

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ELIUS ANDRÉS PAZ CRUZ

**ESTUDO DOS MARCADORES PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 E ERG EM AMOSTRAS DE
URINA DE PACIENTES COM HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA E CÂNCER DE PRÓSTATA**

Ribeirão Preto

2019

ELIUS ANDRÉS PAZ CRUZ

**ESTUDO DOS MARCADORES PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 E ERG EM AMOSTRAS DE
URINA DE PACIENTES COM HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA E CÂNCER DE PRÓSTATA**

**Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.**

Área de Concentração: Genética

**Orientador: Prof. Dr. Victor Evangelista de
Faria Ferraz**

**Ribeirão Preto
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Paz-Cruz, Elius Andres

Estudo dos marcadores PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 E ERG em amostras de urina de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

Ribeirão Preto, 2019.

Xx f.: il; 30cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

Palavras-chave: Câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, marcadores, urina, diagnóstico, qPCR

FOLHA DE APROVAÇÃO

PAZ-CRUZ, Elius Andres

Estudo dos marcadores PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 E ERG em amostras de urina de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Victor Ferraz, por toda sua contribuição, compreensão e dedicação em toda orientação.

Aos meus pais que tanto amo, por torcerem e confiarem em mim, por todo ensinamento e incentivo, sem os quais nada seria possível.

A minha irmã, por todo companheirismo e cumplicidade.

Aos amigos que tornaram minha estadia no Brasil mais amena.

A Jorge, Teva e Sindy, que de certa forma se tornaram a minha família em Ribeirão Preto.

A Izolda, Jailton, Isoldinha e Cibely que me possibilitaram um convívio familiar ímpar, me acolhendo em todos os momentos necessários.

Aos amigos que mesmo longe sempre estiveram torcendo por mim e mandando suas energias e vibrações.

A equipe do departamento de ajuda ao estudante estrangeiro por todo empenho e ajuda em momentos críticos e burocráticos.

Aos companheiros de laboratórios por toda parceria e colaboração.

A todos os funcionários do departamento de genética da FMRP-USP.

A todos envolvidos direta e indiretamente no atendimento dos pacientes desse estudo.

Aos órgãos financiadores, a FAEPA-HCFMRP e ao CNPq pelos investimentos no presente estudo.

Agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram para a construção desse estudo.

RESUMO

PAZ-CRUZ, E.A. Estudo dos marcadores PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 E ERG em amostras de urina de pacientes com hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata. 2019. xxf. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2019.

O Câncer de Próstata (CaP) é a neoplasia maligna mais prevalente no sexo masculino, o segundo tipo de câncer mais diagnosticado em homens e o quarto mais comum no mundo. No Brasil, o CaP é o tumor maligno mais diagnosticado e o segundo que mais leva ao óbito. Deste modo, o teste e descoberta de biomarcadores moleculares que possam melhorar o diagnóstico, seguimento e prognóstico da doença, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento tem se tornado um dos objetivos essenciais das pesquisas neste campo. O presente estudo determinou a expressão relativa dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, ERG e TDRD1 em amostras de urina pós massagem prostática de pacientes encaminhados ao Ambulatório de Urologia da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) com indicação de biopsia prostática para investigação de CaP. Os pacientes que participaram no estudo foram divididos em dois grupos: pacientes com CaP do tipo adenocarcinoma (n=46) e pacientes com HBP (n=80), estes últimos constituíram o grupo controle para testar a especificidade dos marcadores. A análises estatísticas demonstraram que existe uma diferença significativa na expressão do gene GOLPH2 e SPINK1 entre os pacientes com CaP e HPB ($p=0,003$; $p=0,035$). A área obtida sob a curva ROC para o teste com o gene GOLPH2 foi 0,692, a sensibilidade 54,35% e a especificidade 77,14%. O teste com gene SPINK1 apresentou uma área sob a curva ROC de 0,637, e a sensibilidade e a especificidade foram de 72,34% e 57,14% respectivamente. Conclui-se que o teste quantitativo de expressão relativa dos genes GOLPH2 e SPINK1 aponta ser um biomarcador útil na diferenciação entre pacientes com CaP ou HPB. Sugere-se a criação de um painel com estes dois marcadores com o objetivo de criar um teste que seja altamente sensível e específico.

Palavras-chave: Câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, marcadores, urina, diagnóstico, qPCR

ABSTRACT

PAZ-CRUZ, E.A. Study of PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 and ERG markers in urine samples from patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. 2019. xxf. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2019.

Prostate cancer (CaP) is the most prevalent malignant neoplasm in men, the second most diagnosed type of cancer in men and the fourth most common in the world. In Brazil, CaP is the most diagnosed malignant tumor, and the second most frequent malignant tumor. In this way, testing and discovering molecular biomarkers that can improve the diagnosis and prognosis of the disease, besides helping to develop new treatment modalities, has become one of the essential objectives of the research in this field. The present study determined the relative expression of PCA3, GOLPH2, SPINK1, ERG and TDRD1 genes in urine samples after prostate massage of patients referred to the Urology Clinic of the University of São Paulo (HC-FMRP-USP) with indication of prostate biopsy for prostate cancer investigation. Patients who participated in the study were divided into two groups: patients with prostate cancer (n = 46) and patients with benign prostatic hyperplasia (n = 80), the last one, was the control group to test the specificity of the markers. Statistical analyzes demonstrated that there is a significant difference in the expression of the GOLPH2 and SPINK1 gene among patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia (p = 0.003; p = 0.035). The area under the ROC curve for the GOLPH2 gene test was 0.692, the sensitivity was 54.35%, and the specificity was 77.14%. The SPINK1 gene test showed an area under the ROC curve of 0.637, and the sensitivity and specificity were 72.34% and 57.14%. It is concluded that the quantitative test of relative expression of the genes GOLPH2 and SPINK1 points out to be a useful biomarker in the differentiation between patients with prostate cancer and benign prostatic. It is suggested to create a panel with these two markers in order to create a test that is highly sensitive and specific.

Keywords: Prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, urinary markers, diagnosis, qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização da Próstata.....	13
Figura 2. Anatomia da Próstata.....	14
Figura 3. Histologia da Próstata.....	15
Figura 4. a) Próstata normal, b) Hiperplasia prostática benigna.	16
Figura 5. Desenvolvimento do câncer de próstata.....	19
Figura 6. Classificação de Gleason.	23
Figura 7. Expressão do gene PCA3 a) pacientes com CaP e HPB; b) amostras pré-biopsia e pós-biopsia; c) pacientes com CaP de baixo, intermediário e alto risco.....	38
Figura 8. Expressão do gene GOLPH2. a) pacientes com CaP e HPB. b) amostras pré-biopsia e pós-biopsia; c) pacientes com CaP de baixo, intermediário e alto risco.....	39
Figura 9. Expressão do gene SPINK1. a) pacientes com CaP e HPB. b) amostras pré-biopsia e pós-biopsia; c) pacientes com CaP de baixo, intermediário e alto risco.....	40
Figura 10. Curva ROC para expressão dos genes a) PCA3, b) GOLPH2, c) SPINK1, d) TDRD1 e e) ERG.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de tumores malignos da próstata.....	24
Tabela 2. Sondas utilizadas nos ensaios.....	33
Tabela 3. Expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG em pacientes com CaP e HPB.....	36
Tabela 4. Expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG em amostras pré-biopsia.....	36
Tabela 5. Expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG em pacientes com CaP de baixo, intermediário e alto risco.	37
Tabela 6. Parâmetros da curva ROC para expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG.....	42
Tabela 7. Coeficientes de correlação para as variáveis do grupo CaP.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>CaP</i>	Câncer de Próstata
<i>CK18</i>	Citoqueratinas 18
<i>CK8</i>	Citoqueratinas 8
<i>Ct</i>	Cycle threshold
<i>DNA</i>	Ácido Desoxirribonucleico
<i>DRE</i>	Exame Digital Retal
<i>FC</i>	Fold Change
<i>GOLPH2</i>	Fosfoproteína de Antígeno de Membrana do Complexo de Golgi
<i>HCFMRP</i>	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
<i>hK3</i>	Calicreina glândular humana
<i>HPB</i>	Hiperplasia Prostática Benigna
<i>IARC</i>	Agencia Internacional de Pesquisa em Câncer
<i>INCA</i>	Instituto Nacional do Câncer
<i>NHI</i>	Instituto Nacional de Saúde
<i>PAP</i>	Fosfatase Ácida Prostática
<i>PCA3</i>	Antígeno 3 do Câncer de Próstata
<i>PCA3</i>	Antígeno 3 do Câncer de Próstata
<i>PSA</i>	Antígeno Prostático Especifico
<i>PSAD</i>	Densidade do PSA
<i>RNA</i>	Acido Ribonucleico
<i>RTU</i>	Ressecção transuretral
<i>SPINK1</i>	Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 1
<i>TCLE</i>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>TDRD1</i>	Tudor domain-containing protein 1
<i>tPSA</i>	PSA total

SUMÁRIO

1. Introdução	13
1.1 Anatomia e Fisiologia Prostática	13
1.2 Patologias Prostáticas	15
1.2.1 Prostatite	15
1.2.2 Hiperplasia Prostática Benigna	15
1.2.3 Câncer de Próstata	17
1.2.3.1 Epidemiologia	17
1.2.3.2 Desenvolvimento Patológico	18
1.2.3.3 Diagnóstico	19
1.2.3.3.1. Antígeno Prostático Específico	19
1.2.3.3.2 Exame Digital Retal (DRE) ou Exame de Toque Retal	20
1.2.3.3.3 Velocidade do PS	20
1.2.3.3.4 Densidade do PSA	21
1.2.3.3.5 PSA Livre pelo PSA Total	21
1.2.3.3.6 Biópsia Prostática	21
1.2.3.3.7 Classificação de Gleason	22
1.2.3.3.8 Estadiamento	23
1.2.3.3.9 Tratamento	25
1.2.3.4 Marcadores Moleculares	25
1.2.3.4.1 PCA3	26
1.2.3.4.2 GOLPH2	27
1.2.3.4.3 TMPRSS2: ERG	27
1.2.3.4.4 SPINK1	28
1.2.3.4.5 TDRD1	29
1.2.3.4.6 Outros Biomarcadores	29

2. Objetivos	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3. Metodologia	32
3.1 Obtenção das Amostras	32
3.2 Processamento das Amostras	32
3.3 Extração de RNA	32
3.4 Síntese do cDNA	33
3.5 PCR Tempo Real (qPCR)	33
3.6 Análise Estatística	34
4. Resultados	35
5. Discussão	44
6. Conclusões	50
7. Referencias	51
8. Anexos	57

1. INTRODUÇÃO

1.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA PROSTÁTICA

A próstata é uma glândula masculina localizada abaixo da bexiga e anterior ao reto (Figura 1). Num homem adulto, esta glândula tem um peso médio de 20 gramas e possui cerca de 3 cm de comprimento, 4 cm de largura e 2 cm de profundidade (MOORE, DALY, & Agur, 2010).

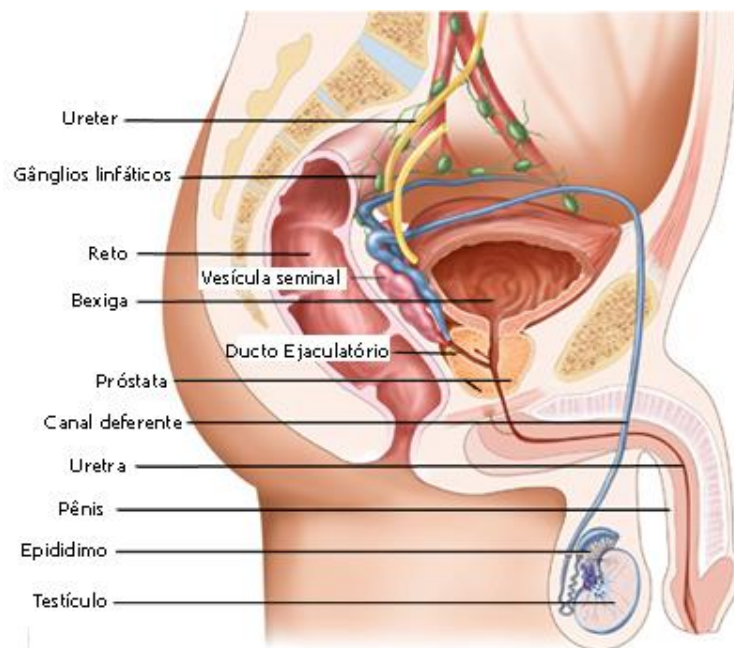


Figura 1. Localização da próstata. Adaptado de Oregon Health & Science University (2019)

Muitos anos antes e depois dos estudos de Lowsey (1912), acreditava-se que a próstata tinha uma estrutura anatômica que estava formada por 6 lobos contínuos e não separáveis (CHAGAS, BABINSKI, COSTA, & SAMPAIO, 2002). Porém, os diversos estudos de McNeal, modificaram este conceito, uma vez que confirmaram que essa divisão só existe durante o período fetal. Segundo McNeal a próstata pode ser dividida em 4 zonas anatômicas distintas: zona anterior, zona periférica (70% do volume prostático), zona central (25% do volume prostático) e zona de transição (5% do volume prostático) (Figura 2) (MCNEAL, The zonal anatomy of the prostate, 1981).

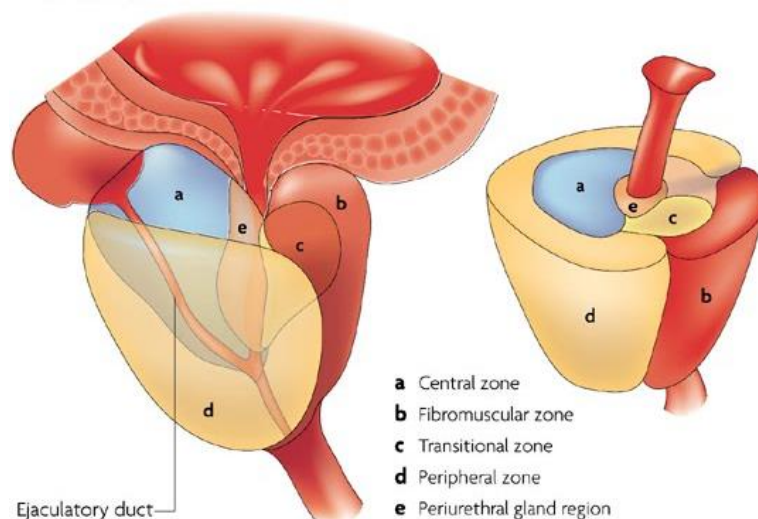


Figura 2. Anatomia da próstata. Adaptado de REEVES, EVERAERTS, MURPHY, & COSTELLO (2016)

Os estudos de McNeal tem um significado clínico muito importante, uma vez que se comprovou que as patologias prostáticas são de natureza diferente nas diferentes zonas descritas. Assim cerca de 80% dos carcinomas prostáticos têm origem na zona periférica, 10-20% na zona de transição e 5-10% na zona central. A hiperplasia prostática benigna origina-se na zona de transição num 70% das biópsias (MCNEAL, REDWINE, FREIHA, & STAMEY, 1988; CHAGAS, BABINSKI, COSTA, & SAMPAIO, 2002).

A principal função da próstata é armazenar e secretar um fluido alcalino que constitui cerca de 10-30% do volume do fluido seminal. O seu desenvolvimento é regulado por hormônios esteroides além de também depender de uma complexa interação entre o epitélio e estroma prostáticos ainda pouco compreendida. O estroma prostático é composto por diversos tipos de células, todas elas presas em uma matriz extracelular feita de diversos tipos de colágenos e glicoproteínas, já o epitélio prostático é composto por 3 diferentes tipos de células: células basais, luminas e neuroendócrinas. As células basais levam ao crescimento das células intermediárias, que se proliferam e se deslocam através do compartimento luminal, dando origem às células luminas, estas últimas são androgênio-sensíveis e expressam o antígeno prostático específico (PSA), a fosfatase ácida prostática (PAP) e as citoqueratinas 8 e 18 (CK8 e CK18). As células neuroendócrinas são quiescentes, expressam marcadores específicos e podem ter uma função regulatória através de diversos peptídeos (MCNEAL, The zonal anatomy of the prostate, 1981).

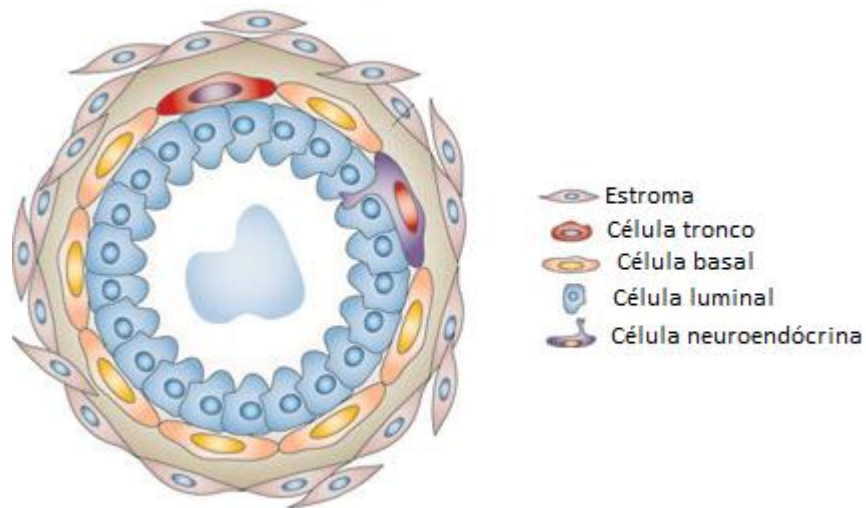


Figura 3. Histologia da próstata. Adaptado de REEVES, EVERAERTS, MURPHY, & COSTELLO (2016)

1.2. PATOLOGIAS PROSTÁTICAS

1.2.1. PROSTATITE

A prostatite é uma infecção ou inflamação da glândula prostática. Segundo o Instituto Nacional da Saúde (NHI), pode ser classificada em quatro categorias: (RYBICKI, et al., 2016; VERMASSEN, et al., 2015)

- Tipo I: Infecção bacteriana aguda sintomática
- Tipo II: Infecção bacteriana crônica sintomática
- Tipo III: Inflamação crônica sintomática (síndrome de dor pélvica)
- Tipo IV: Inflamação assintomática

A prostatite tipo I é mais comum em homens jovens, enquanto as três restantes estão associadas ao aumento da idade (RYBICKI, et al., 2016). O diagnóstico da doença é baseado no histórico do paciente, exames médicos e laboratoriais, e o tratamento depende da identificação da causa (SCHILLER & PARIKH, 2011; ALSHAHRANI, MCGILL, & AGARWAL, 2013).

1.2.2. HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA

A hiperplasia prostática benigna (HPB) ou hiperplasia nodular da próstata caracteriza-se pela presença de nódulos na zona periuretral da próstata, ocasionando hiperplasia da glândula (Figura 2) (SROUGI, PIOVESAN, COLOMBO, & NESRALLAH, 2013). Os sintomas mais comuns da HPB são a dificuldade para urinar, diminuição do fluxo urinário, noctúria, incontinência e infecções recorrentes do trato urinário (EDWARDS, 2008; MCVARY, 2010)

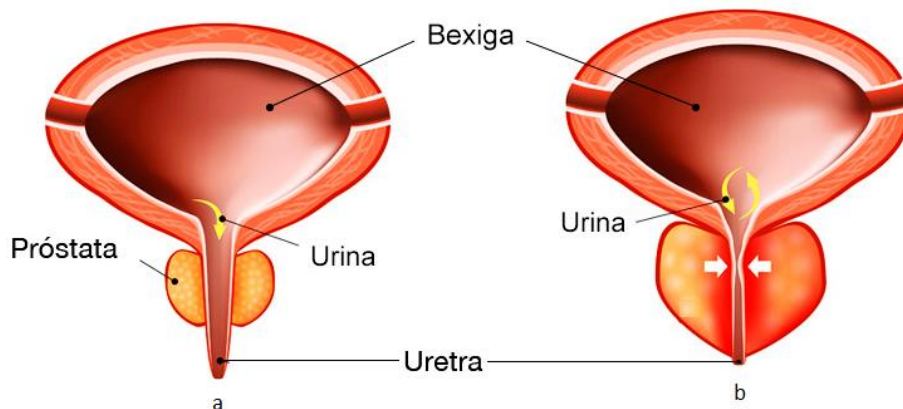


Figura 4. a) Próstata normal; b) Hiperplasia prostática benigna. Adaptado de Hospital Israelita Albert Einstein (2019)

A prevalência da HPB está associada ao aumento da idade, indo de 20% em homens maiores de 40 anos, até 90% em homens acima de 70 anos. O rastreamento da doença é realizado através da dosagem de PSA, o exame de toque retal e a história clínica do paciente; e a exclusão do diagnóstico é feita através da biópsia prostática (EDWARDS, 2008; MCVARY, 2010).

O tratamento da afecção realiza-se através de medicamentos ou intervenções cirúrgicas. Os bloqueadores alfa-adrenérgicos e os inibidores de 5-alfa-redutase tem demonstrado eficácia no alívio dos sintomas da doença; os primeiros viabilizam o relaxamento do músculo liso ao bloquearem os receptores alfa-adrenérgicos, já os últimos, inibem a conversão de testosterona em di-hidrotestosterona, suprimindo assim o crescimento da próstata. A ressecção transuretral (RTU), promove alívio permanente dos sintomas e é considerada como o procedimento mais eficiente para tratar a HPB, porém novas técnicas cirúrgicas à laser têm eficiência comparável a RTU e com menor morbidade (EDWARDS, 2008; MCVARY, 2010; SROUGI, PIOVESAN, COLOMBO, & NESRALLAH, 2013).

1.2.3. CÂNCER DE PRÓSTATA

1.2.3.1. EPIDEMIOLOGIA

O Câncer de Próstata (CaP) é um dos tumores sólidos mais graves e de maior incidência no sexo masculino, é a segunda neoplasia maligna mais diagnosticada em homens, o quarto tipo de câncer mais comum no mundo (excluindo o câncer de pele não-melanoma) e o mais prevalente em homens. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), no ano 2018 foram registrados 1.276.106 novos casos e 358.989 óbitos em todo o mundo, sendo a oitava causa de morte por câncer (3,8% de todas as causas de morte por câncer no mundo) (FERLAY, et al., 2018).

Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o CaP é o tumor maligno mais diagnosticado entre os homens no Brasil (excluindo o câncer de pele não-melanoma) e o segundo que mais leva ao óbito. Para o ano 2018 estimou-se cerca de 68.220 novos casos (Instituto Nacional de Câncer, 2019).

Cerca de três quartos dos casos de CaP no mundo atingem pacientes com idade superior aos 65 anos, decorrente principalmente do aumento da expectativa de vida da população nas últimas décadas, da evolução dos métodos de rastreamento e diagnóstico, bem como da melhoria na qualidade de vida da população (GOMES, FIGUEIREDO DE SOUSA REBELLO, CARVALHO DE ARAÚJO, & FERREIRA DO NASCIMENTO, 2008). Com o aumento da idade, a maioria dos homens desenvolverá focos microscópicos de células neoplásicas, caso pertençam a populações de alto risco para a forma invasiva da doença (YATANI, et al., 1982). Diversos estudos de autópsias concluíram que aproximadamente 30% dos homens acima de 50 anos apresentam evidências de CaP (JEMAL, SIEGEL, XU, & WARD, 2010; GOMES, FIGUEIREDO DE SOUSA REBELLO, CARVALHO DE ARAÚJO, & FERREIRA DO NASCIMENTO, 2008). Porém, só uma pequena porcentagem destes apresentará a doença de forma invasiva e uma porcentagem ainda menor terá morte prematura devido à neoplasia (JEMAL, SIEGEL, XU, & WARD, 2010).

O único fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento do CaP é a idade, pois tanto a incidência quanto a mortalidade aumentam exponencialmente após os 50 anos (Instituto Nacional de Câncer, 2019). Outros fatores de risco, embora ainda não esclarecidos, incluem dieta, etnia, história familiar e doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) (STEINBERG, CARTER, BEATY, CHILDS, & WALSH, 1990; CARTER, BEATY, STEINBERG, CHILDS, & WALSH, 1992; HAAS & SAKR, *Epidemiology of prostate cancer*, 1997; BRATT, 2002).

Uma dieta baseada em gordura animal, carne vermelha e lácteos, tem sido indicada como fator de risco importante na etiologia do CaP (KOLONEL, 2001). Em contrapartida, uma dieta rica em vegetais, vitaminas, licopeno e ômega-3 tem sido apontada como proteção no desenvolvimento da neoplasia (LOU, QIAO, TALONPOIKA, SYVÄLÄ, & TUOHIMAA, 2004; CHAN, GANN, & GIOVANNUCCI, 2005). Além disso, o CaP é cerca de 1,6 vezes mais comum em homens de raça negra comparados com homens de raça branca, demonstrando que a relação da etnia/raça está associada com o desenvolvimento deste câncer (PLATZ, et al., 2000; HOFFMAN, et al., 2001).

Outros fatores de risco recentemente relacionados ao CaP são as prostatites e as doenças sexualmente transmissíveis, como sífilis e gonorreia (HUANG, et al., 2008; SUTCLIFFE, et al., 2006). Diversas pesquisas demonstram que a inflamação crônica gerada nestas patologias estimula a liberação de citocinas inflamatórias e espécies reativas do oxigênio que estimulam a proliferação celular e conseqüentemente a carcinogênese (COUSSENS & WERB, 2002).

1.2.3.2. DESENVOLVIMENTO PATOLÓGICO

O CaP é biologicamente heterogêneo, com alguns carcinomas seguindo um curso clínico indolente, ou seja, confinados à próstata e com poucos sintomas clínicos no decorrer do tempo de vida, enquanto outros casos culminam em doença metastática, que pode ser letal (ABATE-SHEN & SHEN, 2000; DEWEESE, et al., 2004).

Geralmente, o CaP inicia-se com uma neoplasia intra epitelial (formas celulares variadas, aumento do tamanho das células e perda da arquitetura da glândula), e a metástase acontece quando há invasão ao estroma e outros tecidos (ABATE-SHEN & SHEN, 2000).

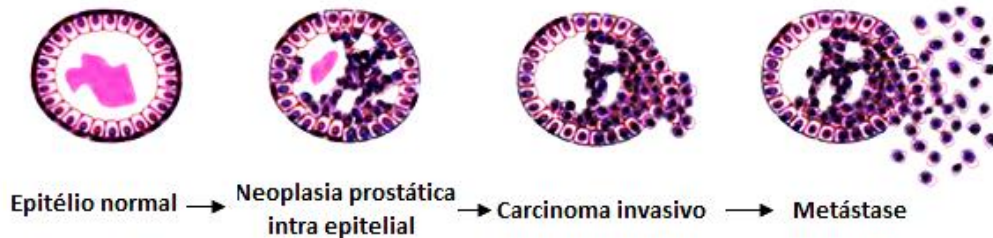


Figura 5. Desenvolvimento do câncer de próstata. Adaptado de REEVES, EVERAERTS, MURPHY, & COSTELLO (2016)

1.2.3.3. DIAGNÓSTICO

Apesar da importante incidência do CaP, seu mecanismo biológico ainda é pouco compreendido. Atualmente, os principais procedimentos utilizados para diagnosticar o CaP são a determinação sérica do antígeno prostático específico (PSA) e o exame digital retal. Quando estes exames preliminares sugerem a existência da doença, é indicada a biópsia prostática transretal, e o diagnóstico confirmatório é feito pelo estudo histopatológico do tecido obtido na biópsia.

1.2.3.3.1. ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA)

O PSA é uma caliceína secretada pelas células epiteliais da próstata. Esta glicoproteína, também conhecida como hK3 - caliceína glandular humana, é codificada pelo gene KLK-3 que se localiza no braço longo do cromossomo 19 (YOUSSEF & DIAMANDIS, 2003; RYBICKI, et al., 2016). Uma das principais funções do PSA é a degradação das proteínas semilogelina e fibronectina a fim de aumentar a fluidez do coágulo seminal após ejaculação (LILJA, et al., 1991).

A determinação do nível sérico de PSA é de grande utilidade para detecção e prognóstico do CaP, porém, não deve ser utilizado como um único parâmetro avaliado, uma

vez que seu aumento é mais sensível do que específico nesta patologia. O PSA não é produzido especificamente pelas células cancerosas, portanto o nível de referência de PSA aceito como normal (< 4 ng/ml), pode estar alterado devido a outras patologias, tais como, hiperplasia prostática benigna, prostatite e variação hormonal, assim como depois da ejaculação ou do exame de toque retal (NADLER R.B. et al. 1995; INCA, 2002).

Desde a introdução do teste do Antígeno Prostático Específico (PSA) para rastreamento e monitoramento da recorrência e progressão do CaP em 1986, a incidência da doença aumentou em 85% entre os anos de 1987 e 1992. Acredita-se que esse aumento seja decorrente dos diagnósticos de tumores em estágios precoces (Gleason grau 5–7) em pacientes triados por PSA (RIEGMAN, VLIETSTRA, et al. 1991; BALK, K.O, et al. 2003; RIFFENBURGH & AMLING 2003).

Apesar de todas as controvérsias, a determinação do nível sérico de PSA ainda é muito útil e importante na detecção e seguimento do CaP, já que é um teste rápido, barato e padronizado, cujo resultado é capaz de predizer o nível de risco desta neoplasia (SCHRÖDER F.H, et al., 2009).

1.2.3.3.2. EXAME DIGITAL RETAL (DRE) OU EXAME DE TOQUE RETAL

Mesmo apresentando uma grande variabilidade dependendo do médico examinador e resultando embaraçoso, desconfortável e eventualmente doloroso para o paciente, o DRE é considerado indispensável no rastreio do CaP. Durante o exame, o médico avalia o tamanho, a consistência, a mobilidade, a delimitação e regularidade da glândula através do reto do paciente. O DRE tem uma sensibilidade de 70%, uma especificidade de 90% e tem uma chance de 50% de falsos positivos.

1.2.3.3.3. VELOCIDADE DO PSA

A velocidade do PSA determina o quanto o PSA aumenta no período de um ano. O aumento de PSA acima de 0,75 ng/ml pode estar associado a um alto risco de CaP em indivíduos com PSA inicial entre 4 e 10 ng/ml (RIFFENBURGH & AMLING, 2003).

Riffenburgh et al. (2003), determinaram que a velocidade do PSA pode prever casos de biópsia positiva em 68% dos pacientes com valor de PSA sérico de 4 ng/ul e em 52% dos pacientes com valor de PSA sérico de 10 ng/ul (RIFFENBURGH & AMLING, 2003).

1.2.3.3.4. DENSIDADE DO PSA

É a fração do PSA sérico total pelo volume prostático (determinado mediante ultrassom transretal). O valor de referência sugerido é 0,15 ng/ml/cm³. Embora Catalona et al. (1998) estabeleceram que uma densidade do PSA (PSAD) maior que 0,15 ng/ml/cm³ contribui na detecção precoce do CaP em 50% dos pacientes com PSA entre 4 e 10ng/mL, outros autores não acharam nenhuma associação significativa entre o CaP e o PSAD (BENSON, et al., 1992).

1.2.3.3.5. PSA LIVRE PELO PSA TOTAL

O PSA sérico está complexado ao inibidor de protease α -1 antiqumiotripsina ou livre (fPSA); estas duas formas somadas constituem o PSA total (tPSA). Um valor de PSA livre dividido pelo PSA total (%fPSA) menor que 25%, aumenta a probabilidade de CaP em 95%, em pacientes com valores de tPSA entre 4 e 10 ng/ul (BRAWER, ARAMBURU, et al., 1993).

1.2.3.3.6. BIÓPSIA PROSTÁTICA

A biópsia prostática transretal é o exame padrão ouro para o diagnóstico do CaP, porém, é um procedimento invasivo que pode acarrear complicações tais como dor, sangramento retal, hematúria, hemoespermia e infecções. Em virtude disto, a necessidade da sua realização deve ser avaliada pelo médico tratante com base nos níveis de PSA, o exame de toque retal, a idade do paciente e as prováveis consequências (LOEB, CARTER, et al., 2011).

As indicações para a realização da biópsia prostática são a presença de nódulos prostáticos detectados no toque retal e níveis de tPSA acima de 4 ng/ml. Em pacientes mais jovens (menos de 55 anos) é indicada quando o nível de tPSA é maior a 2,5 ng/ml, quando a

PSAD é maior a 0,15 ng/ml/cm³ ou quando a velocidade do PSA é maior a 0,75 ng/ul/ano. É importante mencionar que uma única dosagem de PSA não justifica a realização de uma biópsia, sendo assim, a dosagem tem que ser repetida depois de várias semanas, pelo mesmo método e no mesmo laboratório. Além disso, as condições que elevem o PSA, tais como a ejaculação e infecções, devem ser evitadas ou relatadas antes do exame (LOEB, CARTER, et al., 2011).

Durante o procedimento, retira-se de 8 a 18 fragmentos de tecido prostático e para realizar o exame histopatológico e o diagnóstico definitivo é obtido com o laudo deste último exame.

1.2.3.3.7. CLASSIFICAÇÃO DE GLEASON

Os fragmentos de tecido prostático obtidos durante a biópsia são analisados e classificados em 5 escores de acordo com a arquitetura das glândulas presentes no fragmento. Estes escores, ajudam a determinar o prognóstico da doença e a melhor forma de tratamento, sendo que no escore 1, o CaP é o menos agressivo, o tecido é semelhante ao tecido normal, e as glândulas são pequenas, bem delimitadas e próximas; enquanto que no escore 5, o CaP é o de pior prognóstico e os tecidos já não possuem glândulas reconhecíveis (Figura 4) (GLEASON, 1966; HUMPHREY, 2004).

A classificação de Gleason é a soma dos 2 escores mais frequentes no fragmento analisado e determina a probabilidade de uma metástase ocorrer nos próximos 10 anos. O primeiro escore representa a maior parte do tumor (mais do que 50%), e o segundo representa o segundo escore mais frequente. Uma classificação de Gleason de 2 a 4 representa uma probabilidade de disseminação do CaP de 25%, um escore de 5 a 7 representa uma probabilidade de 50%, enquanto uma classificação de 8 a 10, representa uma probabilidade de 57% (GLEASON, 1966; HUMPHREY, 2004).

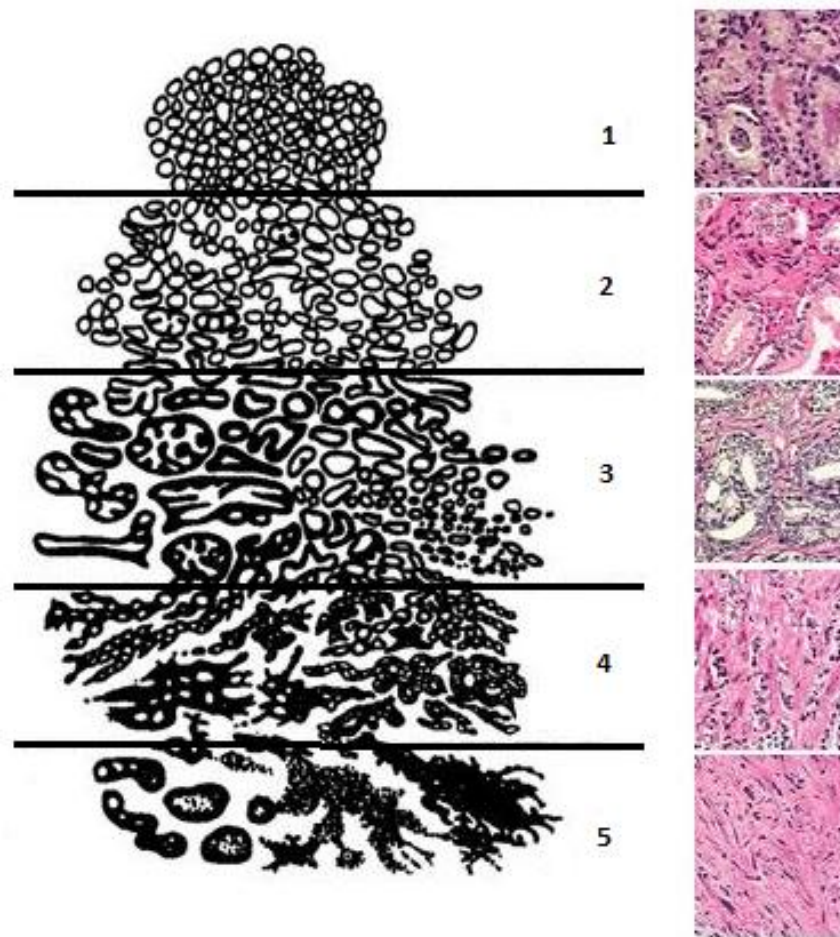


Figura 4. Classificação de Gleason. Adaptado de REEVES, EVERAERTS, MURPHY, & COSTELLO (2016)

1.2.3.3.8. ESTADIAMENTO

O estadiamento fundamenta-se na determinação do grau de disseminação do CaP, a fim de estabelecer o prognóstico da doença e elaborar de um plano de tratamento.

O método mais utilizado para determinar estadiamento é o Sistema TNM de Classificação de Tumores Malignos. O Sistema TNM avalia a extensão anatômica da doença, tomando em conta os seguintes parâmetros: características do tumor primário (T), status dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se encontra (N), e presença ou ausência de metástases (M) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação de tumores malignos da próstata

T – Tumor Primário	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou visível por meio de exame de imagem
T1a	Achado histológico incidental em 5% ou menos de tecido ressecado
T1b	Achado histológico incidental em mais de 5% de tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (p.ex., devido a PSA elevado)
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor que envolve uma metade de um dos Lobos ou menos
T2b	Tumor que envolve mais da metade de um dos lobos, mas não ambos os lobos
T2c	Tumor que envolve ambos os lobos
T3	Tumor que se estende através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (uni- ou bilateral)
T3b	Tumor que invade vesícula(s) seminal(ais)
T4	Tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes (exceto vesículas seminais): colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores do ânus, ou parede pélvica
N - Linfonodos Regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em linfonodo regional
M - Metástase à Distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
M1a	Linfonodo(s) não regional(ais)
M1b	Osso(s)
M1c	Outra(s) localização(ões)

1.2.3.3.9. TRATAMENTO

O tratamento para o CaP depende do estágio da doença. Os tratamentos utilizados são a radioterapia, a quimioterapia, a terapia hormonal ou a prostatectômica. Para tratar um tumor localizado, a radioterapia ou a prostatectômica são as opções mais comuns. A radioterapia utiliza radiação externa com capacidade para atingir células tumorais na extremidade da glândula, porém esta abordagem terapêutica pode danificar outros órgãos e ocasionar reações adversas no paciente durante o tratamento. A prostatectômica retira toda a glândula incluindo o tumor e as vesículas seminais; este é um procedimento agressivo e pode ocasionar complicações como incontinência urinária e impotência sexual (TONON, 2009;).

E estágios avançados da doença, recorre-se à radioterapia ou à prostatectômica em combinação com terapia hormonal, durante a qual são utilizados hormônios que impedem a produção de testosterona ou bloqueiam sua ação na próstata. O tratamento quimioterápico também é utilizado no CaP metastático, mas sua eficácia ainda é discutida (TONON, 2009;).

1.2.3.4. MARCADORES MOLECULARES

Apesar dos recentes avanços nas modalidades de tratamento, cirurgias, radiação, e terapias hormonais ainda se verifica uma série de complicações para os pacientes com CaP. Dessa maneira, é necessário o desenvolvimento de métodos de distinção dos cânceres agressivos daqueles indolentes para que a morbidade significativa, resultante de tratamentos equivocados, seja reduzida (MICHAELSON M.D., et al. 2008).

Visto todas essas limitações em relação ao CaP, estudos vêm sendo empreendidos com objetivo principal de buscar novos biomarcadores, estes são macromoléculas cujo aparecimento ou alteração na concentração está relacionado com a gênese e o crescimento de células neoplásicas. Os biomarcadores tumorais podem ser produzidos diretamente pelo tumor ou pelo organismo em resposta à presença do tumor e podem ser úteis nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognósticas, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento (ALMEIDA, J.R.C. et al. 2007).

No entanto, apesar dos esforços, até hoje nenhum biomarcador individual mostrou-se como ideal, porém vários destes vêm sendo estudados na atualidade, e considerando a heterogeneidade do CaP, é possível que a combinação de diversos biomarcadores possa fornecer instrumentos que possibilitarão auxiliar o diagnóstico precoce, o tratamento e o prognóstico, assim como elucidar o seu mecanismo biológico subjacente. Deste modo, será possível elevar a expectativa de vida, bem como da melhoria na qualidade de vida da população.

1.2.3.4.1. PCA3

A busca de biomarcadores mais específicos no diagnóstico e seguimento do CaP, levou em 1999 ao descobrimento do gene do Antígeno 3 do Câncer de Próstata (PCA3). O gene é altamente sobre expresso em pacientes com câncer de próstata, em relação a aqueles com a próstata normal ou com uma hiperplasia prostática benigna. Sendo assim, múltiplas pesquisas foram desenvolvidas a fim de tornar possível a determinação precisa da expressão do gene PCA3 nas células cancerosas da próstata (GUTMAN S., et al., 2013).

As pesquisas deram como resultado um teste para detecção do PCA3 que atualmente está disponível sob o nome comercial de Progenisa[®] PCA3 (GROSKOPF J. et al., 2006). O teste do PCA3 mostrou ser mais efetivo que o nível de PSA no soro em prever os resultados das biópsias prostáticas, possui uma alta especificidade (entre 80% e 90%), porém os valores de sensibilidade são de entre 53% e 84%, questionando assim o seu valor clínico (VLAEMINCK-GUILLEM V. et al., 2010). A relação entre o nível de PCA3 e parâmetros de agressividade do CaP têm sido estudados com diferentes resultados, existem estudos que relatam uma relação positiva enquanto outros já não demonstram essa mesma relação (HESSELS D. et al., 2010; WHITMAN E.J. et al., 2008).

Após do descobrimento do PCA3, as pesquisas focadas na procura de novos biomarcadores continuaram com sucesso. Na atualidade os biomarcadores de ácido ribonucleico (RNA) são os que apresentam maior desenvolvimento, já que podem ser obtidos

de forma não invasiva na urina do paciente, o que permite aos urologistas fazer os exames de rotina com mais facilidade (TOMLINS S.A. et al. 2008).

1.2.3.4.2. GOLPH2

O gene GOLPH2 é uma Fosfoproteína de Antígeno de Membrana do Complexo de Golgi de função ainda desconhecida. Foi descrito em doenças do fígado, como um potencial marcador do carcinoma hepatocelular, mas recentemente, testes imunohistoquímicos determinaram que o gene GOLPH2 está superexpresso em tecidos com câncer de próstata (KRISTIANSEN G., et al. 2008). Pesquisas atuais descrevem ao mRNA do GOLPH2, como um possível biomarcador na detecção do câncer da próstata (LAXMAN B., et al. 2013).

1.2.3.4.3. TMPRSS2:ERG

Estudos citogenéticos e moleculares mostraram que os adenocarcinomas da próstata tendem a apresentar frequentes perdas de loci cromossômicos específicos, tais como 2q, 3q, 5q, 6q, 7q, 8q, 10q, 13q, 16q e 18q (COONEY K.A. et al. 1996; SRIKANTAN V. et al. 1999). Trabalhando com um novo algoritmo para analisar os perfis gênicos diferenciais gerados por microarranjos de amostras de CaP, Tomlins et al. (2005) identificaram rearranjos cromossômicos recorrentes e ampliações que estão diretamente envolvidas na patogênese do CaP.

Diversas pesquisas identificaram a fusão de elementos andrógeno responsivos do promotor do gene TMPRSS2 (21q22.2) a um oncogene semelhante ao v-ETS do vírus da eritroblastose E26 (ERG, 21q22.3) ou a uma sequência transformante do vírus da eritroblastose E26 do gene variante 1 (ETV1, 7p21.2), pertencentes à família ETS de fatores de transcrição (TOMLINS S.A., et al. 2005 e MORRIS D. S. et al., 2008). Os genes TMPRSS2 e ERG estão a 3 Mpb de distância no mesmo cromossomo, deste modo o rearranjo entre eles ocorre pela translocação entre os pares do cromossomo 21 ou por uma deleção intersticial entre eles no mesmo cromossomo (PERNER S., et al. 2006 e YOSHIMOTO M., et al. 2006).

O gene *TMPRSS2* codifica uma proteína do mesmo nome predominantemente ligada à membrana da face luminal do epitélio prostático (PAOLONI-GIACOBINO, A. et al. 1997; LIN B., et al. 1999; VAARALA M.H., et al. 2001) cuja expressão gênica é regulada por andrógenos (LIN, B.Y. et al. 1999) e encontra-se super expressa em pacientes com CaP, o que faz deste gene um potencial marcador genético da doença. Por outro lado, os membros da família ETS, são fatores de transcrição, atuam em cooperação com outros fatores de transcrição na regulação da diversidade das funções celulares, tais como a proliferação, diferenciação, angiogênese, hematopoiese, transformação oncogênica e apoptose (SETH A., et al. 2005).

No CaP, a fusão permite que os genes da família ETS sejam super expressos mediante estímulo androgênico, uma vez que passam a responder ao promotor do gene *TMPRSS2* (TOMLINS S.A. et al. 2005 e WANG J.A. et al. 2006). O rearranjo confere uma biologia distinta ao tumor, uma vez que os genes da família ETS passam a atuar como oncogenes e provavelmente em cooperação com outros eventos promovem a proliferação tumoral (SHAH R.B. et al. 2009).

Cerca de 90% das fusões do gene *TMPRSS2* com os membros da família ETS correspondem a fusão *TMPRSS2:ERG* (KUMAR-SINHA C. et al., 2008). As mais comuns envolvem a fusão dos éxons 1 ou 2 do gene *TMPRSS2* com os éxon 3, 4 ou 5 do gene *ERG*. As fusões menos frequentes incluem os éxons 4 ou 5 do *TMPRSS2* com os éxons 4 ou 5 do *ERG*. Recentemente, Tomlins et al. (2005) demonstrou que 79% dos casos de CaP estudados continham o rearranjo gênico. Em estudos subsequentes, de Soller et al. (2006) e Yoshimoto et al. (2006) frequências de 40% e 78% foram identificadas. Embora o significado clínico destas variantes seja pouco entendido há algumas fusões que têm sido associadas com pior prognóstico dessa neoplasia (WANG J. et al. 2006).

1.2.3.4.4. SPINK1

Tomlins et al., demonstraram a expressão do gene *SPINK1* (Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 1) em cânceres de próstata *TMPRSS2:ETS* negativos, além de fornecer evidências de que a expressão do *SPINK1* define um tipo agressivo de câncer de próstata (aproximadamente 10% dos casos) não atribuível a genes de fusão já conhecidos. A hipótese

é que as alterações moleculares que inicialmente dirigem os tumores ETS negativos, podem predispor a ativação da expressão do SPINK1 logo na progressão do câncer de próstata (TOMLINS S.A. et al. 2008).

1.2.3.4.5. TDRD1

Diversos estudos identificaram ao gene TDRD1 como um dos mais diferencialmente expressos entre os rearranjos ERG positivo e negativo do câncer de próstata. O gene TDRD1 não é transcrito no epitélio normal da próstata, inicialmente foi identificado como um antígeno expresso nos testículos, mas silenciado em tecidos somáticos adultos. Porém o ERG e o TDRD1 são coexpressos no câncer de próstata, a hipótese é que o ERG ativa a transição do TDRD1 induzindo uma perda de metilação do DNA no promotor do TDRD1 (KACPRZYK L., et al. 2013).

1.2.3.4.6. OUTROS BIOMARCADORES

Muitos estudos demonstraram a utilidade dos miRNAs como marcadores de diagnóstico para o CaP, devido a que atuam como reguladores oncogênicos, levando ao crescimento do tumor e silenciamento de genes supressores tumorais (SRIVASTAVA, et al., 2013). Bryant et al. (2012) estabeleceram que os miR-107 e miR-574-3p estavam presentes na urina de pacientes com CaP em concentrações significativamente maiores do que na urina dos controles. Rodríguez et al. (2017) acharam uma regulação negativa dos miR-196a-5p e miR-501-3p em exomas urinários de pacientes com CaP e sugeriram que estes poderiam servir como biomarcadores não invasivos para o diagnóstico de CaP. Korzeniewski et al. (2015) demonstraram que pacientes com CaP expressam níveis mais elevados do miR-483-5p do que pacientes controle. Srivastava et al. (2013) estabeleceram que o miR-205 e o miR-214 estão regulados negativamente na urina de pacientes com CaP, e que esses miRNAs podem discriminar pacientes com CaP de indivíduos saudáveis com 89% de sensibilidade e 80% de especificidade. Dybos et al. (2018) relataram que o miR-148-3p sérico é mais expresso em homens com CaP do que em controles saudáveis. Al-Kafaji et al. (2018) determinaram que os níveis de miR-15a, miR-126, miR-192 e miR-377 eram menores em amostras de sangue de pacientes com CaP do que em indivíduos com HPB ou de pacientes saudáveis.

Atualmente existem vários testes, disponíveis comercialmente, que permitem determinar o CaP em urina e sangue. Narayan (2019), revisou os testes *ExoDx Prostate Intelliscore*, *SelectMDx*, *Progaida PCA3*, *Mi-Prostate Score*, *4K Score* e *Prostate Health Index*. Porém, encontrou que os principais estudos de validação que sustentam estes testes, têm deficiência na transparência dos Padrões para Relatos de Precisão de Diagnóstico (STARD), além disso, deve-se considerar as limitações na metodologia para decidir se esses testes devem ser aplicados na prática clínica (Narayan, 2019).

Devido à heterogeneidade do CaP, os estudos ainda não conseguiram apontar para um marcador comprovadamente capaz de detectar o CaP de maneira rápida, eficiente e específica. Desta forma, vários marcadores estão ainda sendo estudados em busca daquele que apresente melhor especificidade e sensibilidade. Deste modo, o teste e descoberta de biomarcadores moleculares que possam melhorar o diagnóstico, estadiamento, seguimento e prognóstico da doença, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento tem se tornado um dos objetivos essenciais das pesquisas neste campo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Comparar a expressão de cinco marcadores de RNA, em pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna (HPB) e CaP localizado, afim de determinar seu potencial no diagnóstico diferencial desta doença.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um método de extração e quantificação do mRNA da urina de homens com CaP e HPB.
- Analisar a expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG na urina de homens com CaP e HPB.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade como critérios de validação da quantificação da expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG como marcadores para o diagnóstico diferencial do CaP.

3. METODOLOGIA

3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP com parecer de número 810.586. Participaram do estudo 126 homens encaminhados ao Ambulatório de Urologia da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) com indicação de biópsia prostática para investigação de CaP. Os pacientes foram registrados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram coletadas duas amostras de urina, de aproximadamente 50 ml, de cada paciente. A primeira amostra coletou-se logo após a massagem prostática realizada pelo médico antes da biópsia, e a segunda amostra foi coletada imediatamente depois da biópsia.

3.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras coletadas foram transportadas em gelo e centrifugadas a 1000 g por 15 minutos a 4°C. Se descartou o sobrenadante e se resuspendeu o pellet em 1mL de RNAlater® (Ambion, Inc.). Deixou-se a amostra na geladeira entre 2-8°C overnight, e finalmente foi armazenada a -20°C até a extração do RNA.

3.3. EXTRAÇÃO DO RNA

Prévia extração, a amostra foi lavada em PBS a fim de retirar o RNAlater® (Ambion, Inc.). Ao pellet adicionou-se 1 ml de Trizol® e homogeneizou-se com ajuda de uma seringa. A amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos, transcorrido o tempo adicionou-se 200 ul de clorofórmio. Após centrifugação a 21000 g por 15 minutos a 4°C, a fase aquosa (superior) foi transferida para um novo tubo onde adicionou-se 600uL de isopropanol 100% ice-cold e 1µL de glicogênio (20mg/mL) a fim de precipitar o RNA. Se incubou a amostra a temperatura ambiente por 10 minutos. Após centrifugação a 21.000 g por 20 minutos a 4°C, se descartou o sobrenadante e se realizaram duas lavagens com etanol 75% ice-cold

centrifugando a amostra a 21.000 g por 5 minutos a 4°C. O pellet seco foi eluído em 20 uL de água RNase free (Ambion, Inc.). Posteriormente, realizou-se a quantificação das amostras no NanoDrop® e se armazenou a -80°C.

3.4. SÍNTESE DO cDNA

As amostras de RNA foram tratadas com DNase a fim de eliminar os possíveis restos de DNA. A DNase utilizada foi a DNase I, Amplification Grade (Sigma-Aldrich) segundo o protocolo do fornecedor. Para a síntese do cDNA se utilizou 1U de SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen), buffer para RT-PCR 1X, 0,5 mM de dNTPs (Sigma-Aldrich), 2 ul de DTT e 0,5uM de Oligo(dT) (Invitrogen). A reação foi feita com volume final de 20 ul.

3.5. PCR TEMPO REAL (qPCR)

Determinou-se a expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, ERG, TDRD1 E GAPDH (controle endógeno) utilizando TaqMan Universal Master Mix e sondas (Applied Biosystems e Integrated DNA Technologies) (Tabela 3).

Tabela 2. Sondas utilizadas nos ensaios

Nome do Gene	Sigla	Assay ID	Fornecedor
Prostate cancer antigen 3	PCA3	Hs01371939_g1	Applied Biosystems
Fosfoproteína de Antígeno de Membrana do Complexo de Golgi	GOLPH2/GOLM1	Hs00213061_m1	Applied Biosystems
Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 1	SPINK1	Hs00162154_m1	Applied Biosystems
Tudor Domain Containing 1	TDRD1	Hs00229805_m1	Applied Biosystems
ETS-related gene	ERG	Hs01554629_m1	Applied Biosystems

Nome do Gene	Sigla	Assay ID	Fornecedor
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	Hs.PT.39a.22214836	Integrated DNA Technologies

Elaboração: Elius Paz

Cada reação foi composta por 1X de Master Mix TaqMan probe (Applied Biosystems), 1X de sonda específica para cada ensaio (Applied Biosystems ou Integrated DNA Technologies), 250 ng de cDNA e água até completar o volume final de 10 ul. O programa de termociclagem foi o mesmo para todos os genes: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 minutos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A avaliação da expressão foi feita em duplicata para todas as amostras e os cálculos foram baseados nos valores de Ct (cycle threshold). Os valores de Ct foram utilizados pra calcular os valores de Fold Change (FC).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares IBM SPSS v25 e MedCalc® v19.0.5. As variáveis paramétricas foram apresentadas como média e desvio padrão, enquanto as variáveis contínuas não paramétricas foram apresentadas como mediana e intervalo interquartil. Para avaliação de normalidade dos dados, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk.

A comparação entre grupos nas variáveis não paramétricas foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, enquanto que a comparação nas variáveis paramétricas foi realizada utilizando o teste de ANOVA seguido pelo teste *post hoc* LSD ou T-Student. Para realizar a comparação das frequências das variáveis categóricas, utilizou-se o teste de qui-quadrado de Pearson. A correlação entre as variáveis, foi verificada utilizando o teste de Spearman.

Para avaliar a sensibilidade e a especificidade das variáveis no diagnóstico do CaP, utilizou-se a curva de características de operação do receptor (curva ROC). Para todas as análises, foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Caracterização clínica dos grupos

Os pacientes (n=126) que participaram no estudo foram divididos em dois grupos: pacientes com CaP do tipo adenocarcinoma (n=46) e pacientes com HPB (n=80), estes últimos constituíram o grupo controle para testar a especificidade dos marcadores. O diagnóstico foi determinado baseado nos dados clínicos e no laudo histopatológico fornecido após a biópsia, constituindo um ensaio duplo-cego.

Utilizando os critérios D'Amico, os pacientes com CaP foram divididos em três grupos: pacientes com CaP localizado de alto risco (n=21) (estadio \geq T2c ou PSA >20 ng/mL ou escore de Gleason \geq 8), risco intermediário (n=15) (estadio T2b ou PSA entre 10 e 20 ng/mL ou escore de Gleason de 7) e baixo risco (n=10) (estadio T1c ou T2a e PSA \leq 10 ng/mL e escore de Gleason de 3+3). Os grupos apresentaram homogeneidade quanto à idade (p= 0,81).

Comparação da expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG

A quantificação da expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1 foi normalizada com controle endógeno (GAPDH) e comparada entre os diferentes grupos. A expressão dos genes TDRD1 e ERG, foi categorizada como presença (nível de expressão quantificável) ou ausência (nível de expressão não quantificável), e partir disso foi calculada a frequência com que estes marcadores foram detectados em cada um dos grupos estudados.

A análise estatística demonstrou que existe uma diferença significativa na expressão dos genes GOLPH2 e SPINK1 entre os pacientes com CaP e HPB (p=0,003; p=0,035), mas não existe uma diferença significativa na expressão do gene PCA3 (p=0,182). Demonstrou-se também que não existe uma diferença significativa na expressão dos genes TDRD1 e ERG entre os pacientes com CaP e HPB (p=0,628; p=0,052) (Tabela 3). A comparação da expressão dos genes PCA3, GOLPH2 e SPINK1 entre pacientes com HPB e CaP foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney. Para realizar a comparação das frequências com que os genes TDRD1 e ERG foram detectados em pacientes com HPB e CaP utilizou-se o teste de qui-quadrado de Pearson.

Tabela 3. Expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG em pacientes com CaP e HPB.

Gene	CaP	HPB	p
PCA3 ^a	0,4431 (4,33)	2,0367 (6,79)	0,182
GOLPH2 ^a	3,3224 (12,98)	1,0463 (2,59)	0,003*
SPINK1 ^a	2,1955 (8,90)	0,6373 (4,18)	0,035*
TDRD1 ^{b,c}	18 (36,7%)	14 (29,2%)	0,628
ERG ^{b,c}	27 (55,1%)	17 (35,4%)	0,052

a) Mediana e intervalo interquartilico, Mann-Whitney; b) n= Frequências, Qui-quadrado; c) Presença
 Elaboração: Elius Paz

Além disto, não houve uma diferença significativa na expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1 e TDRD1 entre os grupos de amostras coletada antes e depois da biopsia ($p=0,176$; $p=0,970$; $p=0,144$; $p=130$). No entanto, existiu uma diferença significativa entre as amostras coletada antes e depois da biopsia na expressão do gene ERG ($p=0,030$) (Tabela 4). A comparação da expressão dos genes PCA3, GOLPH2 e SPINK1 entre amostras pré-biópsia e pós-biópsia foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney. Para realizar a comparação das frequências com que os genes TDRD1 e ERG foram detectados em amostras pré-biópsia e pós-biópsia, utilizou-se o teste de qui-quadrado de Pearson.

Tabela 4. Expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG em amostras pré-biópsia e pós-biópsia.

Gene	Pré-biópsia	Pós-biópsia	p
PCA3 ^a	1,6560 (6,72)	0,4587 (4,74)	0,176
GOLPH2 ^a	1,6112 (6,45)	1,5285 (7,40)	0,970
SPINK1 ^a	0,7799 (5,09)	1,5972 (8,99)	0,144
TDRD1 ^{b,c}	12 (25,5%)	20 (40,0%)	0,130
ERG ^{b,c}	16 (34,0%)	28 (56,0%)	0,030*

a) Mediana e intervalo interquartilico, Mann-Whitney; b) n= Frequências, Qui-quadrado; c) Presença
 Elaboração: Elius Paz

A análise estatística também demonstrou que existe uma diferença significativa na expressão dos genes GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG entre os grupos de pacientes com CaP de

baixo, intermediário e alto risco ($p=0,005$; $p=0,043$; $p=0,013$; $p=0,002$). Porém, não existiu uma diferença significativa na expressão do gene PCA3 entre os mesmos grupos de pacientes ($p=0,395$) (Tabela 5). A comparação da expressão dos genes PCA3, GOLPH2 e SPINK1 entre pacientes com nenhum, baixo, intermediário e alto risco de CaP, foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Para realizar a comparação das frequências com que os genes TDRD1 e ERG foram detectados em pacientes com nenhum, baixo, intermediário e alto risco de CaP, utilizou-se o teste de qui-quadrado de Pearson.

Tabela 5. Expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG em pacientes com CaP de baixo, intermediário e alto risco.

Gene	Nenhum	Risco CaP			p
		Baixo	Intermediário	Alto	
PCA3 ^a	2,0367 (6,79)	0,9198 (10,89)	0,6343 (1,04)	0,3786 (4,59)	0,395
GOLPH2 ^a	1,0463 (2,59)	3,3723 (13,46)	1,2990 (4,47)	7,9427 (25,64)	0,005*
SPINK1 ^a	0,6373 (4,18)	5,6431 (13,61)	1,1201 (6,74)	1,4131 (9,16)	0,043*
TDRD1 ^{b,c}	14 (29,2%)	1 (6,7%)	4 (36,4%)	13 (56,5%)	0,013*
ERG ^{b,c}	17 (35,4%)	3 (20%)	9 (81,8%)	15 (65,2%)	0,002*

a) Mediana e intervalo interquartilico, Kruskal-Wallis; b) n= Frequências, Qui-quadrado; c) Presença

Elaboração: Elius Paz

As figuras 7 a 9 permitem analisar a dispersão dos dados. Devido à grande variabilidade dos mesmos, todas as análises foram realizadas novamente excluindo os *outliers*, porém, não houve nenhuma modificação na significância dos resultados já obtidos. Consequentemente, optou-se por manter todos os dados.

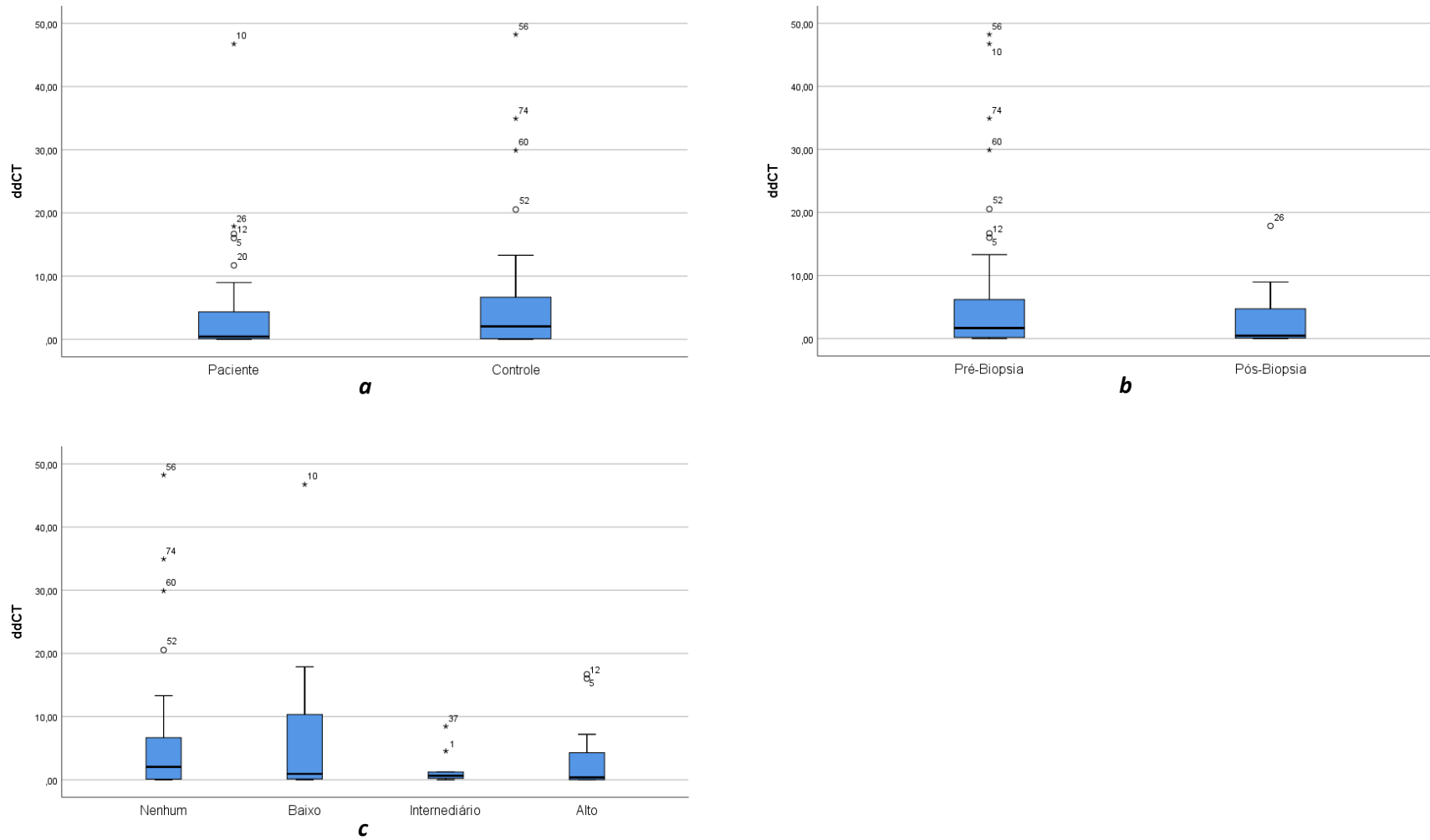


Figura 7. Expressão do gene PCA3. **a)** pacientes com CaP e HPB; **b)** amostras pré-biopsia e pós-biopsia; **c)** pacientes com CaP de baixo, intermediário e alto risco.

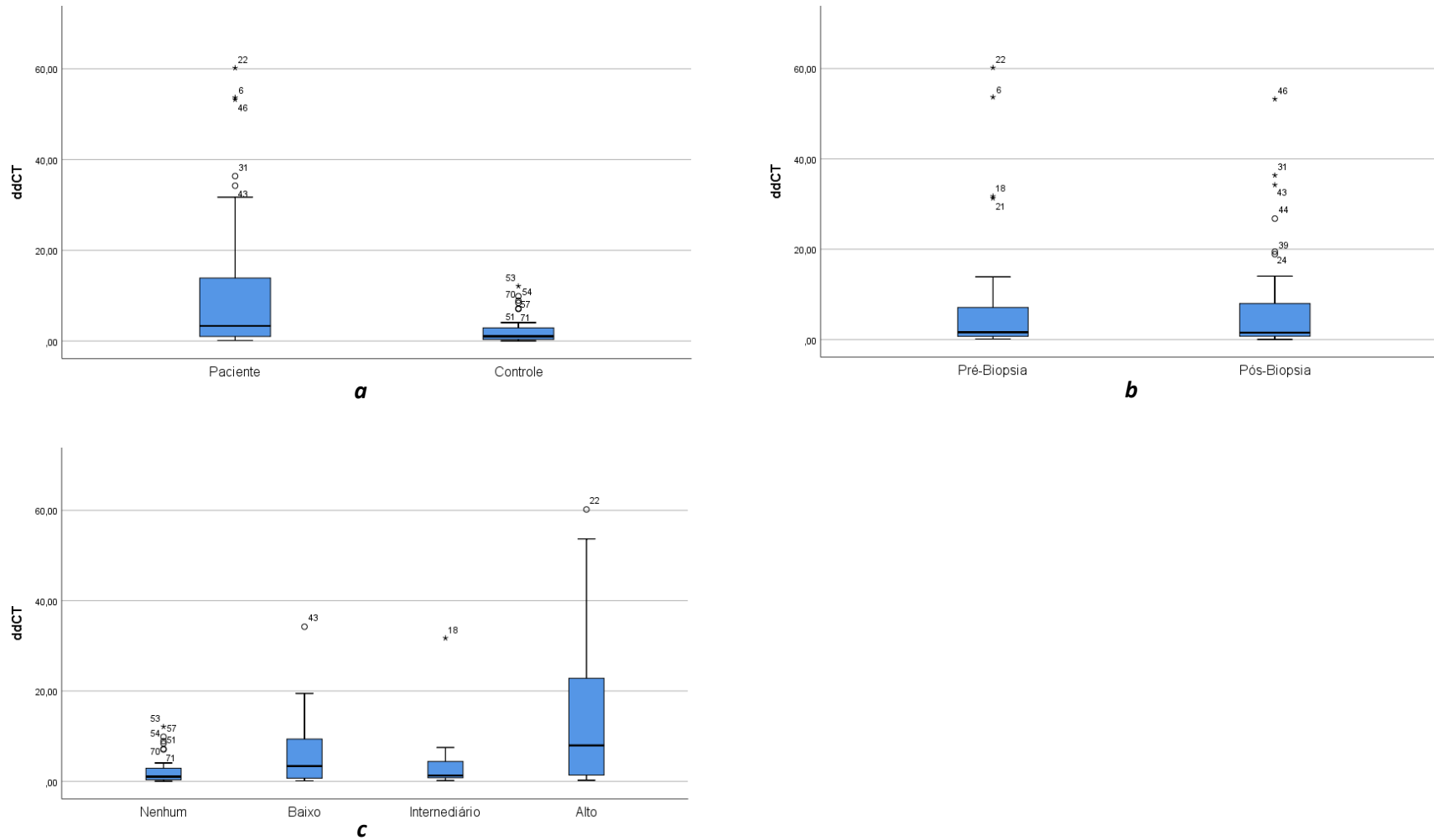


Figura 8. Expressão do gene GOLPH2. **a)** pacientes com CaP e HPB; **b)** amostras pré-biopsia e pós-biopsia; **c)** pacientes com CaP de baixo, intermediário e alto risco.

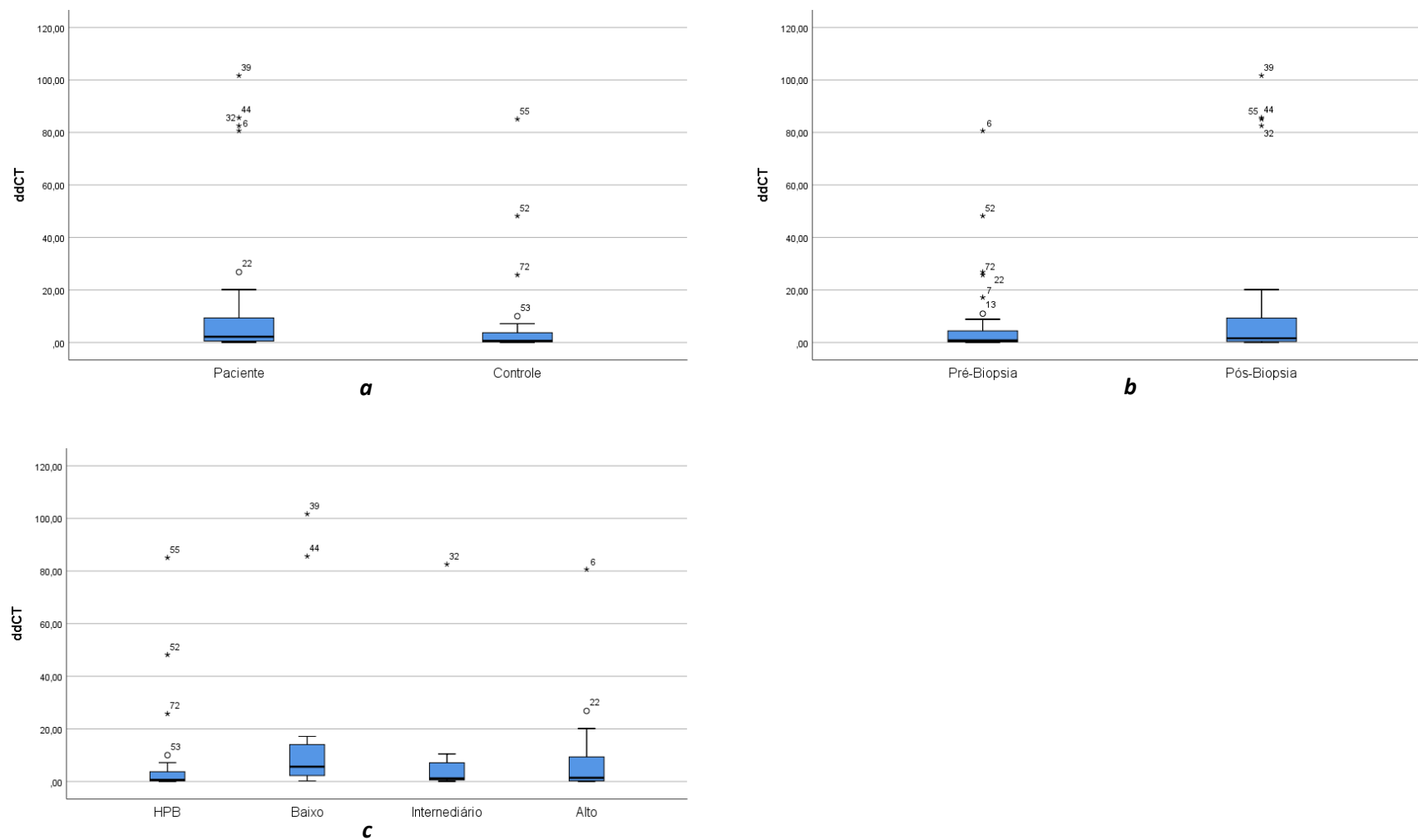


Figura 9. Expressão do gene SPINK1. **a)** pacientes com CaP e HPB; **b)** amostras pré-biopsia e pós-biopsia; **c)** pacientes com CaP de baixo, intermediário e alto risco.

Validade dos marcadores como testes de diagnóstico

A avaliação de sensibilidade e especificidade do nível de expressão dos genes PCA3, GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG como exames para o diagnóstico diferencial entre CaP e HPB foi realizada por meio da curva ROC (Figura 10).

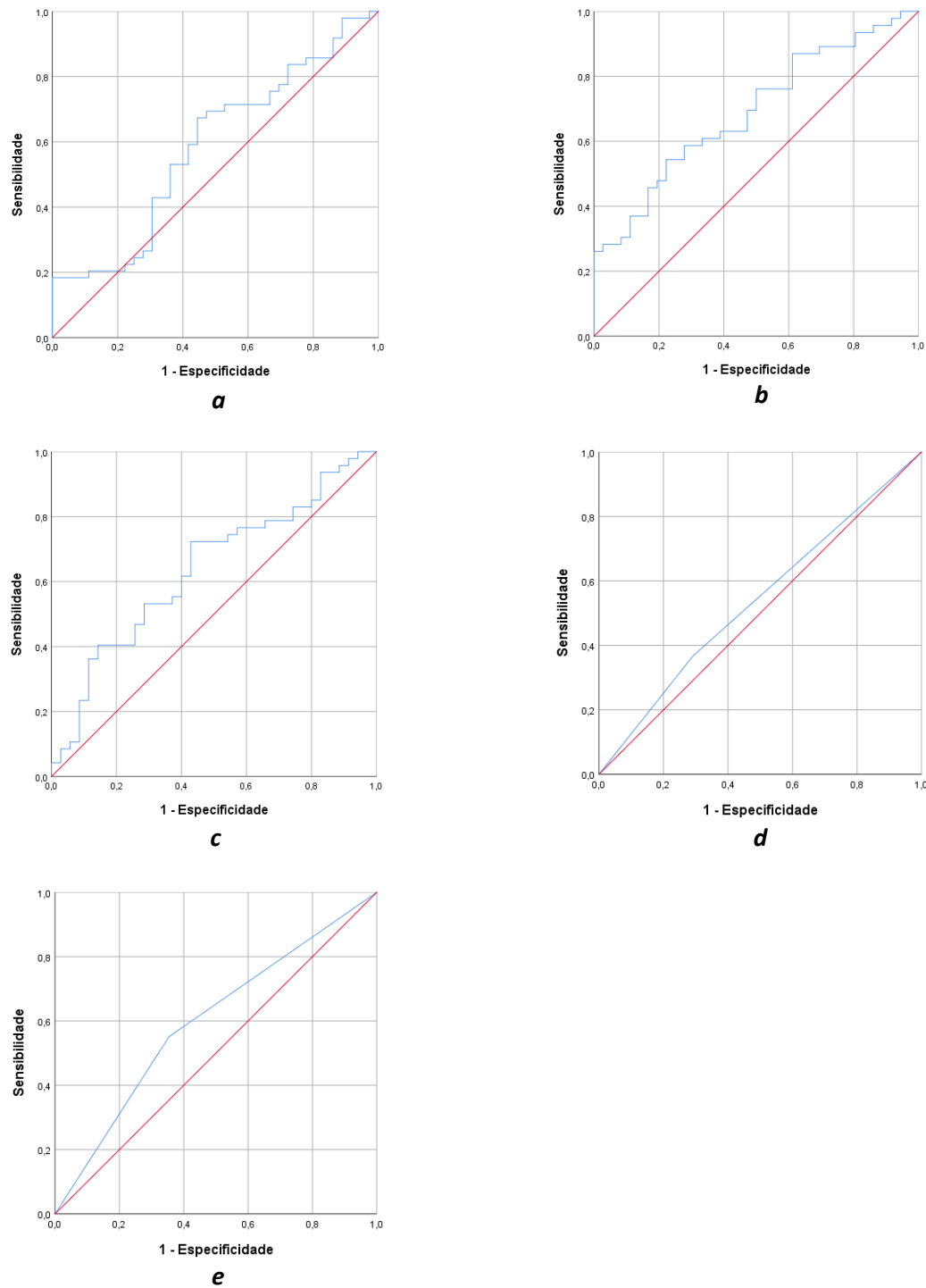


Figura 10. Curva ROC para a expressão dos genes *a) PCA3, b) GOLPH2, c) SPINK1, d) TDRD1 e e) ERG.*

Os valores de sensibilidade e especificidade, assim como os parâmetros das curvas ROC podem ser verificados na Tabela 6. O nível de expressão dos genes *PCA3*, *TDRD1* e *ERG* é considerado ruim para diferenciar pacientes com CaP e HPB, enquanto que, o nível de expressão dos genes *GOLPH2* e *SPINK1* é considerado pobre para diferenciar pacientes com CaP e HPB.

Tabela 6. Parâmetros da curva ROC para a expressão dos genes *PCA3*, *GOLPH2*, *SPINK1*, *TDRD1* e *ERG*.

Gene	ASC	IC ^a	p	Sensibilidade ^b	Especificidade ^b
PCA3	0,586	0,461 - 0,710	0,182	67,35	55,56
GOLPH2	0,692	0,578 - 0,806	0,003*	54,35	77,14
SPINK1	0,637	0,515 - 0,759	0,035*	72,34	57,14
TDRD1	0,538	0,444 - 0,632	0,628	36,73	70,83
ERG	0,598	0,500 - 0,697	0,052	55,10	64,58

a) Intervalo de confiança a 95%; b) Youden index em MedCalc® v19.0.5.

Elaboração: Elius Paz

Correlação na expressão dos genes GOLPH2, SPINK1, TDRD1 e ERG

Finalmente, foram determinados os coeficientes de correlação para as variáveis estudadas no grupo CaP, excluindo-se o gene PCA3 que não demonstrou potencial de diagnóstico entre CaP e HPB (Tabela 11).

Tabela 7. Coeficientes de correlação para as variáveis do grupo CaP.

Gene	GOLPH2	SPINK1	TDRD1	ERG
GOLPH2	1	r = 0,502* p = 0,000	r = 0,183 p = 0,212	r = 0,126 p = 0,394
SPINK1		1	r = -0,168 p = 0,250	r = -0,226 p = 0,118
TDRD1			1	r = 0,603* p = 0,000
ERG				1

* Correlação significativa no nível 0,01.

Elaboração: Elius Paz

Observou-se correlação positiva na expressão dos genes GOLPH2 e SPINK1 ($r = 0,502$) e na expressão dos genes TDRD1 e ERG ($r = 0,603$). Para os outros coeficientes não foram observadas correlações significativas ($p > 0,01$).

5. DISCUSSÃO

Expressão do gene PCA3

Em 1999, Bussemakers, et al., compararam tecido prostático com CaP, tecido prostático não neoplásico, tecido neoplásico não prostático, e 18 tecidos humanos normais diferentes; e determinaram que o cDNA DD3^{PCA3} estava sobre expresso unicamente nos fragmentos prostáticos com CaP. Essa descoberta inicial estimulou novas pesquisas sobre o DD3 no carcinoma da próstata e em 2003, Hessels, et al. (2003) avaliaram a expressão do PCA3, em sedimentos de urina obtidos após a massagem prostática, em 108 homens encaminhados para biópsia prostática, devido a um PSA maior que 3 ng/ml. Do total de pacientes, 24 foram diagnosticados com CaP e o PCA3 foi positivo em 16 deles, dando ao teste uma sensibilidade de 67%.

Utilizar urina no rastreio do CaP tem uma grande vantagem para o paciente, em virtude de que é um método não invasivo; mas em contrapartida, a prática da técnica demanda uma rápida manipulação da amostra e cuidados especiais da mesma a fim de evitar a degradação do RNA. Além disso, a urina é uma amostra que possui contaminantes que inibem a PCR, o que pode interferir no procedimento e dificultar a padronização da técnica (TOYE, WOODS, BOBROWSKA, & RAMOTAR, 1998).

Múltiplos estudos tem estabelecido diferenças significativas nos valores de expressão do gene PCA3 em amostras de urina entre pacientes com HPB e CaP (LI, ZHOU, ZHANG, GAO, & ZHOU, 2018; WANG, et al., 2017; SARDAREH, et al., 2014; MA, DIEP, FRITSCH, SHORE, & ALBITAR, 2014). Porém, o presente estudo, determinou que não existe uma diferença significativa na expressão do gene PCA3 entre os pacientes com CaP e HPB ($p=0,182$). Além disso, a expressão do PCA3 foi maior em pacientes com HPB do que em pacientes com CaP [2,0367 (6,79) e 0,4431 (4,33) respectivamente].

Li, et al., (2018) determinaram que o nível de mRNA na urina dos pacientes com CaP e HPB foi de $60,2 \pm 32,2$ e $17,1 \pm 12,9$ respectivamente. Wang, et al. (2017) estabeleceram um escore de PCA3 para seu estudo, segundo o qual, a expressão do PCA3 na urina de pacientes

com CaP foi 119,5, enquanto que em pacientes com HPB foi de 60,1. Sardareh, et al. (2014) demonstraram que pacientes com PCa tem um aumento na taxa de expressão do gene PCA3 de 7,17 vezes, em comparação com pacientes com HPB. Já Ma, et al. (2014) e Fonseca-Coelho, et al. (2015) não acharam diferenças significativas nos níveis de expressão do PCA3 entre pacientes com CaP.

O controle endógeno utilizado para normalizar a expressão do PCA3 nos estudos previamente mencionados foi diferente em cada um deles. Li, et al., (2018) utilizaram a beta-actina (ACTB); Wang, et al. (2017) usaram o antígeno prostático específico (PSA); Sardareh, et al. (2014) empregaram o RNA ribossomal 18s; Ma, et al. (2014) utilizaram a beta-2-microglobulina (B2M); e Fonseca-Coelho, et al. utilizou a ACTB. Sendo assim, é possível afirmar que os métodos usados para quantificação e normalização nesses estudos não foram homogeneizados. Além disso, alguns estudos utilizaram sedimento urinário, outros sobrenadante ou urina livre de células, e algumas amostras foram obtidas após a massagem prostática e outras não. Durante nosso estudo, utilizamos a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) como controle endógeno para a normalização da expressão de todos os genes estudados, o que pode acarretar resultados diferentes.

Além de tudo, e levando em consideração que a classificação entre CaP e HPB foi realizada com base no resultado da biópsia prostática, não podemos descartar limitações nesta técnica, e a probabilidade de que pacientes com HPB apresentem um câncer inicial não detectável, já que a sensibilidade da biópsia depende do número de fragmentos analisados no exame anatomopatológico. Haas, et al. (2007) compararam a sensibilidade das biópsias para diagnóstico de CaP em próstatas removidas em autopsias; analisaram 6, 12 e 18 fragmentos, e definiram que a sensibilidade foi de 30%, 53% e 53%, respectivamente. O que sugere que o procedimento tem limitações e que o aumento do número de fragmentos além de 12 não aumenta a sensibilidade do teste.

Expressão dos genes GOLPH2 e SPINK1

O aparelho de Golgi é uma estrutura celular envolvida na modificação e classificação de macromoléculas para secreção e transporte a outros destinos celulares. Alterações

moleculares associadas ao aparelho de Golgi podem ocorrer durante a carcinogênese da próstata. Assim, Wei, et al. (2008) e Kristiansen, et al., (2008), demonstraram que GOLPH2 (uma fosfoproteína da membrana do aparelho de Golgi) está super expresso no aparelho de Golgi de células com CaP; Os dois grupos validaram os níveis de expressão do GOLPH2 em CaP através de qPCR, western blot e análises de microarrays de tecido. Por outro lado, o gene SPINK1 (Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 1) codifica para um peptídeo de 56 aminoácidos que é secretado na glândula prostática, e cuja função é inibir proteases de serina como a tripsina. Laxman, et al. (2008) estabeleceram que a expressão do SPINK1 na urina de pacientes com CaP é maior do que em pacientes com HPB.

O presente estudo, também demonstrou que existe uma diferença significativa na expressão dos genes GOLPH2 e SPINK1 entre os pacientes com CaP e HPB ($p=0,003$; $p=0,035$). A expressão, tanto do GOLPH2, quanto do SPINK1, foi maior em pacientes com CaP, do que em pacientes com HPB.

Expressão do gene TDRD1

O Tudor domain-containing protein 1 (TDRD1) não é transcrito no epitélio normal da próstata. O gene TDRD1 foi identificado como um gene que é expresso no testículo e no câncer, mas silenciado em tecidos somáticos adultos (WANG, MCCARREY, YANG, & PAGE, 2001; LORIOT, BOON, & DE SMET, 2003). Leyten, et al. (2015) estabeleceram que o gene TDRD1 pode discriminar o CaP da HPB em sedimentos urinários. Porém, o presente estudo, determinou que não existe uma diferença significativa na expressão do gene TDRD1 entre os pacientes com CaP e HPB ($p=0,628$).

Provavelmente, esta significância estatística não foi demonstrada em nosso trabalho pelo fato de que estas variáveis foram categorizadas como presença (nível de expressão quantificável) ou ausência (nível de expressão não quantificável). Além disso, o controle endógeno utilizado para normalizar a expressão do TDRD1 foi HPRT1.

Expressão do gene ERG

Tomlins, et al. (2005) determinaram que o ERG é super expresso em uma alta proporção de carcinomas de próstata como resultado de uma fusão gênica com o promotor do gene TMPRSS2. O Epitélio de próstata normalmente não expressa ERG. (WANG, MCCARREY, YANG, & PAGE, 2001), porém, ERG é um dos oncogenes mais consistentemente super expressos no câncer de próstata maligno sendo chave na transição de uma neoplasia intraepitelial da próstata para CaP. No câncer de próstata, a alta expressão do ERG está relacionada com um estágio avançado do tumor, uma alta classificação de Gleason, metástase e menor tempo de sobrevida. A super expressão de ERG é um dos fatores-chave na transformação do câncer localizado e agressivo em câncer metastático.

Laxman, et al. (2008) não determinaram uma diferença significativa na expressão do ERG na urina de pacientes com CaP e com HPB. Nosso estudo, determinou que também não existe uma diferença significativa na expressão do gene ERG entre os pacientes com CaP e HPB ($p=0,052$). Porém, embora não tenha se achado uma diferença significativa, os pacientes com CaP apresentaram uma maior expressão do gene ERG e o valor p está bem perto do nível de significância estatística (0,05).

Validade dos marcadores como testes de diagnóstico

Segundo Motta & Filho (2009), valores da área sob a curva (ASC) entre 0,50-0,60 são considerados testes ruins para diagnóstico da doença, enquanto que valores entre 0,60-0,70 são considerados pobres. Conseqüentemente, utilizando os valores das ASC apresentados na Tabela 6, determinou-se que a análise expressão relativa dos genes GOLPH2 e SPINK1 é pobre para diferenciar pacientes com CaP e HPB (0,692; 0,637), porém, é um melhor método do que a análise da expressão relativa dos genes PCA3, TDRD1 e ERG (0,586; 0,538; 0,598), que é considerada ruim.

O ponto de corte da curva ROC se estabeleceu maximizando a soma da sensibilidade e especificidade, que consiste em determinar o ponto ótimo, a partir da soma da sensibilidade e especificidade para cada ponto da curva ROC. Quanto maior o valor desta soma, maior será

a proximidade ao ponto (0,1). Este método corresponde a procurar o valor que maximiza o índice de Youden (FLUSS & FARAGGI, 2005).

Chevli, et al. (2014) analisaram a expressão do gene PCA3 em 3037 encaminhados para biópsia prostática e determinaram que a ASC ROC para este teste foi de 0,697. Hessels, et al. (2003) analisaram 108 amostras de urina pós massagem prostática de pacientes com PSA sérico maior que 3 ng/ml e que foram encaminhados para biópsia prostática, assim, estabeleceram que a ASC ROC para este ensaio foi de 0,717. Marks, et al. (2007) analisaram 233 amostras de urina de pacientes com níveis de PSA sérico maior ou igual a 2,5 ng/ml e no mínimo uma biópsia negativa prévia, determinando uma ASC ROC de 0,678. Tinzl, et al. (2004), estudaram 201 pacientes encaminhados para detecção do CaP e determinaram uma ASC ROC de 0,87. No presente estudo se determinou uma ASC ROC de 0,586, valor muito baixo comparado com a literatura.

As prováveis causas pra que os resultados sejam discordantes são que o controle endógeno utilizado para normalizar a expressão do PCA3 nos estudos previamente mencionados foi diferente em cada um deles, além disso todos os métodos usados para quantificação e normalização nesses estudos não foram homogeneizados, motivo pelo qual todos os pontos de corte das curvas ROC foram distintos. O valor de ponto de corte para a curva ROC sugerido pelo estudo de Hessels, et al. (2003) foi de 0,200, enquanto Tinzl, et al. (2004) estimaram um ponto de corte de 0,500. O nosso trabalho estimou um ponto de corte para a curva ROC de 1,66, o que outorga ao teste uma sensibilidade de 67,35% e uma especificidade de 55,56%, valores considerados ruins pra a detecção do CaP.

Laxman, et al. (2008) analisaram a expressão dos genes GOLPH2 e SPINK1 na urina pós massagem prostática de 276 pacientes encaminhados para biópsia prostática ou prostatectômica radical; o estudo determinou ASC ROC de 0,664 e 0,642 para os genes GOLPH e SPINK respectivamente. O presente estudo, determinou valores de ASC ROC para os genes GOLPH2 e SPINK1 de 0,692 e 0,637, os quais, similarmente ao achado por Laxman, et al. (2008), são valores pobres para diferenciar pacientes com CaP e HPB.

Por outro lado, o gene GOLPH2 demonstrou ser mais específico do que o gene SPINK1 no diagnóstico do CaP (77,14% e 57,14% respectivamente), porém o gene SPINK1 é mais sensível do que o gene GOLPH2 no diagnóstico da mesma doença (72,34% e 54,35%). Sugere-

se a combinação destes dois marcadores com o objetivo de criar um teste que seja altamente sensível e específico.

Os marcadores TDRD1 e ERG demonstraram ter uma baixa sensibilidade (36,73% e 55,1%), mas uma alta especificidade (70,83% e 64,58%) no diagnóstico do CaP, o que é desejável para um teste diagnóstico, já que elimina a chance de um resultado falso positivo, evitando assim a repetição de biópsias. Porém os valores de ASC ROC (0,538; 0,598) são considerados ruins para diagnóstico.

Correlações dos marcadores

Com o propósito de identificar possíveis correlações entre as variáveis estudadas, foi executado o Teste de Spearman. Observou-se que ocorre uma correlação positiva entre os genes *GOLPH2* e *SPINK1*, ou seja, a expressão de *GOLPH2* aumenta com a expressão de *SPINK1*. Este resultado, faz sugerir novamente a combinação destes dois marcadores com o objetivo de criar um teste que seja altamente sensível e específico, pois os dois genes são sobre expressos na urina dos pacientes com CaP, porem um deles e mais especifico e o outro mais sensível.

Adicionalmente, achou-se uma correlação positiva entre os genes TDRD1 e ERG. Isto se explica, já que o gene TDRD1 é expresso em CaP que possuem o rearranjo *TMPRSS2:ERG* (KACPRZYK, et al., 2013).

Até agora, tem existido muitos esforços para prever CaP em estágio inicial, como marcadores associados a PSA, vários marcadores moleculares, marcadores de miRNA e marcadores de proteína. Infelizmente, os estudos de validação e acompanhamento tem falhas devido a várias razões. Portanto, futuros estudos de biomarcadores de CaP precisam se concentrar em combinações de biomarcadores moleculares e variáveis clínicas, em vez de apenas biomarcadores (KIM, YUN, & KIM, 2019).

6. CONCLUSÕES

Os testes quantitativos de expressão relativa dos genes GOLPH2 e SPINK1 sinalizam ser biomarcadores úteis na diferenciação de paciente com CaP e HBP;

O teste quantitativo de expressão relativa do gene PCA3, bem como os testes qualitativos de expressão dos genes TDRD1 e ERG, não foram capazes de diferenciar indivíduos com CaP ou HBP;

A combinação dos marcadores GOLPH2 e SPINK1 poderia ajudar na diferenciação de paciente com CaP e HBP devido a que o gene GOLPH2 demonstrou ser mais específico do que o gene SPINK1 no diagnóstico do CaP (77,14% e 57,14% respectivamente), porém o gene SPINK1 é mais sensível do que o gene GOLPH2 (72,34% e 54,35%).

7. REFERENCIAS

- AL-KAJAJI, G., SAID, H., ALAM, M., & AL-NAIEB, Z. (2018). Blood-based microRNAs as diagnostic biomarkers to discriminate localized prostate cancer from benign prostatic hyperplasia and allow cancer-risk stratification. *Oncol Lett*, *16*(1), 1357-1365.
- ALSHAHRANI, S., MCGILL, J., & AGARWAL, A. (2013). Prostatitis and male infertility. *Journal of reproductive immunology*, *100*(1), 30-36.
- BENSON, M., WHANG, I., PANTUK, A., RING, K., S.A, K., OLSSON, C., & W.H, C. (1992). Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol*, *147*(3 Pt 2), 815-816.
- BRATT, O. (2002). Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol*, *168*(3), 906-913.
- BRYANT, R., PAWLOWSKI, T., CATTO, J., MARSDEN, G., VESSELLA, R., RHEES, B., . . . HAMDY, F. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer*, *106*(4), 768-74.
- BUSSEMAKERS, M., VAN- BOKHOVEN, A., VERHAEGH, G., SMIT, F., KARTHAUS, H., SCHALKEN, J., . . . ISAACS, W. (1999). DD3::A New Prostate-specific Gene, Highly Overexpressed in Prostate Cancer. *Cancer Research*, *59*, 5975–5979.
- CARTER, B., BEATY, T., STEINBERG, G., CHILDS, B., & WALSH, P. (1992). Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, *89*(8), 3367-3371.
- CHAGAS, M., BABINSKI, M., COSTA, W., & SAMPAIO, F. (2002). Stromal and acinar components of the transition zone in normal and hyperplastic human prostate. *BJU International*, *89*, 699–702.
- CHAN, J., GANN, P., & GIOVANNUCCI, E. (2005). Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol*, *23*(32), 8152-8160.
- CHEVLI, K., DUFF, M., WALTER, P., YU, C., CAPUDER, B., ELSHAFEI, A., . . . JONES, J. (2014). Urinary PCA3 as a predictor of prostate cancer in a cohort of 3,073 men undergoing initial prostate biopsy. *J Urol*, *191*(6), 1743-1748.
- COUSSENS, L., & WERB, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, *420*(6917), 860-867.
- DYBOS, S., FLATBERG, A., HALGUNSET, J., VISET, T., ROLFSENG, T., KVAM, S., & SKOGSETH, H. (2018). Increased levels of serum miR-148a-3p are associated with prostate cancer. *APMIS*, *126*(9), 722-731.

- EDWARDS, J. (2008). Diagnosis and management of benign prostatic hyperplasia. *Am Fam Physician*, 77(10), 1403-1410.
- FERLAY, J., ERVIK, M., LAM, F., COLOMBET, M., MERY, L., PIÑEROS, M., . . . BRAY, F. (3 de Junho de 2018). *Global Cancer Observatory*. (I. A. Cancer, Editor) Fonte: Cancer Today: <https://gco.iarc.fr/today>
- FLUSS, B., & FARAGGI, D. (2005). Estimation of the Youden Index and its associated cutoff poin. *Biom J*, 458–472.
- FONSECA-COELHO, F., LOLI-GUIMARÃES, F., RIBEIRO-CABRAL, W., OLIVEIRA-SALLES, P., CUEVA- MATEO, E., MENDES-NOGUEIRA E NOGUEIRA, L., . . . BRAGA-GOMES, K. (2015). Expression of PCA3 and PSA genes as a biomarker for differential diagnosis of nodular hyperplasia and prostate cancer. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 13519-13531.
- GOMES, R., FIGUEIREDO DE SOUSA REBELLO, L., CARVALHO DE ARAÚJO, F., & FERREIRA DO NASCIMENTO, E. (2008). A prevenção do câncer de próstata: uma revisão da literatura. *Ciência & Saúde Coletiva*, 13(1), 235-246.
- HAAS, G., & SAKR, W. (1997). Epidemiology of prostate cancer. *CA Cancer J Clin.*, 47(5), 273-287.
- HAAS, G., DELONGCHAMPS, N., JONES, R., CHANDAN, V., SERIO, A., VICKERS, A., . . . DE LA ROZA, G. (2007). Needle Biopsies on Autopsy Prostates: Sensitivity of Cancer Detection Based on True Prevalence. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), 1484–1489.
- HESSELS, D., KLEIN-GUNNEWIEK, J., VAN-OORT, I., KARTHAUS, H., VAN-LEENDERS, G., VAN-BALKEN, B., . . . SCHALKEN, J. (2003). DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*, 44(1), 8-16.
- HOFFMAN, R., GILLILAND, F., ELEY, J., HARLAN, L., STEPHENSON, R., STANFORD, J., . . . POTOSKY, A. (2001). Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. *J Natl Cancer Inst*, 93(5), 388-395.
- Hospital Israelita Albert Einstein. (06 de 06 de 2019). *Hospital Israelita Albert Einstein*. Fonte: Site de Guia de Doenças e Sintomas: <https://www.einstein.br/guia-doencas-sintomas/prostatite>

- HUANG, W., HAYES, R., PFEIFFER, R., VISCIDI, R., LEE, F., WANG, Y., . . . RABKIN, C. (2008). Sexually transmissible infections and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17(9), 2374-2381.
- Instituto Nacional de Câncer. (06 de 06 de 2019). *Instituto Nacional de Câncer*. Fonte: Site do Câncer de próstata do Instituto Nacional de Câncer: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>
- JEMAL, A., SIEGEL, R., XU, J., & WARD, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 60(5), 277-300.
- KACPRZYK, L., LAIBLE, M., ANDRASIUK, T., BRASE, J., BÖRNO, B., FÄLTH, M., . . . SÜLTMANN, H. (2013). ERG Induces Epigenetic Activation of Tudor Domain-Containing Protein 1 (TDRD1) in ERG Rearrangement-Positive Prostate Cancer. *PLoS One*, 8(3), e59976.
- KIM, W., YUN, S., & KIM, W. (2019). For Physicians Managing Voiding Dysfunction, Improving the Detection Rate of Early Prostate Cancer and Discrimination From Benign Prostatic Hyperplasia, in a Molecular Biomarker Aspects. *Int Neurourol J*, 23(1), 5–12.
- KOLONEL, L. (2001). Fat, meat and prostate cancer. *Epidemiol Rev*, 23, 72-81.
- KORZENIEWSKI, N., TOSEV, G., PAHERNIK, S., HADASCHIK, B., HOHENFELLNER, M., & DUENSING, S. (2015). Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer. *Urol Oncol*, 33(1), 17-22.
- KRISTIANSEN, G., FRITZSCHE, F., WASSERMANN, K., JÄGER, C., TÖLLE, A., LEIN, M., . . . MOCH, H. (2008). GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. *Br J Cancer*, 99(6), 939–948.
- LAXMAN, B., MORRIS, D., YU, J., SIDDIQUI, J., CAO, J., MEHRA, R., . . . CHINNAIYAN, A. (2008). A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res*, 68(3), 645-649.
- LEYTEN, G., HESSELS, D., SMIT, F., JANNINK, S., DE JONG, H., MELCHERS, W., . . . SCHALKEN, J. (2015). Identification of a Candidate Gene Panel for the Early Diagnosis of Prostate Cancer. *Clin Cancer Res*, 21(13), 3061-3070.
- LI, M., ZHOU, D., ZHANG, W., GAO, S., & ZHOU, X. (2018). Urine PCA3 mRNA level in diagnostic of prostate cancer. *J Can Res Ther*, 14, 864-866.
- LILJA, H., CHRISTENSSON, A., DAHLEN, U., MATIKAINEN, M., NILSSON, O., PETTERSSON, K., & LOVGREN, T. (1991). Prostate-specific antigen in serum occurs predominantly in complex with alpha 1-antichymotrypsin. *Clinical Chemistry*, 1618-1625.

- LORIOT, A., BOON, T., & DE SMET, C. (2003). Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogonia. *Int J Cancer*, 105(3), 371-376.
- LOU, Y., QIAO, S., TALONPOIKA, R., SYVÄLÄ, H., & TUOHIMAA, P. (2004). The role of Vitamin D3 metabolism in prostate cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 92(4), 317-325.
- LOWSEY, O. (1912). The development of the human prostate gland with reference to the development of other structures at the neck of the urinary bladder.
- MA, W., DIEP, K., FRITSCH, H., SHORE, N., & ALBITAR, M. (2014). Diagnostic and Prognostic Scoring System for Prostate Cancer Using Urine and Plasma Biomarkers. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 18(3), 156–163.
- MCNEAL, J. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2(1), 35-49.
- MCNEAL, J., REDWINE, E., FREIHA, F., & STAMEY, T. (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol*, 12(12), 897-906.
- MCVARY, K. (2010). American Urological Association Guideline: Management of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). *American Urological Association Education and Research*.
- MOORE, K., DALY, A., & Agur, A. (2010). *Clinically Oriented Anatomy* (6^a ed.). Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins.
- Narayan, V. (2019). A critical appraisal of biomarkers in prostate cancer. *World Journal of Urology*, 1-8. doi:10.1007/s00345-019-02759-x
- Oregon Health & Science University. (06 de 06 de 2019). *Oregon Health & Science: Universit Knight cancer institute*. Fonte: Site da Knight cancer institute: <https://www.ohsu.edu/knight-cancer-institute/testicular-cancer>
- PLATZ, E., A, KAWACHI, I., RIMM, E., WILLETT, W., & GIOVANNUCCI, E. (2000). Race, ethnicity and benign prostatic hyperplasia in the health professionals follow-up study. *J Urol*, 163(2), 490-495.
- REEVES, F., EVERAERTS, W., MURPHY, D., & COSTELLO, A. (2016). The Surgical Anatomy of the Prostate. Em J. MYDLO, & C. Godec, *Prostate Cancer* (2^a ed., pp. 253-263). Academic Press.

- RODRÍGUEZ, M., BAJO-SANTOS, C., HESSVIK, N., LORENZ, S., FROMM, B., BERGE, V., . . . LLORENTE, A. (2017). Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. *Mol Cancer*, *16*(1), 156.
- RYBICKI, B., KRYVENKO, O., WANG, Y., JANKOWSKI, M., TRUDEAU, S., CHITALE, D., . . . TANG, D. (2016). Racial differences in the relationship between clinical prostatitis, presence of inflammation in benign prostate and subsequent risk of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Diseases*, *19*(2), 145-150.
- SARDAREH, H., GOODARZI, M., YADEGAR-AZARI, R., POOROLAJAL, J., MOUSAVI-BAHAR, S., & SAIDIJAM, M. (2014). Prostate Cancer Antigen 3 Gene Expression in Peripheral Blood and Urine Sediments from Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia Patients versus Healthy Individuals. *Urological Oncology*, *11*(6), 1952-1958.
- SCHILLER, D., & PARIKH, A. (2011). Identification, pharmacologic considerations, and management of prostatitis. *Am J Geriatr Pharmacother*, *9*(1), 37-48.
- SRIVASTAVA, A., GOLDBERGER, H., DIMTCHEV, A., RAMALINGA, M., CHIJIJOKE, J., MARIAN, C., . . . KUMAR, D. (2013). MicroRNA profiling in prostate cancer--the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. *PLoS One*, *8*(10). doi: 10.1371/journal.pone.0076994
- SROUGI, M., PIOVESAN, A., COLOMBO, J., & NESRALLAH, A. (2013). Doenças da próstata. *Revista de Medicina*, *87*, 166-177.
- STEINBERG, G., CARTER, B., BEATY, T., CHILDS, B., & WALSH, P. (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*, *17*(4), 337-347.
- SUTCLIFFE, S., GIOVANNUCCI, E., DE MARZO, A., LEITZMANN, M., WILLETT, W., & PLATZ, E. (2006). Gonorrhoea, syphilis, clinical prostatitis, and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *15*(11), 2160-2166.
- TOMLINS, S., RHODES, D., PERNER, S., DHANASEKARAN, S., MEHRA, R., SUN, X., . . . CHINNAIYAN, A. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, *310*(5748), 644-648.
- TOYE, B., WOODS, W., BOBROWSKA, M., & RAMOTAR, K. (1998). Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for Chlamydia trachomatis testing. *J Clin Microbiol*, *36*(8), 2356-2358.

- VERMASSEN, T., VAN-PRAET, C., POELAERT, F., LUMEN, N., DECAESTECKER, K., HOEBEKE, P., . . . DELANGHE, J. (2015). Diagnostic accuracy of urinary prostate protein glycosylation profiling in prostatitis diagnosis. *Biochem Med (Zagreb)*, *25*(3), 439–449.
- WANG, F., CHEN, R., REN, S., SHI, X., ZHU, Y., ZHANG, W., . . . SUN, Y. (2017). Prostate cancer antigen 3 moderately improves diagnostic accuracy in Chinese patients undergoing first prostate biopsy. *Asian J Androl*, *19*, 238-243.
- WANG, P., MCCARREY, J., YANG, F., & PAGE, D. (2001). An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet*, *27*(4), 422-426.
- WEI, S., DUNN, T., ISAACS, W., DE MARZO, A., & LUO, J. (2008). GOLPH2 and MYO6: Putative Prostate Cancer Markers Localized to the Golgi Apparatus. *The Prostate*, *68*, 1387-1395.
- YATANI, R., CHIGUSA, I., AKAZAKI, K., STEMMERMANN, G., WELSH, R., & CORREA, P. (1982). Geographic pathology of latent prostatic carcinoma. *Int J Cancer*, *29*(6), 611-616.
- YOUSEF, G., & DIAMANDIS, E. (2003). An overview of the kallikrein gene families in humans and other species: emerging candidate tumour markers. *Clinical Biochemistry*, 443-452.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DOS BIOMARCADORES PCA3, GOLPH2, TMPRSS2/ERG, SPINK1, TDRD1 e ERG EM AMOSTRAS DE URINA PARA O DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E SEGUIMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Pesquisador: Victor Evangelista de Faria Ferraz

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 1

CAAE: 33715614.7.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 810.586

Data da Relatoria: 16/09/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa do aluno de mestrado Elius Andrés Paz Cruz com orientação do Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz, Departamento de Genética da FMRP-USP.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os biomarcadores PCA3, GOLPH2, TMPRSS2/ERG, SPINK1, TDRD1 e ERG na urina de pacientes com CaP a fim de determinar seu potencial no diagnóstico, prognóstico e seguimento desta doença.

Objetivo Secundário:- Caracterizar os tipos de fusões dos genes TMPRSS2/ETS- caracterizar o nível de expressão de cada fusão TMPRSS2 identificada na urina dos pacientes - Determinar os níveis de expressão do gene SPINK1 em cânceres de próstata TMPRSS2:ETS negativos - Avaliar os níveis de expressão o gene TDRD1 em cânceres de próstata TMPRSS2: ETS negativos e positivos - Analisar os níveis de expressão dos genes PSA, PCA3, GOLPH2 e ERG na urina de todos os pacientes - Estabelecer diferenças entre os tumores de alto, intermediário e baixo risco além de relacionar os biomarcadores de sangue e urina com os achados na biopsia e no exame anatomopatológico.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 810.586

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos adicionais relevantes. Apenas haverá a coleta de urina após o toque retal habitual previo à biópsia.

Benefícios: Não há benefício específico. Um benefício potencial é a caracterização do cancer de próstata com eventual repercussão no seguimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão coletada a urina dos pacientes com indicação de biópsia prostática para investigação de CaP no Ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP). As amostras de urina serão coletadas após do exame de toque retal no Ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) utilizando o AssayAssure* Universal Urine Collection and Transport Products with Preservative (Thermo Fisher Scientific, Inc.). Um mínimo de 30 ml de cada uma das amostras de urina, serão centrifugados a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se adicionará RNAlater®(Ambion, Inc.) ao sedimento de urina de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante. As amostras serão armazenadas a -20°C ate seu isolamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: PROJETO DE PESQUISA – 2a VERSÃO - (05.09.2014) e TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) – 2a VERSÃO - (05.09.2014).

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa versão 2 de 05.09.2014, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 2 de 05.09.2014, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 810.586

Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRAO PRETO, 29 de Setembro de 2014

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br