

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

Maxuel Cruz dos Santos

**AVALIAÇÃO DE MicroRNAs URINÁRIOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS  
NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Porto Alegre  
2022

Maxuel Cruz dos Santos

**AVALIAÇÃO DE MicroRNAs URINÁRIOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS  
NO 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 em Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilma Simoni Brum da Silva

Porto Alegre

2022

Cruz dos Santos, Maxuel  
Avaliação de miRNAs urinários diferencialmente  
expressos no câncer de próstata / Maxuel Cruz dos  
Santos. -- 2022.  
52 f.  
Orientadora: Ilma Simoni Brum da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Câncer de Próstata. 2. microRNA. 3.  
Biomarcadores urinários. I. Simoni Brum da Silva,  
Ilma, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo autor.

Maxuel Cruz dos Santos

**AVALIAÇÃO DE MICRORNAS URINÁRIOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS  
NO 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 em Fisiologia.

Aprovado em: 16 de setembro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Professor Doutor Guilherme Baldo

---

Professora Doutora Gisele Branchini

---

Professora Ionara Rodrigues Siqueira

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa Adriana pelo apoio diário e incentivo em permanecer no Mestrado mesmo em meio a pandemia e mudanças familiares, muito obrigado por seu amor e apoio incondicional;

Aos meus filhos Isabella, Luis, Rafaella e Manuella que são meus maiores incentivadores para buscar conhecimento através da pesquisa e contribuir para um mundo melhor;

Aos meus pais Luis e Vera que me ensinaram a importância de buscar conhecimento em todos os momentos;

Aos meus sogros Antônio e Deuzenir que dividiram os cuidados com as crianças para que eu conseguisse realizar as pesquisas e disciplinas previstas;

Agradeço a minha orientadora Professora orientadora Dr<sup>a</sup> Ilma pelos ensinamentos, conversas e soluções de problemas, mesmo sem saber, muitas vezes quando pensei em desistir, ela tinha sempre as respostas para os problemas;

À Carolina e João que me ajudaram com os experimentos e organização dos resultados;

Ao Rodrigo pela criação e estruturação do projeto maior que deu luz à minha questão de pesquisa e por toda ajuda no decorrer do mestrado;

À professora Gabriela por dividir seus saberes em todas as etapas do meu mestrado sendo incansável e sempre disposta a contribuir com seus conhecimentos;

À UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia que tornou possível o desenvolvimento desta pesquisa.

*“Tudo o que persistimos torna-se mais fácil  
Não por que a natureza da coisa mudou  
Mas nosso poder de suportá-la aumentou”  
David O. Mackey*

## RESUMO PORTUGUÊS

**Introdução:** O câncer de próstata (CaP) é a segunda neoplasia mais frequente em homens no mundo, a taxa de mortalidade é alta devido primariamente ao fato de a doença tornar-se clinicamente aparente após o surgimento de metástases. A busca de biomarcadores urinários para o CaP, especialmente microRNAs, tem sido estudados nos últimos anos podendo tornar-se um marcador específico para o CaP e evitar procedimentos desnecessários. **Objetivo:** Avaliar a expressão diferencial de miRNA urinários em pacientes com biópsias positivas e negativas utilizando o sobrenadante urinário. **Métodos:** O estudo foi do tipo transversal, desenvolvido em 36 meses, avaliando amostras de pacientes com indicação de biópsia de próstata. Foi realizado a extração de RNA total do sobrenadante urinário e a Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa, sendo analisados os miRNAs mir-200b-3p, mir-21-5p e mir-375. O nível de expressão gênica foi calculado com o método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **Resultados:** 22 pacientes com câncer de próstata e 28 controles foram analisados, os pacientes com CaP apresentaram superexpressão de cerca de 2,5x de miR-200-3p em comparação ao grupo controle, com medianas de *fold change* de 4,05 e 1,52 (P=0,004); respectivamente. A expressão relativa de miR-375 foi maior nos pacientes com CaP em comparação ao controle, com medianas de *fold change* respectivamente de 2,75x e 1,46x (P = 0,0004). A expressão relativa de miR-21-5p apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos identificando uma maior expressão nos pacientes com CaP em comparação ao controle, com mediana aproximadamente 4x maior (P = 0,001). Não foi encontrada correlação entre a expressão dos miRNAs estudados e os níveis de PSA dos pacientes, o que reforça a baixa especificidade do PSA como marcador específico para diagnóstico da CaP. **Conclusão:** Os mir-200b-3p, miR-21-5p e miR-375 urinário podem ser sugeridos como biomarcadores urinários para auxiliar a realização do diagnóstico tumoral de modo não invasivo, podendo contribuir para a redução no número de biópsias desnecessárias e suas repercussões clínicas desfavoráveis. O fluido urinário possui grande variabilidade na expressão de microRNAs, sendo necessário o desenvolvimento de estudos com maior número de participantes, para uma padronização com potencial uso do sobrenadante urinário como fonte de análise para os miRNAs sugeridos como biomarcadores.

**Descritores:** Câncer de Próstata; Biomarcadores urinários; miRNA.

## ABSTRACT

**Introduction:** Prostate cancer (PCa) is the second most frequent neoplasm in men in the world, the mortality rate is high due primarily to the fact that the disease becomes clinically apparent after the appearance of metastases. The search for urinary biomarkers for PCa, especially microRNAs, has been studied in recent years and may become a specific marker for PCa and avoid unnecessary procedures. **Objective:** To evaluate the differential expression of urinary miRNA in patients with positive and negative biopsies using urinary supernatant. **Methodology:** The study was cross-sectional, developed over 36 months, evaluating samples from patients with an indication for prostate biopsy. Total RNA was extracted from the urinary supernatant and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. MiRNAs mir-200b-3p, miR-21-5p and miR-375 were analyzed. The level of gene expression was calculated using the method  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . **Results:** 22 patients with prostate cancer and 28 controls were analyzed. Patients with PCa showed about 2,5x overexpression of miR-200-3p compared to the control group, with median fold change of 4,05 and 1,52 respectively. The relative expression of miR-375 was higher in patients with PCa compared to controls, with median fold changes of 2,75x and 1,46x respectively ( $P = 0,004$ ). The relative expression of miR-21-5p showed a statistically significant difference between the groups, identifying a higher expression in patients with PCa compared to the control, with a median approximately 4x higher ( $P = 0.001$ ). No correlation was found between the expression of the studied miRNAs and the PSA levels of the patients, which reinforces the low specificity of PSA as a specific marker for PCa diagnosis. **Conclusion:** Urinary mir-200b-3p, miR-21-5p and miR-375 can be suggested as urinary biomarkers to assist in performing tumor diagnosis in a non-invasive way, which may contribute to a reduction in the number of unnecessary biopsies and their unfavorable clinical repercussions. The urinary fluid presents great variability in the expression of microRNAs, being necessary the development of studies with larger number of participants, for a standardization with potential use of the urinary supernatant as a source of analysis for the miRNAs suggested as biomarkers. **Keywords:** Prostate Cancer; Urinary biomarkers; miRNA



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Zonas da próstata .....	18
Figura 2: Biogênese dos microRNAs .....	23
Figura 3: Expressão gênica relativa de hsa-miR-200b-3p normalizada por cel-mir-399 .....	33
Figura 4: Expressão gênica relativa de hsa-miR-375 normalizada por cel-mir-399 7 .....	34
Figura 5: Expressão gênica relativa de hsa-miR-21-5p normalizada por cel-mir-399 .....	35
Figura 6: Curva ROC miR-200b-3p .....	36
Figura 7: Curva ROC miR-375 .....	37
Figura 8: Curva ROC miR-21-5p .....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: miRNAs avaliados .....	31
Tabela 2: Características dos pacientes analisados no estudo .....	32
Tabela 3: Análise de correlação entre PSA e os mi-RNAs analisados .....	39
Tabela 4: Análise de correlação entre valores de Gleason e os miR-RNAs analisados .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**CaP** - Câncer de próstata

**CCA** – Centro Cirúrgico Ambulatorial

**Cel-miR-39** – *Caenorhabditis elegans* miR-39

**EQU** – Exame qualitativo de urina

**HCPA** – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**HPB** - Hiperplasia Prostática Benigna

**INCA** - Instituto Nacional do câncer

**LABIMET** – Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PCA3** - Antígeno de câncer de próstata 3

**PSA** – *Prostate specific antigen*

**RT-PCR** - *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

**TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1. Próstata .....	18
2.2. Diagnóstico do Câncer de Próstata .....	19
2.3. PSA .....	20
2.4. Exame de toque retal .....	20
2.5. Biópsia da próstata .....	21
2.6. Exames complementares .....	21
2.7. Biomarcadores novos para o câncer de próstata .....	21
2.8. microRNAs .....	23
2.9. microRNAs urinários e CaP .....	25
2.10. Hipóteses do trabalho .....	25
3.OBJETIVOS .....	27
3.1. Objetivo geral .....	27
3.2. Objetivos específicos .....	27
4 METODOLOGIA .....	28
4.1. Desenho do estudo .....	28
4.2. População do estudo .....	28
4.3. Critérios de inclusão e exclusão .....	28
4.4. Coleta do material biológico e exames laboratoriais .....	29
4.5. Extração de RNA .....	29
4.6. RT-qPCR .....	29
4.7. Análise Estatística .....	31
4.8. Aspectos éticos e biossegurança .....	31

5.RESULTADOS .....	32
6.DISSCUSSÃO .....	40
7.CONCLUSÃO .....	43
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
9.Anexos .....	48
9.1.Termo de consentimento livre e esclarecido .....	48
9.2 Parecer do comite de ética .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é a segunda neoplasia mais frequente em homens no mundo, atrás apenas de câncer de pulmão (BRAY et al., 2018). Nos Estados Unidos, foram estimados 174.650 novos casos no ano de 2019 (SIEGEL; MILLER; JEMAL; 2019). No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que 65.840 casos novos de câncer de próstata ocorram para cada ano do biênio 2020-2022. Excluindo-se o câncer de pele não-melanoma, o câncer de próstata é o mais incidente em todas as regiões do país (INCA, 2021).

A incidência do CaP aumenta significativamente a partir dos 50 anos. Considerando o aumento da sobrevida da população mundial, este se configura um problema de saúde para os próximos anos, visto o envelhecimento da população. O CaP inicia-se principalmente na zona periférica, em média de 70%, sendo classificado como um adenocarcinoma ou câncer glandular (INCA, 2021). A história natural deste tipo de câncer não é bem conhecida, e seu comportamento clínico pode ser um tumor bem diferenciado microscopicamente que nunca será um câncer de alto grau, clinicamente significativo ou um câncer agressivo, que causa metástase principalmente para medula e linfonodos, morbidade e morte (MOHAMMED, 2014).

A taxa de mortalidade de pacientes com CaP é alta devido primariamente ao fato de a doença tornar-se clinicamente aparente após o surgimento de metástases (ANDRADE; BARONI; 2014). O principal fator de risco é a idade, mas histórico familiar e fatores genéticos hereditários, como alteração nos genes *BRCA1* e 3 e *ATM*, são fatores de risco. O tabagismo, obesidade, exposições a aminas aromáticas, arsênio e produtos de petróleo são fatores de risco modificáveis (INCA, 2021).

De acordo com as tendências de mortalidade no Brasil, o câncer será a principal causa de morte da população entre 35 e 74 anos nos próximos anos. Desse modo, a prevenção, o controle dos fatores de riscos modificáveis e o diagnóstico precoces do câncer deveriam ser prioridades (MANSUR; FAVARATO; 2021). O aumento da incidência do CaP nos últimos anos deve-se ao envelhecimento da população, mas também à melhoria de técnicas para diagnóstico, como uso do Antígeno Prostático Específico (PSA) e toque retal. Porém, ao analisar o prognóstico do CaP, sabe-se que alguns crescem de maneira rápida apresentando metástases e levando à morte, porém outros podem apresentar crescimento lento e não terem sinais clínicos durante a vida, nem ameaçar a vida do homem (BELL et al., 2014; SCHRÖDER et al., 2014)

No Brasil, a Sociedade Brasileira de Urologia recomenda que o rastreio seja iniciado aos 50 anos, ou aos 45 anos se tiver algum familiar de 1º grau que tenha tido câncer de próstata

e persista até os 80 anos. O rastreio é realizado com o exame de PSA e toque retal. A realização de teste de PSA ou toque retal não são incentivados como programas de saúde pública visto seus resultados. O exame de toque apresenta alta especificidade para o câncer, porém, baixa sensibilidade, pois, tumores localizados na região anterior da próstata não são detectados pelo exame de toque. O PSA é ainda mais complexo, pois este marcador refere-se a alterações na próstata, como Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e prostatite, que podem elevar o PSA, e alguns pacientes com PSA normal podem apresentar a doença (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020; INCA 2019). Quando há alterações nesses exames, a biopsia da próstata pode ser indicada (BRAY et al., 2018; INCA 2019).

A Biopsia da próstata é realizada para confirmação do diagnóstico do CaP, sendo um exame invasivo. Algumas das complicações comuns são hematúria, hematospermia e sangramento retal, podendo persistir por duas semanas. As complicações mais graves são menos comuns, como infecção, hemorragia e obstrução urinárias, podendo levar à hospitalização (TYNG et al., 2013). Desse modo, se faz necessária busca de novos exames não invasivos com o objetivo de identificar biomarcadores mais específicos para o CaP. A descoberta de um novo biomarcador que seja específico em relação ao estadiamento do câncer e seu efeito patológico é fundamental para distinguirem-se os tumores malignos e os indolentes. O uso principalmente de biomarcadores genéticos pode ser eficaz no diagnóstico e estadiamento precoce da doença (CARRION, 2019).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Próstata

A próstata é uma glândula masculina localizada em frente ao reto, abaixo da bexiga e envolve a uretra e os ductos deferentes para formar os ductos ejaculatórios. Uma de suas funções é adicionar uma solução rica em citrato, cálcio e enzimas à secreção do ejaculado, neutralizando secreções ácidas da vagina e auxiliando a fertilização. Na região posterolateral à próstata localizam-se os feixes vasculonervosos, sendo responsáveis, junto com outros fatores, pelo mecanismo de ereção. Seu crescimento ocorre na puberdade com a ativação do eixo hipotálamo hipófise (COSTANZO, 2018; INCA, 2021).

Do ponto de vista anatômico-histológico a próstata é dividida em quatro zonas: estroma fibromuscular, de transição, central e periférica, conforme demonstrado na Figura 1.

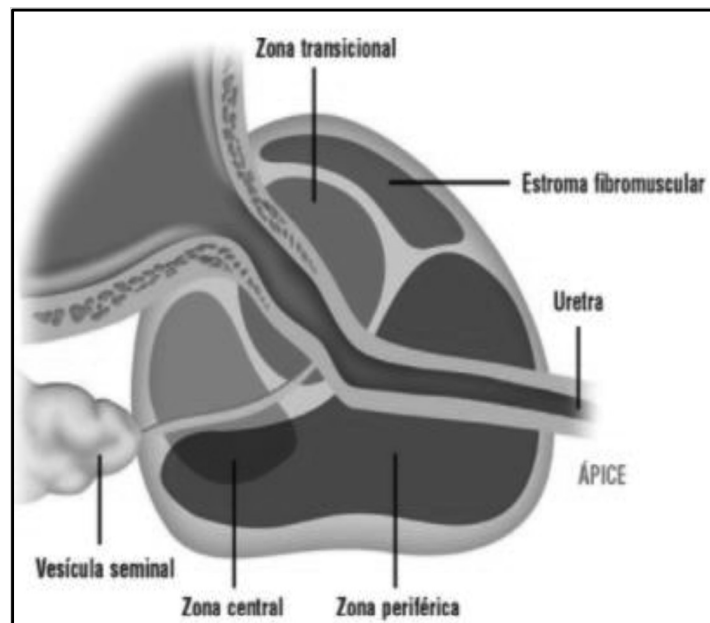


Figura 1: Zonas da próstata. Fonte: COSTANZO, 2018

Em média 70% dos casos de CaP tem início na zona periférica, correspondendo a adenocarcinoma ou câncer glandular. Desse modo, a maioria dos casos de CaP podem ter seus nódulos palpáveis pelo exame de toque retal (INCA, 2021).



## 2.2. Diagnóstico do Câncer de Próstata

A incidência do CaP aumenta significativamente a partir dos 50 anos, devido à sobrevida da população mundial. Os fatores de risco para o desenvolvimento do CaP são a idade, fatores genéticos, obesidade, exposição a aminas aromáticas, arsênio, produtos de petróleo, motor de escape de veículo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fuligem e dioxinas (INCA 2020). A exposição a vários tipos de agrotóxicos aumenta o risco de diversos tipos de câncer, incluindo o CaP, muitos desses agrotóxicos ainda são utilizados no Brasil e Estados Unidos, sendo que as pessoas que manuseiam os produtos e/ou moram próximo à áreas expostas apresentam maiores riscos de câncer (PLUTH; ZANINIARA; BATTISTI, 2019).

O surgimento do CaP depende da interação de diversos fatores genéticos, alimentares, ambientais e hormonais. Há fatores que não são modificáveis, todavia há fatores modificáveis que têm sido estudados, como a exposição a agrotóxicos, ambiente ocupacional, álcool e drogas, cujas relações com o CaP precisam ser melhor descritas (INCA, 2017; NADALETI et al., 2016).

Em relação à exposição a agrotóxicos, observou-se que a taxa de incidência de câncer aumentou com a idade, sendo maior entre pessoas que residem em áreas rurais do que entre aquelas de áreas urbanas. Desse modo, a vida rural expõe as pessoas ao uso de agrotóxicos sendo um risco aumentado para desenvolver câncer (PLUTH et al., 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda ações de prevenção, detecção precoce e acesso ao tratamento. Para a detecção precoce há duas estratégias: a primeira refere-se ao uso de exames de rotina nos homens sem sinais e sintomas visando a detecção pré-clínica, a segunda maneira é o diagnóstico precoce identificando no início dos sintomas (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020; INCA 2019).

A estratégia para a detecção precoce pode potencializar o tratamento e proporcionar uma maior sobrevida ao paciente. Desse modo, profissionais e a população devem reconhecer sintomas suspeitos de câncer como: alteração na frequência e padrão urinário, hematúria visível e disfunção erétil, indicando o acesso aos serviços de saúde dos homens com esses sintomas (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

Os exames utilizados para detecção do CaP são o PSA, exame de toque retal e exames de imagem, quando apresentam alterações a biópsia é indicada para confirmação diagnóstica. Outros exames complementares podem ser solicitados para guiar a biópsia, avaliar a presença de metástases e acompanhar a evolução do CaP (ANDRADE; BARONI; 2014)

### 2.3. PSA

O PSA é uma proteína produzida pela próstata e em situações normais seus valores na corrente sanguíneas são muito baixos. Essa proteína pode ser encontrada na corrente sanguínea e sêmen. O PSA é utilizado desde 1986 como marcador para o CaP, desde sua descoberta aumentou exponencialmente o número de diagnósticos de casos de Câncer de Próstata, no entanto, não diminuíram as mortes, sua incidência continua elevada. A utilização do PSA como marcador pode reduzir o risco de mortalidade pelo CaP. Todavia, o nível de PSA aumentado não é um marcador específico para o CaP, este marcador pode estar elevado em situações como infecção da próstata ou do trato urinário e HPB. Desta forma, pode-se ter falsos-positivos, superdiagnósticos e biópsias excessivas (FENTON et al., 2018; INCA, 2018).

Valores elevados de PSA estão relacionados ao pior prognóstico da doença, níveis maiores que 10 ng/mL conferem uma probabilidade maior que 67% para o CaP, após a retirada da próstata os valores ficam próximo ao zero (CARROLL et al., 2016.; INCA 2021). O PSA, por ser um valor de referência para indicar a realização da biópsia, mesmo não sendo específico para o estadiamento do CaP, quando apresentar alteração dos seus valores (maior que 4,0 ng/mL) os pacientes são submetidos a biópsia, que pode ser repetida e os pacientes podem ser expostos a intercorrências frequentes (FENTON et al., 2018).

Um estudo de revisão recente comparou as indicações para o uso do PSA no rastreamento do CaP demonstrando que há controvérsias em sua indicação em relação à redução da mortalidade após o uso do PSA para rastreamento em massa da população (LAKES; ARSOV; 2019). O foco dos estudos não deveria ser a identificação em massa da população, mas sim o uso de exames ou biomarcadores específicos que detectariam as doenças que poderiam ter evolução clínica desfavorável. (ALBERTSEN, 2020).

### 2.4. Exame de toque retal

Esse exame é realizado pelo médico sendo introduzido um dedo protegido por luva lubrificada no reto que permite palpar as partes posteriores e laterais da próstata para avaliar o formato, textura, tamanho e a presença de nódulos que sejam sugestivos para o câncer. Apresenta um baixo custo, porém como limitação tem-se o profissional médico que realizará o

exame, sua expertise, e os homens relatam receio em realizar o exame (ANDRADE; BARONI; 2014).

## **2.5. Biópsia da próstata**

A biópsia é realizada para confirmar, ou não, a presença do CaP. No entanto, é um procedimento invasivo que pode acarretar algumas complicações como: dor, sangramento retal, hematúria, hematospermia e infecções. A taxa de infecções graves decorrente da biópsia vem aumentando nos últimos anos em consequência da resistência crescente aos antimicrobianos, elevando assim o número de hospitalizações pós-biópsia (DAS; RAZIK; VERMA; 2019).

O grande número de biópsias prostáticas negativas, potencialmente desnecessárias, é reconhecido como um problema clínico na atual abordagem para avaliação do paciente. Para a realização desse exame a próstata é dividida em seis zonas e são preconizados o número mínimo de 12 fragmentos, principalmente da Zona Periférica, onde 70% dos tumores são localizados. Em pacientes com HPB o número de fragmentos pode ser aumentado.

O diagnóstico definitivo do CaP é realizado pelo estudo histopatológico dos fragmentos, analisados conforme a graduação histológica de Gleason, sendo classificado em graus de 1 a 5 de acordo com a perda de sua estrutura ductal normal. Recomenda-se que sejam considerados tumores somente os graus acima de 2. A pontuação do escore de Gleason é feita pela soma do grau do padrão predominante com o grau de segundo padrão mais encontrado, variando, assim, de 2 até 10. Este escore classifica o tumor de forma progressiva, sendo que os maiores escores estão relacionados a maior gravidade tumoral e forte indicadores de prognóstico (WILD; WEIDERPASS; STEWART; 2020).

## **2.6. Exames complementares**

A Ressonância Magnética é utilizada para determinar a localização precisa do CaP e também é utilizada para avaliar recidivas neoplásicas após o tratamento. Cintilografia óssea é indicada quando há suspeita de metástases óssea. Nesse exame, é possível a visualização de todo o esqueleto com baixa dose de radiação para detectar possíveis metástases. Ultrassonografia é utilizada para guiar a biópsia principalmente em áreas suspeitas após o exame de toque retal (ANDRADE; BARONI; 2014).

## **2.7. Biomarcadores novos para o câncer de próstata**

Por definição, um marcador biológico ou biomarcador é um indicador de processos biológicos normais, processos patológicos, ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica, e que pode ser medido experimentalmente. Os biomarcadores podem ser usados na prática clínica para o diagnóstico ou para identificar riscos de ocorrência de uma doença. Podem ainda ser utilizados para estratificar doentes e identificar a gravidade ou progressão de uma determinada doença, prever um prognóstico ou monitorar um determinado tratamento, para que seja menos provável que alguns efeitos secundários ocorram. Um candidato ideal a biomarcador tem que superar limitações, tais como sensibilidade, especificidade e robustez insuficiente, além de baixo poder preditivo (SCHOLER et al., 2010; MOHAMMED, 2014).

As principais características de um biomarcador tumoral ideal são sua especificidade para um determinado tipo de tumor e sua sensibilidade, sendo que seus níveis devem sinalizar com precisão a progressão e a regressão do tumor. Finalmente, o teste para detecção de um biomarcador tumoral deve ser de baixo custo e não invasivo, assim como permitir uma triagem entre pacientes com câncer e sem câncer e ser aceito pela maioria dos pacientes. A definição de biomarcadores genômicos não inclui a medição e caracterização de proteínas ou de metabólitos de baixo peso molecular, e é definido como DNA e/ou RNA característico mensurável que é indicador de um processo biológico normal, e/ou de resposta a terapêutica ou outras intervenções (DIMAKAKOS et al., 2014).

Nos últimos anos, os novos biomarcadores auxiliaram em avanços reais no diagnóstico diferencial do câncer de próstata, bem como a melhor escolha terapêutica. Vários marcadores têm sido caracterizados e estão sendo utilizados na clínica, porém estudos devem continuar sendo realizados e intensificados para que haja uma correta interpretação e aumento de sua utilização clínica (MUCARBEL et al.; 2020).

O Antígeno de câncer de próstata 3 (PCA3) é o biomarcador mais promissor, é um RNA de cadeia longa encontrado superexpresso no tecido do CaP em comparação com tecido benigno. Pode ser encontrado na urina após massagem prostática na realização da biópsia. Mesmo sendo utilizado como novo biomarcador confiável na detecção do CaP, não apresenta correlação com a agressividade ou estágio do câncer (CUI et al.; 2016). O PCA3 está envolvido na progressão do CaP quando há distúrbios metabólicos da via lipídica exercendo um papel de diminuição de triglicerídeos celulares, essa via é ativada quando o paciente é exposto a substâncias como antimônio por exemplo. O aumento da expressão do PCA3 está fortemente associado com a malignidade do CaP onde o escore de Gleason é elevado (Balacescu; Dumitrescu, Marian; 2018; GUO et al.; 2021).

O *SelectMDx* é um exame de urina coletado após massagem prostática que mede os níveis de mRNA DLX1 e HOX6, que, juntamente com a análise dos sinais clínicos do paciente, pode identificar CaP de alto grau (Gleason maior ou igual a 7), possibilitando a diminuição de biópsias desnecessárias (BECERRA et al.; 2021). Outra classe de biomarcadores estudados para o CaP são os microRNAs, que podem agir juntamente com outros biomarcadores explicando suas ações (BOZGEYIK et al.; 2021).

## 2.8. microRNAs

Para a geração de um microRNA é necessária a participação de diversas enzimas e complexos proteicos celulares, sendo um processo que se inicia no núcleo e finalizar no citoplasma. A figura 2 descreve a biogênese canônica de microRNAs (O'BRIEN, JACOB ET AL.; 2018).

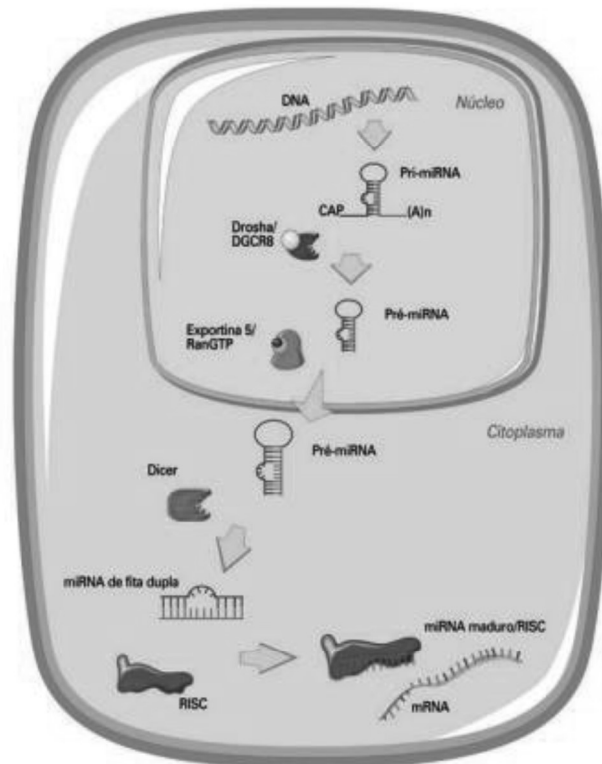


Figura 2: Biogênese dos microRNAs. Fonte: JORGE et al.; 2021

No primeiro momento, no núcleo, a partir do DNA, os microRNAs são traduzidos em moléculas chamadas pri-microRNAs que posteriormente são processados pela enzima Drosha, criando uma molécula chamada pré-microRNA. Essa molécula é exportada ao citoplasma e

processada pela enzima Dicer, gerando o microRNA de fita dupla que terá suas fitas separadas, dando origem a microRNAs maduros e capazes de se ligar aos RNAs mensageiros, inibindo sua tradução (JORGE et al.; 2021).

Em 2008, Lawrie e colaboradores introduziram os microRNAs (miRNAs) como nova classe de biomarcadores para câncer. Os miRNAs são moléculas de RNAs de 19 a 22 nucleotídeos, fita simples e não codificantes. Estas moléculas são geradas pela clivagem sequencial de transcritos primários e precursores chamados de pri-microRNAs e pré-microRNAs, respectivamente. Cada miRNA tem a capacidade distinta de regular potencialmente a expressão de centenas de genes codificantes e, portanto, modular várias vias celulares incluindo proliferação, apoptose e resposta ao estresse. De acordo com o banco de dados miRBase, 2.654 microRNAs humanos já foram descritos, e mais de 60% dos genes humanos são regulados por eles (KOZOMARA et al.,2019).

Diferentes miRNAs séricos foram detectados em várias condições patológicas, incluindo doenças autoimunes, sepse, infarto agudo do miocárdio e diferentes tipos de câncer. Os padrões de expressão, função e regulação dos miRNAs em células normais e neoplásicas ainda são desconhecidos, mas sua localização frequente em sítios frágeis, pontos de quebra ou regiões de amplificação ou perda de heterozigotidade revelam que eles têm um significativo papel na carcinogênese humana. O padrão anormal de expressão dos vários miRNAs tem sido observado em leucemia linfática crônica de células B, e muitos tumores sólidos, incluindo mama, fígado, ovário, coloretal e próstata. Sua expressão alterada em câncer pode ser um fator de causa ou talvez uma consequência do estado da doença. Dependendo da natureza de seus genes alvo, miRNAs podem funcionar como supressores de tumores por repressão dos oncogenes alvo (por exemplo, let-7g, miR-15/16 e miR-34) ou como oncogenes por controlar negativamente genes que regulam diferenciação celular tumoral e apoptose (BUDHU et al., 2010).

A maioria dos estudos utilizam miRNAs presentes na circulação sanguínea como biomarcadores no câncer (SCHOLER et al., 2010). Entretanto, a avaliação dos miRNAs de sangue pode não refletir diretamente a expressão do tecido prostático e assim, não permitir a avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na doença. Por outro lado, a urina, quando coletada após o exame de toque retal, apresenta células e secreções oriundas da próstata, sem necessidade de biópsia (HAESE et al.,2008; FUJITA, NONOMURA, 2018).

O exame qualitativo de urina (EQU) é utilizado desde o início da prática clínica onde era analisado a cor, odor, turvação e volume de açúcar, sendo importante para o diagnóstico de doenças. Atualmente, é um exame de baixo custo e de fácil coleta podendo detectar doenças

renais, hepáticas, diabetes melitos. Em exames laboratoriais, a urina é analisada após uma hora da coleta, é centrifugada, desprezado o sobrenadante e o precipitado urinário é utilizado para contagem de leucócitos, hemácias e cristais (FUJITA, NONOMURA, 2018).

## **2.9. microRNAs urinários e CaP**

Os microRNAs têm sido estudados como possíveis biomarcadores para prever, identificar o diagnóstico, e acompanhar a evolução de diversas neoplasias. Apresenta vantagens em relação a sua análise, coleta da amostra e especificidade (ZHANG, BAOHONG et al.; 2007). Variações na expressão de microRNAs podem identificar respostas terapêuticas visto que interferem em vias intercelulares afetando a expressão gênica das células, podendo sugerir a progressão do câncer e possíveis metástases (FALCONE, FELSANI, AGNANO; 2015). O conhecimento do perfil da expressão dos microRNAs no câncer torna-se importante para elucidar o processo de carcinogênese, pois, como são encontrados nos fluidos biológicos, como plasma e urina, podem ter um papel indicador da progressão e disseminação do câncer (JORGE et al.; 2021).

Nos últimos anos, muitas publicações mostram a presença de microRNAs que poderiam servir como biomarcadores para o CaP, sendo que a urina após a massagem prostática e toque retal apresenta maiores quantidades de ácidos nucleicos específicos do tumor que podem ser analisados. Todavia, não há consenso universal em relação à coleta adequada, processamento e análise dos microRNAs urinários (LIN et al.; 2021; PAIVA et al.; 2020).

A análise da urina ocorre após a centrifugação, porém, os estudos utilizam diferentes frações urinárias (sobrenadante ou sedimento celular). O tipo de amostra utilizada interfere no isolamento e expressão do microRNA, sendo necessária a padronização das amostras e análise utilizando os mesmos parâmetros. Em trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, encontramos alguns microRNAs urinários que estão superexpressos na fração celular da urina, em amostras de CaP em relação ao controle, mirR -200b, 21-5p, 141-3p, 375 e 574-3p. Devido a não ser um exame invasivo, a urina é considerada uma fonte promissora de biomarcadores para o CaP ( PAIVA et al.; 2020), mas ainda não existe consenso na literatura sobre qual fração da urina é mais adequada para a avaliação desses microRNAs.

## **2.10. Hipóteses do trabalho**

De acordo com os microRNAs estudados pelo grupo de pesquisa que apresentam prevalência no CaP e pela não padronização mundial sobre a análise de microRNAs urinários usou-se a avaliação destes utilizando o sobrenadante urinário.

Hipótese nula: A expressão dos microRNAs no sobrenadante urinário de pacientes com biópsias positivas para CaP não difere em relação aos pacientes com biópsias negativas.

Hipótese alternativa: A expressão dos microRNAs no sobrenadante urinário de pacientes com biópsias positivas para CaP é diferente da expressão em pacientes com biópsias negativas.



### **3. OBJETIVOS**

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

Avaliar a expressão diferencial de miRNA urinários em pacientes com biópsias positivas e negativas para CaP utilizando o sobrenadante urinário.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Avaliar o perfil de expressão dos microRNAs em amostra de sobrenadantes urinários de pacientes com CaP e pacientes controle;

Verificar se existe associação entre os níveis de PSA sérico e a expressão dos miRNAs avaliados;

Verificar se existe associação entre os diferentes escores de Gleason e a expressão dos miRNAs avaliados;

## **4. MÉTODOS**

### **4.1. Desenho do estudo**

O estudo foi do tipo transversal, desenvolvido em 36 meses, avaliando amostras de pacientes com indicação de biópsia de próstata. As amostras de urinas analisadas foram coletadas durante a execução do projeto registrado sob número 16-0539, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, cujos Termos de Consentimentos Livre e Esclarecido (TCLE) já foram coletados. Foi realizada a extração de RNA total do sobrenadante e das células, sendo analisados no presente trabalho os miRNAs no sobrenadante urinário.

O projeto supracitado objetivou identificar microRNAs biomarcadores diferentemente expressos em células da urina, sangue e do tecido prostático de pacientes com câncer de próstata que posteriormente possam ser utilizados para o diagnóstico não invasivo do carcinoma prostático.

### **4.2. População do estudo**

Indivíduos adultos do sexo masculino atendidos no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com indicação de realizar exame de biópsia de próstata. No HCPA são realizados aproximadamente 20 a 25 exames de biópsia prostática por mês. Considerando a taxa local e mundial de positividade de biópsia de próstata em torno de 30%, para este estudo foi usada uma amostragem não probabilística, amostra por conveniência, que se define pela disponibilidade de amostras e de exequibilidade do estudo. Neste caso, foram incluídos 50 pacientes no período de novembro de 2016 a junho de 2018.

### **4.3. Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos no estudo os indivíduos do sexo masculino que tiveram indicação clínica de realizar biópsia prostática após apresentarem exame de toque retal e teste de PSA sugerindo alterações na próstata. Foram excluídos do estudo os indivíduos com diagnóstico de outros carcinomas.

#### 4.4. Coleta do material biológico e exames laboratoriais

Ao paciente atendido no Ambulatório de Atendimento Médico do Serviço de Urologia do HCPA com indicação clínica de realizar biópsia da próstata (exame de toque retal e PSA total positivos) foi aplicado o TCLE (Apêndice A) para participar da pesquisa. Após a concordância do paciente em participar do estudo foi marcada a data de realização da biópsia de próstata (exame de rotina para este paciente, independentemente de sua participação na pesquisa), bem como a coleta da amostra de urina. A amostra de urina coletada foi encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LABIMET) para determinação dos níveis de expressão dos microRNAs.

Para este estudo, os pacientes foram divididos em dois grupos (casos e controles) a partir dos resultados do exame histopatológico. Os pacientes com resultado de biópsia positiva de câncer de próstata foram classificados como casos (“pacientes com câncer”), e os pacientes com biópsia negativa considerados os controles (“pacientes saudáveis”).

O exame de toque retal foi realizado pelo médico momentos antes do exame de biópsia de próstata no Centro Cirúrgico Ambulatorial (CCA) do HCPA. O médico realiza uma massagem prostática aplicando uma pressão na próstata da base em direção ao ápice, três vezes em cada lobo (esquerdo e direito). A massagem prostática libera as células epiteliais da próstata através do ducto prostático para o trato urinário podendo ser realizado a coleta do material biológico.

Amostras de urina foram coletadas no primeiro jato (aproximadamente 30 mL) imediatamente após a massagem prostática realizada pelo médico antes da biópsia no CCA do HCPA. Após esta coleta, utilizou-se um tubo tipo Falcon de 50 mL e as amostras foram concentradas por centrifugação refrigerada (10 min, 2000 rpm, 4°C) e após a sedimentação um *pellet* de células formou-se ao fundo, sendo retirado o sobrenadante e armazenadas separadamente as alíquotas de *pellet* e sobrenadante em freezer a -20°C por 24h e, posteriormente, a -80°C no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LABIMET) até o momento de execução das extrações do RNA total.

#### 4.5. Extração de RNA

Para realizar a extração de RNA urinário do sedimento urinário (*pellet*) e sobrenadante foi utilizado o kit MagMAX mirVana (Thermo Fisher Scientific, USA) baseados nos métodos

de extração por micropartículas magnéticas, com um volume inicial de 200 µL de amostra, sendo que foram eluídas em 50 µL de tampão fornecido pelo kit. Todas as etapas de isolamento e purificação do RNA foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante do kit.

Na etapa de extração de RNA foi adicionada uma solução de *Caenorhabditis elegans* miR-39 (cel-miR-39), um RNA exógeno. O controle exógeno cel-miR-39 é um oligonucleotídeo de RNA sintético com uma sequência alvo de miRNA que não está presente na amostra humana a ser analisada. Desse modo, obteve-se a concentração final de 0,1 pM de cel-miR-39 em cada amostra a ser extraída. O uso de cel-miR-39 como RNA sintético é indicado pelo fabricante do kit e tem como finalidade o controle interno do ensaio de RTqPCR, para verificar a qualidade de todo processo de extração e ser um candidato a normalizador do ensaio molecular. A qualidade e a concentração do RNA derivadas de todas as amostras foram avaliadas usando o espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, EUA). Após a comprovação da qualidade do RNA, foi armazenado a -80°C até ser utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA).

#### 4.6. RT-qPCR

A conversão de RNA total (incluindo porção dos miRNA) para cDNA foi realizada com o uso do kit Taqman Advanced miRNA cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, EUA) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras de cDNA foram diluídas dez vezes com tampão TE 0,1 x (pH 8,0).

As RT-qPCRs foram realizadas em um termociclador QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, EUA) empregando-se kits Taqman Fast Advanced Master Mix e ensaios Taqman, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram selecionados três microRNAs para análise de expressão, sendo eles: hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-375-3p. Além disso, o miRNA cel-mir-39 foi utilizado como normalizador. A escolha dos microRNAs deu-se pelos achados anteriores do grupo de pesquisa que determinaram alguns microRNAs com potencial para serem biomarcadores não invasivos para o câncer de próstata (PAIVA, 2020).

As reações foram realizadas em duplicata seguindo as recomendações do fabricante.

**Tabela 1: miRNAs avaliados**

<b>miRNA</b>	<b>Sequência 5'&gt;3'</b>	<b>Ensaio Taqman</b>
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	477975_mir
hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	477963_mir
hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA	478074_mir
cel-miR-39-3p	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG	478293_mir

Fonte: Elaborado pelo autor

#### 4.7. Análise Estatística

O banco de dados foi elaborado em planilha eletrônica Microsoft Excel, o nível de expressão gênica foi calculado com o método do  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

As análises estatísticas foram realizadas no software *Statistical Package for the Social Science* versão 22.0 (IBM, EUA). A distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. O nível de expressão relativa dos miRNA entre os grupos foi avaliado usando o teste U de Mann-Whitney. Os gráficos de expressão foram criados no software GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, EUA). Para investigar o poder discriminatório dos miRNAs desregulados entre as amostras de pacientes com CaP e os indivíduos controle, foram geradas curvas ROC (receiver-operating characteristic) e calculadas as áreas sob as curvas (areas under the curves – AUCs). Diferenças estatisticamente significantes foram estabelecidas em  $P < 0,05$ .

#### 4.8. Aspectos éticos e biossegurança

O trabalho foi realizado em concordância com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa em seres humanos. A autorização dos pacientes para a inclusão no estudo foi obtida pela assinatura do TCLE (Anexo 1) e o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (Anexo 2).

Procedimentos padronizados de biossegurança foram utilizados em todas as etapas experimentais, como o uso de luva e avental. Materiais contaminados e/ou potencialmente tóxicos foram descartados conforme as regras do LABIMET.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSEN, Peter C. Prostate cancer screening and treatment: where have we come from and where are we going? **BJUI International**, [S.l.], v. 126, n. 2, p. 218-224, aug. 2020.

ANDRADE, Thais Caldara Mussi de; BARONI, Ronaldo Hueb. Oncologia. *In*: CAMARGO, Raphael Abegão. **Próstata**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 649-672.

BALACESCU, O.; DUMITRESCU, R. G.; MARIAN, C. MicroRNAs role in prostate cancer. *In*: DUMITRESCU, R. G.; VERMA, M. (eds.). Epigenética do câncer para medicina de precisão. v. 1856. **Methods in Molecular Biology**. Nova Iorque: Humana Press, 2018. p. 103-117.

BELL, N. *et al.* Recommendations on screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test. **CMAJ**, v. 186, n. 16, p. 1.225-34, nov. 2014.

BOZGEYIK, E. *et al.* miR-19a and miR-421 target PCA3 long non-coding RNA and restore PRUNE2 tumor suppressor activity in prostate cancer. **Molecular Biology Reports**, nov. 2021.

BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, [S.l.], v. 68, n. 6, p. 394-424, jul. 2018.

BRYANT, R. *et al.* Alterações nos níveis circulantes de microRNA associados ao câncer de próstata. **British Journal of Cancer**, [S.l.], v. 106, p. 768-774. 2012.

BUDHU, A.; JI, J.; WANG, X. W. The clinical potential of microRNAs. **Journal Hematology & Oncology**, [S.l.], v. 6, p. 3-37. 2010.

CARRION, D. M. *et al.* Biomarkers in prostate cancer management. Is there something new? **Archivos Españoles de Urología**, [S.l.], v. 72, n. 2, p. 105-115, mar. 2019.

CARROLL, P. R. *et al.* NCCN guidelines insights: prostate cancer early detection, version 2.2016. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, [S.l.], v. 14, n. 5, p. 509-519. 2016. DOI:10.6004/jnccn.

CAVALLARI, I. *et al.* Prognostic stratification of bladder cancer patients with a microRNA-based approach. **Cancers (Basel)**, [S.l.], v. 12, p. 31-33. 2020. DOI:10.3390/cancers12113133.

COSTANZO, Linda S. **Fisiologia**. Tradução de Aline Santana da Hora e Renata Scavone de Oliveira. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

CUI, Y. *et al.* Evaluation of prostate cancer antigen 3 for detecting prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 6, p. 25776, may. 2016. DOI:10.1038/srep25776.

DAS, C. J. *et al.* Prostate biopsy: when and how to perform. **Clinical Radiology**, v. 74, n. 11, p. 853-864, nov. 2019.

DIMAKAKOS, A.; ARMAKOLAS, A.; KOUTSILIERIS, M. Novel tools for prostate cancer prognosis, diagnosis, and follow-up. **BioMed Research International**, [S.l.], v. 2014, may. 2014.

FALCONE, G.; FELSANI, A.; D'AGNANO, I. Signaling by exosomal microRNAs in cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, [S.l.], v. 34, n. 32, apr. 2015.

FENTON, J. J. *et al.* Prostate-specific antigen-based screening for prostate cancer. **JAMA**, [S.l.], v. 319, n. 18, p. 1914-1931, may. 2018. DOI:10.1001/jama.2018.3712.

FUJITA, Kazutoshi; NONOMURA, Norio. Review article urinary biomarkers of prostate cancer. **International Journal of Urology**, [S.l.], v. 25, p. 770-779. 2018.

GUO, S. *et al.* LncRNA PCA3 promotes antimony-induced lipid metabolic disorder in prostate cancer by targeting MIR-132-3 P/SREBP1 signaling. **Toxicol Lett**, [S.l.], v. 15, n. 348, p. 50-58, sep. 2021. DOI:0.1016/j.toxlet.2021.05.006.

HAESE, A. *et al.* Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy. **European Urology**, [S.l.], v. 54, n. 5, p. 1081-1088, nov. 2008.

HENDRIKS, R. J. *et al.* Comparative analysis of prostate cancer specific biomarkers PCA3 and ERG in whole urine, urinary sediments and exosomes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, [S.l.], v. 54, n. 3, dec. 2015.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Detecção precoce do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2021.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

JORGE, A. L. *et al.* **MicroRNAs**: entendendo seu papel como reguladores da expressão gênica e seu envolvimento no câncer. São Paulo: Einstein, 2021.

KONOSHENKO, M. Y. *et al.* The panel of 12 cell-free micrornas as potential biomarkers in prostate neoplasms. **Diagnostics**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. 38. 2020.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. MiRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 8, n. 47, p. D155-D162, jan. 2019. DOI:10.1093/nar/gky1141.

LAKES, J.; ARSOV, C. PSA-Screening und molekulare Marker [PSA screening and molecular markers]. **Urologe A**, [S.l.], v. 58, n. 5, p. 486-493, may. 2019. DOI:10.1007/s00120-019-0900-y.

LIN, Bing-Biao *et al.* MicroRNA-regulated transcriptome analysis identifies four major subtypes with prognostic and therapeutic implications in prostate cancer. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S.l.], v. 19, p. 4941-4953, aug. 2021. DOI:10.1016/j.csbj.2021.08.046.

MANSUR, Antonio de Padua; FAVARATO, Desiderio. Taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares e câncer na população brasileira com idade entre 35 e 74 anos, 1996-2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.l.], v. 117, n. 2, ago. 2021.

MOHAMMED, A. A. Biomarkers in prostatecancer: new era andprospective. **Medical Oncology**, [S.l.], v. 31, p. 140. 2014.

MUCARBEL, I. M. G.; RAMOS, T. J. L.; DUQUE, M. A. A. A importância do exame psa – antígeno prostático específico –para a prevenção do câncer de próstata. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 12, p. 94184-94195, dec. 2020. DOI:10.34117/bjdv6n12-038.

O'BRIEN, Jacob *et al.* Overview of microrna biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, [S.l.], v. 9, N. 402, p. 1-12, aug. 2018. DOI:10.3389/fendo.2018.00402.

PAIVA, R. M. **Avaliação de microRNAs como biomarcadores moleculares no câncer de próstata**. 2020. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

PAIVA, R. M. *et al.* Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review. **Clinical and Translational Oncology**, [S.l.], v. 22, p. 2061-2073. 2020.

PFEFFER, S. R. *et al.* The role of miR-21 in cancer. **Drug Development Research**, [S.l.], v. 76, n. 6, p. 270-277, sep. 2015.

SCHÖLER, N. *et al.* Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. **Experimental Hematology**, [S.l.], v. 38, n. 12, p. 1126-1130, dec. 2010.

SCHRÖDER, F. H. *et al.* Screening and prostate cancer mortality: results of the European randomised study of screening for prostate cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. **The Lancet**, [S.l.], v. 384, n. 9959, p. 2027-2035, dec. 2014.



SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S.l.], v. 69, n. 1, p. 7-34, jan./feb. 2019. DOI:10.3322/caac.21551.

STAFFORD, M. Y. C. *et al.* Prognostic value of miR-21 for prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **Bioscience Reports**, [S.l.], v. 42, n. 1, jan. 2022.

STUOPELYTE, K. *et al.* A utilidade dos miRNAs circulantes na urina para detecção de câncer de próstata. **British Journal of Cancer**, [S.l.], v. 115, p. 707-715, aug. 2016.

TYNG, Chiang Jeng *et al.* Preparo e manejo de complicações em biópsias de próstata. **Radiologia Brasileira**, [S.l.], v. 46, n. 6, nov./dec. 2013.

WEI, J. *et al.* MicroRNA-375: potential cancer suppressor and therapeutic drug. **Bioscience Reports**, [S.l.], v. 41, n. 9, sep. 2021. DOI:10.1042/BSR20211494.

WEN, Bin *et al.* Differential expression and role of miR-200 family in multiple tumors. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 626, aug. 2021. DOI:10.1016/j.ab.2021.114243.

WILD, Christopher P.; WEIDERPASS, Elisabete; STEWART, Bernard W. **World cancer report: cancer research for cancer prevention**. Ano. ISBN 978-92-832-0447-3.

YUAN, Y. *et al.* CircRNA circ\_0026344 as a prognostic biomarker suppresses colorectal cancer progression via microRNA-21 and microRNA-31. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.l.], v. 503, n. 2, p. 870-875, sep. 2018.

ZHANG, Baohong *et al.* MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Developmental Biology**, [S.l.], v. 302, n. 1, p. 1-12, feb. 2007. DOI:10.1016/j.ydbio.2006.08.028.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido

Nº do projeto GPPG ou CAAE:

Título do Projeto: “*Avaliação de miRNAs urinários diferencialmente expressos no câncer de próstata*”

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é desenvolver um método de diagnóstico não invasivo para diagnosticar o câncer de próstata realizado através do sangue e da urina. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Se você aceitar participar da pesquisa, no dia do seu exame de biópsia da próstata será realizada a coleta da amostra de urina, logo após o exame de toque retal com massagem prostática (que é procedimento de rotina antes da biópsia), no Centro Cirúrgico Ambulatorial (CCA) do HCPA. O volume coletado de urina será de aproximadamente 30 mL. Para uma melhor coleta pedimos que o senhor beba dois copos de água antes da entrada no CCA.

A coleta das amostras para a pesquisa não interferirá em seu tratamento clínico ou cirúrgico, que será o mesmo independentemente de você aceitar ou não em participar da pesquisa.

- Também será realizada consulta em seu prontuário para obtenção dos resultados dos exames de PSA (antígeno prostático) e anatomopatológico (biópsia). Por isso, solicitamos a sua autorização para realizar este acesso.

É importante que saiba que para sua participação no estudo, não será necessário comparecer a nenhuma consulta extra, tomar qualquer medicamento experimental ou outro medicamento que não seja os que seu médico lhe receitou.

A coleta de urina não apresenta riscos, além de um desconforto eventual semelhante ao toque retal que você já realizaria antes da biópsia.

Embora não exista nenhum benefício direto para o senhor com a participação na pesquisa, os dados coletados de cada paciente e examinados em conjunto ajudarão a compreender melhor a doença, além de permitir o desenvolvimento de um método de diagnóstico não invasivo, com menor risco e menos desconforto. Além disso, este estudo poderá auxiliar na determinação da gravidade da doença, quando presente. Com esse estudo, esperamos que um maior número de pessoas possa ter acesso a exames preventivos com maior efetividade, melhorando a possibilidade de diagnóstico e tratamento da doença.

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

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

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a

identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

As amostras coletadas serão armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LABIMET) do Departamento de Fisiologia da UFRGS. Este material será armazenado de forma codificada. O material biológico coletado, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconse-ntir com o uso do material.

Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Prof<sup>a</sup>. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, pelo telefone (51) 33083559 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

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

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

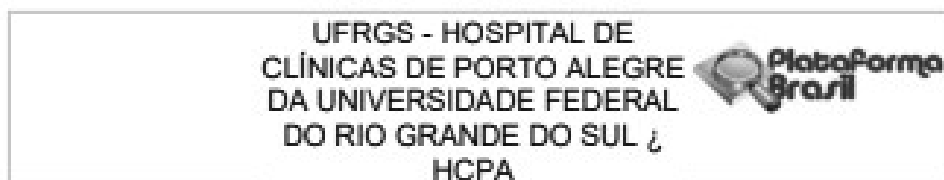
\_\_\_\_\_  
Assinatura

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura

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

## Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de miRNAs urinários diferencialmente expressos no câncer de próstata

**Pesquisador:** Ima Simoni Brum da Silva

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 24150719.3.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre


#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.745.523

#### Apresentação do Projeto:

Mundialmente, para homens de todas as idades, o câncer de próstata é a segunda neoplasia mais frequente, atrás apenas do câncer de pulmão. A alta taxa de mortalidade de pacientes com CaP é devida primariamente ao fato de que a doença usualmente torna-se clinicamente aparente depois que já ocorreu metástase. A detecção precoce pode potencializar o tratamento e proporcionar uma sobrevida ao paciente. O desenvolvimento de testes não invasivos para a detecção e monitoramento de cânceres podem reduzir drasticamente os problemas mundiais que envolvem este tipo de doença e o desenvolvimento de biomarcadores de detecção e diferenciação de câncer validados clinicamente permanecem um desafio ainda não vencido para muitos cânceres humanos. Os microRNAs encontrados na urina em células oriundas da próstata após o toque retal podem ser novos biomarcadores específicos para o câncer de próstata. O objetivo deste estudo é avaliar a expressão diferencial de possíveis miRNA biomarcadores em sobrenadante urinário de pacientes com biópsias positivas e negativas e compará-la com expressão em pellet urinário. O estudo será do tipo transversal, desenvolvido em 15 meses, avaliando amostras de pacientes com indicação de biópsia de próstata. Será realizada a extração do RNA total do sobrenadante e das células, sendo analisados os miRNA mais expressos descritos na literatura. Será realizado com indivíduos adultos

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE  
 CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
 DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
 DO RIO GRANDE DO SUL**   
**HCPA**

Continuação do Protocolo: 3.745.523

do sexo masculino atendidos no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com indicação de realizar exame de biópsia de próstata. Serão incluídos no estudo os indivíduos do sexo masculino que tiverem indicação clínica de realizar biópsia prostática após apresentarem exame de toque retal e teste de PSA positivos. Serão excluídos do estudo os indivíduos com diagnóstico de outros carcinomas. A maioria dos estudos utilizam miRNAs presentes na circulação sanguínea como biomarcadores no câncer. Entretanto, a avaliação dos miRNAs de sangue não reflete diretamente a expressão do tecido prostático e assim, não permite a avaliação dos mecanismos moleculares envolvidos na doença. Por outro lado, quando coletada após o exame de toque retal, a urina apresenta células e secreções oriundas da próstata, sem necessidade de biópsia. Nestas amostras, diferentes substratos urinários podem ser avaliados: urina inteira, sedimentos urinários, exossomos e ácidos nucleicos livres.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar a expressão diferencial de possíveis miRNA biomarcadores em sobrenadante urinário de pacientes com biópsias positivas e negativas e compará-la com expressão em pellet urinário.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo os pesquisadores

**Riscos:** A coleta de urina não apresenta riscos, além de um desconforto eventual semelhante ao toque retal que você já realizaria antes da biópsia.

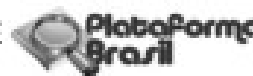
**Benefícios:** Não há benefício direto para o participante da pesquisa, os dados coletados de cada paciente e examinados em conjunto ajudarão a compreender melhor a doença, além de permitir o desenvolvimento de um método de diagnóstico não invasivo, com menor risco e menos desconforto. Além disso, este estudo poderá auxiliar na determinação da gravidade da doença, quando presente. Com esse estudo, esperamos que um maior número de pessoas possa ter acesso a exames preventivos com maior efetividade, melhorando a possibilidade de diagnóstico e tratamento da doença.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo será do tipo transversal, desenvolvido em 15 meses, avaliando amostras de pacientes com indicação de biópsia de próstata. Será realizada a extração do RNA total do sobrenadante e das células, sendo analisados os miRNA mais expressos descritos na literatura. Este projeto

**Endereço:** Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
**Bairro:** Santa Cecília **CEP:** 90.035-903  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** csp@hcpa.edu.br

UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL &  
HCPA



Continuação do Parecer: 3.745.939

também utilizará amostras de urina já coletadas pelo projeto 16-0539 cujos Termos de Consentimentos Livres e Esclarecido (TCLE) já foram aplicados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta TCLE.

**Recomendações:**

- 1) Uma vez esclarecido que o projeto utilizará amostras já coletadas, sugere-se que os pesquisadores verifiquem a possibilidade de contatar os participantes do projeto 20160539, para obter autorização para o novo uso das amostras, conforme consta no consentimento deste projeto anterior.
- 2) Deverão ser submetidos ao CEP, por meio de notificação, Termos de Compromisso para Uso de Material Biológico e Informações Associadas, assinados por todos os pesquisadores envolvidos no presente projeto. Os mesmos deverão ser elaborados para todos os participantes da pesquisa diretamente no Sistema AGHUse Pesquisa, no cadastro do próprio projeto, e, após gerar os arquivos em pdf e assiná-los eletronicamente, adicioná-los na Plataforma Brasil como "outros".
- 3) Corrigir no TCLE o número da sala do CEP: 2229, pois houve modificação no número da sala.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.699.939 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 20/11/2019. Não apresenta novas pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto e TCLE de 20/11/2019 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 100 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51) 3359-7640 Fax: (51) 3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL &  
HCPA**



Continuação do Parecer: 3.745.023

financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.

c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.

d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.

e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1452268.pdf	20/11/2019 09:28:05		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Revisado.docx	20/11/2019 09:26:16	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Revisado.docx	20/11/2019 09:25:59	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_16_0539.doc	20/11/2019 09:25:31	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
Outros	Carta_Resposta.docx	20/11/2019 09:23:50	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPlatafBrasil.pdf	23/10/2019 22:48:07	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Delegacao_funcao.pdf	22/10/2019 15:18:19	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	folharostoassinada.pdf	17/10/2019 13:27:45	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
Declaração de	Termo_compromisso_materialbiologi	17/10/2019	MAXUEL CRUZ DOS	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229  
Bairro: Santa Cecília CEP: 96.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

**UFRGS - HOSPITAL DE  
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL &**  
HCPA



Continuação do Parecer: 3.745.523

Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biorrebanco	co.pdf	08:39:55	SANTOS	Aceito
Parecer Anterior	Aprovacao_projetomaior.pdf	17/10/2019 08:34:59	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_plataformabrasil.pdf	17/10/2019 08:32:00	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
Orçamento	orcamentoplataforma.pdf	17/10/2019 08:31:28	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_Plataforma.pdf	17/10/2019 08:28:38	MAXUEL CRUZ DOS SANTOS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 05 de Dezembro de 2019

Assinado por:

**Tâmia Maria Félix**  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 3229  
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: (51) 3359-7640 Fax: (51) 3359-7640 E-mail: cnp@hcpa.edu.br