et al. MiR-21 may acts as an oncomir by targeting RECK, a matrix metalloproteinase regulator, in prostate cancer. **BMC Urology**, v. 12, n. 14, 2012.

SELTH, L. A. et al. A ZEB1-miR-375-YAP1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer. v. 36, n. 1, p. 24–34, 2016.

SELTH, L. A.; TILLEY, W. D.; BUTLER, L. M. Circulating microRNAs: Macro-utility as markers of prostate cancer? **Endocrine-Related Cancer**, v. 19, n. 4, p. 99–113, 2012.

SHARMA, N.; BARUAH, M. M. The microRNA signatures: aberrantly expressed miRNAs in prostate cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 21, p. 126–144, 2019.

SHAROVA, E. et al. A circulating miRNA assay as a first-line test for prostate cancer screening. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 12, p. 1362–1366, 2016.

VANACORE, D. et al. Micrnas in prostate cancer: an overview. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 50240–50251, 2017.

XIA, L. et al. Transcriptional regulation of PRKAR2B by miR-200b-3p/200c-3p and XBP1 in human prostate cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 124, 2020.

YAN, J. W.; LIN, J. S.; HE, X. X. The emerging role of miR-375 in cancer. **International Journal of Cancer**, v. 135, n. 5, p. 1011–1018, 2014.

ZHAO, Z. et al. A novel predictor tool of biochemical recurrence after radical prostatectomy based on a five-microRNA tissue signature. **Cancers**, v. 11, n. 10, p. 1603, 2019.

## 11. APÊNDICES

### 11.1. Apêndice I. Carta de aprovação do projeto de pesquisa.



**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**DIRETORIA DE PESQUISA**

**Carta de Aprovação**

**Projeto**

2022/0376

**Pesquisadores:**

**ILMA SIMONI BRUM DA SILVA**

JOÃO VITOR BARBOZA CARDOSO	EMILLY BRANDAO SCHUCK	LILIANE GHI MEI LAW
LUCAS DA CUNHA ALMEIDA	CAROLINA VACCARI BATISTA	SARA HARTKE
EDISON CAPP	GABRIELA PASQUALIM	MARCELO QUINTANILHA AZEVEDO
HENRIQUE LEAL DE OLIVEIRA	VICTÓRIA BORGAMANN ANTONIO DE SOUZA	MONICA WLACH

**Número de Participantes:** 82

**Título:** Análise de miRNAs como biomarcadores para câncer de próstata

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final à Diretoria de Pesquisa (DIPE).

20/01/2023



Assinado digitalmente por:  
PATRICIA ASHTON PROLLA

DIRETORIA DE PESQUISA  
23/01/2023 15:54:42

Assinatura digitalizada por: https://www.sigil.com.br/assinatura-digitalizada/assinatura-digitalizada.html?sigil=20230120155442

## 11.2. Apêndice II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número do projeto GPPG ou CAAE:

Título do Projeto: Análise de miRNAs como biomarcadores para câncer de próstata

**Prezado Sr.** \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é identificar características genéticas que possam estar associadas ao desenvolvimento de câncer de próstata. A expressão modificada de alguns marcadores genéticos pode auxiliar a diagnosticar essas doenças. Como o Sr. tem o diagnóstico de \_\_\_\_\_ e lhe foi recomendado cirurgia, gostaríamos de convidá-lo para participar do estudo. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Departamento de Fisiologia da UFRGS.

Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que, após retirada da peça cirúrgica, dois pequenos fragmentos da mesma (10 mm x 5 mm) sejam encaminhados para estudo genético. O restante da peça cirúrgica será destinado ao exame histopatológico normal. Portanto, não haverá modificação da técnica cirúrgica. Além disso, será coletada uma amostra de sangue antes da cirurgia. Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, no entanto, poderá haver desconforto pela coleta sanguínea.

Se o senhor concordar, armazenaremos as amostras por até 5 anos para que outras características possam ser analisadas no futuro, em outros trabalhos de nosso grupo (nesse caso, estes trabalhos serão também apresentados ao Comitê de Ética em Pesquisa e, se possível, será solicitado novo Termo de Consentimento como este). No futuro, essas características poderão auxiliar na identificação de pacientes com diagnóstico de tumores de próstata. No entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o senhor.

O senhor é livre para decidir por participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade.

Este projeto foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição (fone: 51 21018290).

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, pelo telefone (51) 999969044, ou com a pesquisadora Mônica Wlach, pelo telefone (51) 996980502 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, telefone (51) 33596246 ou Av. Protásio Alves, 211 - Portão 4 - 5º andar do Bloco C - Rio Branco - Porto Alegre/RS, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

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

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_