

FÁBIO SILVA DE OLIVEIRA

**Expressão dos microRNAs e das interleucinas no
processo inflamatório tecidual em pacientes com
hiperplasia prostática benigna**

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

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Fábio Silva de
Expressão dos microRNAs e das interleucinas no
processo inflamatório tecidual em pacientes com
hiperplasia prostática benigna / Fábio Silva de
Oliveira. -- São Paulo, 2020.
Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.
Orientador: Alberto Azoubel Antunes.

Descritores: 1.Prostatite 2.Hiperplasia
prostática 3.MicroRNAs 4.Expressão gênica
5.Interleucinas

USP/FM/DBD-151/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico essa tese à minha esposa Milena Aur
e aos meus dois filhos, Gael Aur e Amin Aur,
como prova do meu amor e carinho.

Agradecimentos

Primeiramente queria agradecer à Deus, por ter me feito nascer em uma família que me ensinou os reais valores que compõe a vida, e que me dotou de tudo que era essencial e que nunca deixou de acreditar em mim.

Queria agradecer ao Prof. Dr. Alberto Azoubel Antunes, meu orientador, por acreditar em mim e principalmente no meu trabalho. Pela paciência e por todos esses anos de convívio e aprendizado ao seu lado.

Também estender meus agradecimentos à Prof. Dra. Kátia de Ramos Moreira Leite, por ser um exemplo de profissionalismo e apesar de toda sua grandiosidade a frente do Laboratório de Investigação Médica da Faculdade de Medicina Da USP, sempre estar pronta para ajudar seus alunos e todos que utilizam do laboratório para o desenvolvimento das suas pesquisas.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Miguel Srougi, por ter aberto as portas do seu consultório em 2011 e me deixado aperfeiçoar meus conhecimentos Urológicos. Obrigado por todos os ensinamentos e por sempre tratar a gente com respeito e carinho.

Queria agradecer a todos os meus professores do Hospital Geral de Goiânia, o qual tive o prazer de realizar minha especialidade médica em urologia no

ano de 2007, por conduzirem meus primeiros passos nessa fascinante especialidade que é a Urologia.

Quero deixar meus profundos agradecimentos a todas as pessoas que compõe o LIM 55, e aqui queria ressaltar meus agradecimentos a duas pessoas que ali conheci, a Dra. Sabrina Reis, pelo exemplo de luta, dedicação e brilhantismo e a Dra Nayara Viana, por toda a ajuda na confecção dessa tese e por todo comprometimento com esse trabalho.

Quero agradecer a todos os funcionários do Ambulatório da Urologia da Faculdade de Medicina da USP, pelo convívio entre os anos de 2011 à 2014, tempo de desenvolvimento do meu trabalho, pelo carinho e por toda colaboração durante o período que estive trabalhando nesse ambulatório.

Quero agradecer aos meus pais, Bianor de Oliveira e Maria da Paz Silva de Oliveira, e as minhas irmãs Taline e Kelly, por sempre acreditarem em mim, por serem exemplo de dedicação e amor incondicional e por me pautarem com valores tão sublimes que norteiam minha vida: honestidade, lealdade e responsabilidade.

Quero agradecer à minha esposa Milena Aur por todo o amor e compreensão e aos nossos filhos Gael e Amin, por renovar a alegria em nossas vidas.

Quero agradecer aos meus Sogros, Guazi Ragueb Chahda e Terezinha Aur, pelo carinho, pelo amor e por todo o incentivo.

Agradeço também aos queridos amigos e honrados urologistas, Adriano Nesrallah e Fernando Almeida, bem como suas respectivas esposas Ana Nesrallah e Marina Almeida, por toda a amizade e incentivo.

Quero agradecer a minha amiga Layla Rebeca Antunes Farah, por todo carinho e por ter feito da sua família uma extensão para minha família, obrigado por todas as palavras de incentivo.

Quero agradecer também, a todos os amigos que durante os anos de desenvolvimento dessa tese fizeram parte do meu dia a dia, Dr Marcos Nunes, Dr. Luis Henrique, Dr Paulo Sajovic, Dr Karlo Biolo, Dr. Fernando Froes e Dr. Alexandre Iscaife, meus agradecimentos por tornar esses anos mais fáceis.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Hiperplasia prostática benigna (HPB)	2
1.2	Etiopatogenia da HPB	4
1.3	Fatores de risco em HPB	7
1.4	Inflamação e HPB	8
1.5	MicroRNAs.....	10
1.5.1	Biogênese dos microRNAs.....	10
1.5.2	MicroRNA e processo inflamatório.....	12
1.6	Justificativa.....	13
2	OBJETIVOS.....	14
3	MÉTODOS.....	16
3.1	Tipo de estudo.....	17
3.2	Pacientes.....	17
3.3	Crterios de exclusão.....	17
3.4	Variáveis estudadas	18
3.5	Classificação da prostatite.....	20
3.6	Extração do RNA e miRNA	22
3.7	Síntese de cDNA.....	23
3.8	qRT-PCR.....	24
3.9	Análise estatística	25
4	RESULTADOS	26
4.1	Comparação dos dados clínicos demográficos dos pacientes em relação aos graus de prostatite	27
4.2	Padrão de expressão dos microRNAs e das interleucinas nos pacientes portadores de HPB com prostatite	28
4.3	Padrão de expressão dos microRNAs e das interleucinas nos pacientes portadores de HPB com prostatite em relação aos fatores clínico-patológicos.....	32

5	DISCUSSÃO.....	40
6	CONCLUSÕES.....	51
7	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE	

Lista de abreviaturas

APCs -	Células apresentadoras de antígenos
cDNA -	DNA complementar
DHT -	Di-hidrotestosterona
EGF -	Fator de crescimento epitelial
ERalfa -	Receptores estrogênicos alfa
FGF -	Fator de crescimento de fibroblastos
HPB -	Hiperplasia prostática benigna
IFN -	Interferon
IGF -	Fator similar à insulina
IL 15 -	Interleucina 15
IL 17 -	Interleucina 17
IL 2 -	Interleucina 2
IL 4 -	Interleucina 4
IL 6 -	Interleucina 6
IL 8 -	Interleucina 8
IMC -	Índice de massa corpórea
INF beta -	Interferon beta
IPSS -	Escore internacional de sintomas prostáticos
KGF -	Fator de crescimento de queratinócitos
LH -	Hormônio luteinizante
LPS -	lipolissacarídeos
LUTS -	Sintomas do trato urinário inferior
MiRNA -	microRNA
MTOPS -	<i>Medical Therapy of Prostate Symptoms</i>
NIH -	<i>National Institute of Health</i>
OR -	<i>Odds ratio</i>

- qRT-PCR - Reação da cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
- RNA - Ácido ribonucleico
- STUI - Sintomas do trato urinário inferior
- T CD 4 - Linfócitos T CD4
- TCR - Receptores de células T

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Características clínicas dos pacientes estudados.....	19
Tabela 2 -	Ensaio utilizado para quantificação dos genes e microRNAs.....	24
Tabela 3 -	Análise dos dados clínicos demográficos do estudo em relação aos graus de prostatite histológica (48 pacientes)	27
Tabela 4 -	Análise dos dados clínicos demográficos do estudo em relação aos graus de prostatite histológica (26 pacientes)	28
Tabela 5 -	Expressão dos microRNAs e das interleucinas de acordo com o grau de prostatite	31
Tabela 6 -	Expressão dos microRNAs e das interleucinas de acordo com o peso da próstata.....	32
Tabela 7 -	Expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação ao PSA pré-operatório e a idade.....	34
Tabela 8 -	Perfil de expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação ao PSA pós-operatório e a qualidade de vida	35
Tabela 9 -	Expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação ao IPSS e ao índice de massa corpórea (IMC)	36
Tabela 10 -	Expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação a presença ou ausência de hipertensão arterial sistêmica e aos níveis de glicemia.....	37
Tabela 11 –	Expressão dos microRNAs e interleucinas em relação aos níveis de triglicérides e HDL	38
Tabela 12 -	Expressão dos microRNAs e interleucinas em relação aos níveis de colesterol total e a relação estrógeno/testosterona.....	39

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da biogênese e ação supressora pós-transcricional dos miRNA	11
Figura 2 - Microfotografia exemplificando a Categoria 0 – Ausência de prostatite	21
Figura 3 - Microfotografia exemplificando a Categoria 1 – Prostatite leve	21
Figura 4 - Microfotografia exemplificando a Categoria 2 – Prostatite severa	21
Figura 5 - Perfil de expressão dos microRNAs nos pacientes portadores de HPB com prostatite comparados com os pacientes sem prostatite	29
Figura 6 - Perfil de expressão das interleucinas nos pacientes portadores de HPB com prostatite comparados com os pacientes sem prostatite	30

Resumo

Oliveira FS. A expressão dos microRNAs e das interleucinas no processo inflamatório tecidual em pacientes com hiperplasia prostática benigna. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: Nos últimos anos o papel do processo inflamatório na gênese e evolução da HPB tem ganhado muito valor. Isto se deve ao achado comum de células inflamatórias em espécimes histológicos da próstata de homens idosos. Este processo inflamatório pode ter ação direta no crescimento prostático ou interferir na apoptose celular, contribuindo assim para o aumento da próstata e instalação dos sintomas relacionados com tal patologia. Porém ainda não se conhece em nível molecular como esse processo se instala e quais as vias regulatórias do mesmo. Alguns marcadores moleculares têm sido identificados como importantes reguladores do processo inflamatório tecidual, dentre eles, pequenos RNAs portadores de apenas 19 a 23 nucleotídeos, não codificadores de proteínas conhecidos como microRNAs (miRNAs). Porém, suas relações com o processo inflamatório prostático ainda permanecem pouco estudados. **OBJETIVOS:** Avaliar a relação da expressão de miRNAs relacionados com inflamação e das interleucinas (IL) com a presença de prostatite histológica em pacientes portadores de HPB e identificar entre os dados clínicos dos pacientes eventuais fatores de risco para a incidência e intensidade da prostatite. **MÉTODOS:** O estudo consistiu na análise de espécimes de 48 pacientes com diagnóstico de HPB, tratados cirurgicamente por ressecção transuretral da próstata e prostatectomia aberta. Todos os espécimes prostáticos foram analisados por uma única uropatologista e classificados em graus de prostatite histológica. Os miRNAs estudados foram: 126, 146a, 181c, 155 e 223 e as interleucinas 2, 6, 8 e 17. Correlacionamos a expressão desses genes e miRNAs com idade, grau de prostatite histológica, valor do PSA pré e pós-operatório, escore internacional de sintomas prostáticos (IPSS), qualidade de vida, presença de Hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, valores de colesterol total, triglicérides, HDL e LDL colesterol, relação estrogênio testosterona, índice de massa corpórea, testosterona total. A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de qRT-PCR. O grupo controle foi composto por 2 pacientes não portadores de prostatite histológica. **RESULTADOS:** Os microRNAs 126 e 146a apresentaram padrão de expressão heterogêneo nas amostras de HPB associada a prostatite, enquanto que os miRs 155, 181 e 223, apresentaram superexpressão. Em relação às interleucinas, a IL2 e a IL6 apresentaram superexpressão na maioria dos pacientes portadores de prostatite, enquanto que a IL8 e a IL17 apresentaram maior subexpressão nesse mesmo grupo de amostras. Na comparação entre o nível de expressão dos genes e miRNAs e a grau de prostatite, encontramos associação significativamente estatística apenas para o miR-126 que apresentou maior expressão no grupo de pacientes com prostatite intensa ($p=0,04$). De acordo com os fatores clínicos patológicos, encontramos que os miRNAs 146 a e 155 apresentam expressão significativamente maior em pacientes mais velhos ($p=0,01$ e $p=0,05$,

respectivamente), o miR-126 encontra-se mais expresso em pacientes que apresentam PSA pós-operatório $<1\text{ng/ml}$ ($p=0,01$), o miR-155 apresentou maior expressão nos pacientes com IMC mais alto ($p=0,03$) e a IL-8 se mostrou mais expressa nos pacientes com níveis menores de HDL ($p=0,02$).
CONCLUSÕES: Em resumo, a expressão desregulada dos miRNAs e dos genes aqui estudados, podem estar envolvidos no desenvolvimento do processo de prostatite e da HPB. Entretanto, o mecanismo específico dessa relação ainda precisa ser determinado e acreditamos que o presente estudo fornece bases para investigações adicionais sobre essa regulação.

Descritores: Prostatite; Hiperplasia Prostática; MicroRNAs; Expressão Gênica; Interleucinas.

Abstract

Oliveira FS. *The role of microRNAs in the regulation of tissue inflammation in patients with benign prostatic hyperplasia* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

INTRODUCTION: In recent years the role of inflammation in the genesis and progression of BPH has gained much value. This is the common feature of inflammatory cells in histological specimens of prostates from elderly men. This inflammatory process could have a direct action on prostatic growth or interfere with cell apoptosis, thus contributing to the enlargement of the prostate and installation of such pathology related symptoms. But how this process is installed and what the regulatory pathways are, have not been well established. Some molecular markers are emerging as important regulators for inflammation, including microRNAs, which are small RNAs carrying only 19-23 nucleotides, not encoding proteins, but their relationship with the inflammatory process in the prostate remains unknown. **OBJECTIVES:** To evaluate the relationship between the expression of microRNAs 126, 146a, 181C, 155 and 223 and interleukins 2, 6, 8 and 17 with the presence of histological prostatitis in patients with BPH and compare the clinical data of patients with different categories of prostatitis. **METHODS:** The study comprised the analysis of specimens from 48 patients diagnosed with BPH, surgically treated through transurethral resection of the prostate or open prostatectomy. All prostate specimens were analyzed by only one uro pathologist and ranked according to degrees of prostatitis. The microRNAs studied were 126, 146a, 181c, 155 and 223, and the interleukins were 2, 6, 8 and 17. We correlated the expression of these genes with age, degree of histologic prostatitis, pre and postoperative PSA value, international prostatic symptom score (IPSS), quality of life, presence of systemic arterial hypertension, diabetes mellitus, total cholesterol values, triglycerides, HDL and LDL cholesterol, estrogen and testosterone ratio, total testosterone and body mass index. The gene expression analysis was performed by RT-PCR. The control group consisted of 2 patients without histological prostatitis. **RESULTS:** MicroRNAs 126 and 146a showed a heterogeneous expression pattern in BPH samples associated with prostatitis, while miRs 155, 181 and 223, showed overexpression. Regarding interleukins, IL2 and IL6 showed overexpression in most patients with prostatitis, while IL8 and IL17 showed greater underexpression in the same group of samples. In the comparison between the level of expression of genes and miRNAs and the degree of prostatitis, we found a statistically significant association only for miR-126, which showed greater expression in the group of patients with severe prostatitis ($p=0.04$). According to clinical pathological factors, we found that miRNAs 146 a and 155 show significantly greater expression in older patients ($p=0.01$ and $p=0.05$, respectively), miR-126 is more expressed in patients with postoperative PSA $<1\text{ng / ml}$ ($p=0.01$), miR-155 it showed greater expression in patients with a higher BMI ($p=0.03$) and IL-8 was more expressed in patients

with lower HDL levels ($p=0.02$). CONCLUSIONS: In summary, the unregulated expression of miRNAs and genes studied here, may be involved in the development of the process of prostatitis and BPH. However, the specific mechanism of this relationship has yet to be determined and we believe that the present study provides the basis for further investigation into this regulation.

Descriptors: Prostatitis; Prostatic Hyperplasia, MicroRNAs; Gene Expression; Interleukins.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é uma doença muito prevalente entre os homens a partir da quinta e sexta década de vida, e um dos principais problemas de saúde masculina. Estima-se que cerca de 50% dos homens entre 50 e 60 anos possuem HPB e mais de 75% dos homens acima de 80 anos são portadores dessa patologia (1). Normalmente a HPB se manifesta com sintomas do trato urinário inferior (STUI), como: urgência miccional, aumento da frequência urinária, noctúria e fluxo urinário fraco. Estes sintomas, quando não tratados de maneira correta podem gerar complicações graves à saúde, incluindo retenção urinária aguda, insuficiência renal, infecção do trato urinário e cálculos vesicais (2). A HPB caracteriza-se por um aumento de volume da zona de transição da próstata, que ocorre principalmente devido à proliferação do tecido epitelial glandular e em menor grau por um aumento dos elementos estromais prostáticos, isto é, músculo liso e fibroblastos (3).

Em 2000 nos EUA, as visitas médicas, tratamentos, e hospitalizações por HPB geraram um custo aproximado de 1,1 bilhão de dólares devido a 87.000 hospitalizações e 4,4 milhões de visitas ambulatoriais; isso se torna ainda mais preocupante quando observamos o grande envelhecimento da população mundial, fazendo com que a política de saúde americana e os centros de pesquisas discutissem novas opções de tratamento para HPB (4). Por isso, a HPB vem se tornando um grave problema de saúde pública.

A próstata apresenta dois componentes, o epitélio glandular arranjado em ductos e ácinos, e o estroma formado basicamente por fibras musculares lisas associadas a tecido conjuntivo, com marcante presença de fibras colágenas, fibras elásticas e fibroblastos, vasos sanguíneos e linfáticos. No entanto, não há uma uniformidade entre os pesquisadores se o principal elemento envolvido no aumento da próstata é de origem epitelial (ductos ou alvéolos prostáticos) (5) ou proveniente da proliferação de células do estroma (6, 7).

A gênese histopatológica da HPB tem início com o desequilíbrio molecular progredindo para a formação de nódulos hiperplásicos que tendem a aumentar de tamanho. Esse fenômeno afeta a arquitetura histológica da próstata (8). Esses nódulos circundam a uretra (9-11), e podem ser formados por numerosos ductos e ácinos, com estroma escasso (“hiperplasia glandular”) ou então, são constituídos por tecido do estroma prostático, com deposição de colágeno, proliferação de fibroblastos e de células musculares com escasso ou nenhum tecido glandular (“hiperplasia do estroma”) (9, 12).

Estudos mostram que quase sempre os dois tipos de crescimento coexistem nos pacientes com HPB, representados geralmente por estroma em sua maioria e apenas 12 a 20% correspondem a tecido epitelial glandular (6, 13).

1.2 Etiopatogenia da HPB

A etiopatogenia da HPB ainda não foi totalmente esclarecida (14), mas sabe-se que alguns fatores aumentam o risco de aparecimento dessa patologia. Apesar da ausência de uma definição mais precisa, algumas teorias têm sido propostas com o intuito de tentar explicar a gênese da HPB (15).

A HPB não ocorre em homens castrados antes da puberdade (16), e por este motivo acreditava-se que o aumento do volume prostático pudesse resultar da produção exagerada de testosterona. No entanto, alguns estudos mostram que os níveis desse hormônio diminuem com o passar da idade (17, 18). Atualmente, acredita-se que a testosterona esteja implicada no crescimento normal da próstata, mas tem um papel menos relevante na proliferação celular e no aumento glandular que ocorre na HPB (18).

Análises do tecido prostático em casos de HPB demonstram que a concentração local de DHT é três vezes maior que na glândula normal (19). A DHT parece influenciar o desenvolvimento de HPB por meio de fatores de crescimento, tais como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), epitelial (EGF), de queratinócitos (KGF) e fator similar a insulina (IGF). Esses fatores e seus receptores celulares específicos são encontrados em maiores quantidades nas glândulas com hiperplasia do que em próstatas normais e provavelmente orquestram a proliferação celular anormal observada nos casos de HPB (20-22).

O estudo de Coffey e Walsh (23) sugere que nas fases iniciais de desenvolvimento da HPB, haveria uma predominância dos estímulos

responsáveis pela proliferação celular, e nas fases mais avançadas, existiria uma menor atividade dos fatores responsáveis pela morte celular programada.

Na glândula prostática os estrógenos possuem ação dupla. Essas ações se fazem de forma direta e indireta: Indiretamente, os estrógenos suprimem a liberação hipofisária de LH (Hormônio luteinizante), reduzindo assim a síntese testicular de testosterona, diminuindo seus níveis séricos e induzindo apoptose e atrofia epitelial prostática. Concomitantemente, atuando diretamente sobre receptores estrogênicos-alfa (ER-alfa), presentes no estroma prostático, os estrógenos estimulariam a diferenciação epitelial e proliferação celular (24).

Em 1980 uma importante associação de fatores, representadas por resistência periférica à insulina, hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia, foi descrita, esta foi denominada síndrome metabólica (25, 26). Vários estudos têm demonstrado sua relação com doenças urológicas, principalmente HPB, mostrando uma taxa de crescimento prostático anual maior nos pacientes portadores de tal síndrome (27).

A similaridade entre os fenômenos celulares observados na HPB com os observados durante a formação embriológica da próstata levou a hipótese de que ela poderia ser o resultado de um "re-despertar embrionário". Isto se deve a nova formação de epitélio glandular, visto apenas na fase fetal, com poder de produzir mediadores que induzem a proliferação glandular, causando o aumento da próstata na idade adulta (2).

No entanto, várias evidências recentes também sugerem que processos inflamatórios podem ter participação importante na formação da HPB e consequente na instalação dos seus sintomas (4). Dessa forma, o entendimento dos mecanismos envolvidos no surgimento da HPB, assim como a identificação dos fatores biológicos que contribuem para a exacerbação dessa patologia proporcionaria o desenvolvimento de métodos preventivos eficientes e novas formas de tratamento da doença.

1.3 Fatores de risco em HPB

A Hiperplasia Prostática Benigna é uma doença associada ao aumento da idade e a produção de testosterona pelos testículos (28-31). A prevalência de sintomas clínicos é de 10%, 50% e 90% aos 25, 60 e 80 anos respectivamente (32). Embora suas manifestações clínicas ocorram menos comumente que o aumento do volume prostático, elas avançam com a idade. O estudo de Bianchi-Frias et al. (33), envolvendo a análise do estroma prostático de animais jovens e idosos identificou uma mudança significativa na expressão de genes relacionados a inflamação e ao estresse oxidativo. O trabalho demonstrou ainda, que durante o envelhecimento normal, o estroma da próstata apresenta características fenotípicas e moleculares que contribuem para o aparecimento de patologias que afetam a próstata.

Alguns outros fatores como raça (34, 35) consumo de tabaco (36), cirrose hepática (37), vasectomia, atividade sexual (34) e hereditariedade (38, 39), têm sido implicados com a doença.

Recentemente fatores de risco relacionados às doenças cardiovasculares também vêm sendo relacionados à HPB e aos LUTS. Obesidade (35, 40, 41), elevação dos índices glicêmicos (41, 42), diabetes (41-43), dislipidemia (44, 45), 2007; e síndrome metabólica (42, 46) podem aumentar significativamente os riscos de HPB e LUTS.

1.4 Inflamação e HPB

Nos últimos anos o papel do processo inflamatório na gênese e evolução da HPB tem ganhado muito destaque. Isto se deve ao achado comum de células inflamatórias em espécimes histológicos da próstata de homens idosos. Este processo inflamatório pode ter ação direta no crescimento prostático ou interferir na apoptose celular, contribuindo assim para o aumento da próstata e instalação dos sintomas relacionados com tal patologia (4). Di Silverio et al., (47) em uma revisão retrospectiva de tecidos obtidos de ressecção prostática para HPB, encontrou a presença de inflamação aguda em 8,9% das próstatas com volume entre 30 e 39 ml e em até 61,4% das próstatas com 80 a 89 ml.

Revisões sobre a patogênese da HPB têm reforçado o papel do processo inflamatório. Herwig et al., (48) descreveram o estado atual do conhecimento em relação à inflamação na patogênese da HPB, apontando que os nódulos de hiperplasia estão frequentemente associados com linfócitos T ativados e macrófagos. Estas células infiltrantes são responsáveis pela produção de citocinas (Interleucina 2 e interferon) que podem promover o crescimento fibromuscular visto na doença. Ocorre também migração de linfócitos T para estas áreas atraídos pela produção de citocinas pró-inflamatórias (IL 6, IL 8 E IL 15), causando alterações do tecido prostático e substituição do mesmo por nódulos fibromusculares (49).

As células estromais prostáticas de homens portadores de HPB podem agir como as APCs (células apresentadoras de antígenos), estimulando a

produção de IFN E IL17 por células T CD4, promovendo assim respostas autoimunes e regulando a produção de IL 8 E IL 6, fatores chaves para manutenção do processo inflamatório prostático e recrutamento de leucócitos, promovendo o microambiente ideal para a hiperplasia das células prostáticas (50).

Várias citocinas se encontram superexpressas em amostras teciduais de pacientes com HPB. A IL 17 que é praticamente insignificante no tecido prostático normal, aparece aumentada em cerca de 80% dos tecidos de pacientes com HPB. Também tem sido demonstrado que níveis de mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL 2 e IL 4 se encontram superexpressos 10x e 14x respectivamente em tecidos de HPB, concluindo que a inflamação crônica é importante na patogênese desta doença (3).

Examinando a linha de base de biópsias de próstata em um subgrupo de 1197 pacientes que participaram do *Medical Therapy of Prostatic Symptoms Study* (MTOPS), foi encontrado que 43% dos homens tinham inflamação crônica. Em todos os grupos de pacientes (placebo, finasterida, doxazosina ou combinação de finasterida e doxazosina), a taxa de progressão clínica em termos de sintomas, retenção urinária aguda ou necessidade de tratamento cirúrgico foi maior entre os pacientes com inflamação crônica. Para os pacientes que não tinham inflamação, a progressão clínica só foi observada em 13,2% dos pacientes, dos quais 3,9% necessitavam de cirurgia e nenhum teve retenção urinária aguda (51)

1.5 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNA) são pequenos RNAs não codificadores de proteínas, compostos normalmente por 20 a 23 nucleotídeos e que ganharam uma grande importância pelo seu papel regulador da expressão de genes codificadores, entre eles aqueles que controlam o processo inflamatório (52, 53). Acredita-se que os miRNA podem controlar a expressão de vários genes, afetando as vias de regulação celular, como crescimento, diferenciação, mobilidade e apoptose (54).

O primeiro microRNA foi descoberto em 1993 por Victor Ambros, no entanto os microRNAs não foram reconhecidos com uma classe distinta de reguladores biológicos até 2000.

1.5.1 Biogênese dos MicroRNAs

Os miRNAs são sintetizados pela RNA polimerase II e modificados após a transcrição pela adição de uma capa na região 5' e uma cauda poli A na região 3'. O precursor primário do miRNA, então denominado pri-miRNA, forma uma estrutura do tipo *hairpin* e, no núcleo, é submetido à ação do complexo microprocessador nuclear Drosha e então convertido em pré-miRNA, uma molécula de fita dupla de aproximadamente 60-70 nucleotídeos (55-58). O pré-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma pela Exportina-5, proteína especializada no transporte nucleocitoplasmático de macromoléculas, incluindo os ácidos ribonucleicos (59). No citoplasma, o pré-

miRNA é clivado pela enzima Dicer, transformando-se em um miRNA duplex contendo o miRNA maduro e sua fita complementar. Novamente a Dicer cliva a dupla fita e produz o miRNA maduro de fita única, que então é incorporado a um complexo efetor denominado RISC (complexo silenciador induzido por RNA) (. O RISC guia o miRNA maduro até seu RNAm alvo e então ocorre a repressão da tradução da proteína ou a promoção da degradação do RNA. Esta ação dependerá do grau de complementariedade do miRNA com o seu RNA mensageiro (RNAm) alvo (Figura 1), podendo este pareamento ser perfeito ou incompleto (62, 63).

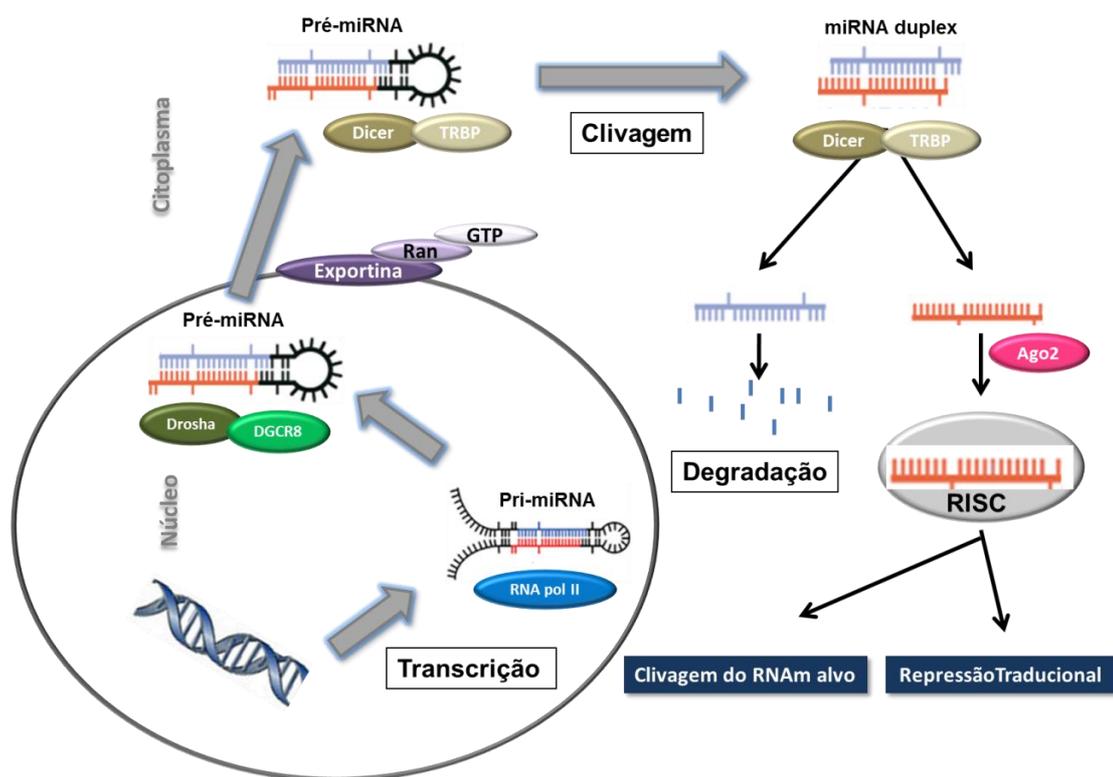


Figura 1 - Representação esquemática da biogênese e ação supressora pós-transcricional dos miRNA (64).

1.5.2 MicroRNA e processo inflamatório

Vários estudos, tem demonstrado a grande importância dos miRNA na regulação da resposta imunológica relacionada aos processos inflamatórios. Experimentos em ratos, onde houve bloqueio das enzimas DIRCE 1 ou EGO 2 no citoplasma, fundamentais para conversão do pré-miRNA em miRNA, observou-se uma diminuição do volume total de microRNA, o que contribuiu com o desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos (65).

Demais referências na literatura têm demonstrado uma íntima relação dos miRNA com o controle dos processos inflamatórios. Pesquisas *in vitro* demonstraram que o miRNA 181 possui um papel importante na regulação do desenvolvimento de células T bem como no controle da expressão de seus receptores (66). Dados na literatura têm demonstrado que o miR- 146a está diretamente relacionado na regulação negativa da resposta aguda durante a ativação da resposta imune inata. Estudos experimentais têm demonstrado que os miRNA 155 e 223, desempenham importante papel na regulação dos processos inflamatórios e resposta imunológica respectivamente (67, 68). Finalmente, estudos realizados por nosso grupo têm demonstrado uma relação estatisticamente positiva do miRNA 126 com a presença de prostatite crônica histológica em pacientes com HPB.

1.6 Justificativa

Evidências na literatura médica apontam para uma íntima relação entre o processo inflamatório tecidual da próstata e a gênese da HPB. No entanto, os mecanismos que desencadeiam o processo inflamatório e as vias regulatórias do mesmo ainda precisam ser melhor caracterizados.

Existem relatos na literatura sobre associação entre a expressão dos miRNAs 126, 146, 155, 181 e 223 com a resposta imunológica ligada aos processos inflamatórios. Desse modo, podemos especular um possível papel destes miRNAs na inflamação associada ao desenvolvimento da HPB. O estudo destes fenômenos pode ajudar a esclarecer a fisiopatologia da HPB e auxiliar na criação de alternativas terapêuticas para doença.

2. OBJETIVOS

Objetivo primário

Avaliar a relação da expressão dos microRNAs 126, 146a, 181c, 155 e 223 e das interleucinas 2, 6, 8 e 17 com a presença de prostatite histológica em pacientes portadores de HPB.

Objetivos secundários

Avaliar as correlações das características clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de HPB em relação aos graus de prostatite histológica.

Avaliar a relação da expressão dos microRNAs 126, 146a, 181c, 155, 223 e das interleucinas 2, 6, 8 e 17 com as características clínicas dos pacientes portadores de HPB.

3. MÉTODOS

3.1 Tipo do estudo

Estudo exploratório, retrospectivo.

3.2 Pacientes

O estudo consistiu na análise de espécimes de 48 pacientes com diagnóstico de HPB, tratados cirurgicamente por ressecção transuretral da próstata ou prostatectomia aberta no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) no período de setembro 2012 a julho de 2014. Dois pacientes desse grupo foram usados como controle, por não apresentarem prostatite na análise histológica.

3.3 Critérios de exclusão

Não foram incluídos no estudo os pacientes sondados, submetidos à biópsia da próstata, portadores de cálculos vesicais, em tratamento ou portadores de infecção urinária, com antecedente de prostatite clínica, diabéticos, aqueles que faziam uso crônico de anti-inflamatórios ou finasterida, e os casos sem informações clínicas completas.

Todos os pacientes foram atendidos pelo Setor de Próstata da Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(TCLE) que permitia a utilização dos seus dados para estudo, bem como o uso do fragmento proveniente da cirurgia para as análises moleculares.

3.4 Variáveis estudadas

Foram catalogadas variáveis de todos os pacientes: idade, raça, PSA, peso e altura do paciente; IMC (índice de massa corpórea), peso da próstata, questionário de sintomas e de qualidade de vida e análise histológica do espécime tecidual. Também foram dosados os níveis sanguíneos de estradiol, testosterona, colesterol total, HDL e LDL colesterol, triglicérides, hormônio folículo estimulante (FSH), Hormônio luteinizante (LH). O peso da próstata foi aferido pelo uso do USG abdominal da próstata e os sintomas urinários foram analisados através do preenchimento do questionário de escore de sintomas da Associação Americana de Urologia (69). A tabela 1 descreve as características dos pacientes estudados.

Tabela 1 - Características clínicas dos pacientes estudados

	Características demográficas		
	Média	Mediana	Desvio Padrão
Idade	65,4	65	7,29
Volume prostático (g)	58,3	54	25,75
PSA-pré	2,12	2,15	0,98
PSA-pós	1,02	0,8	0,83
IMC	27,46	27,5	4,13
IPSS	20,68	22	4,99
QV	4,45	4	0,71
Estradiol	25,47	22,2	8,89
LH	6,89	5,2	5,9
FH	9,86	6,2	12,12
Testosterona total	442,2	427	166,42
Colesterol total	185,32	181	31,29
Triglicérides	144,46	143	58,49
HDL	46,68	46	12,35
LDL	115,28	115	25,24

Todos os pacientes foram submetidos à ressecção endoscópica ou cirurgia aberta para tratamento da HPB. Um fragmento da peça cirúrgica foi retirado, imediatamente colocado em solução estabilizadora de RNA (RNA later, Applied Biosystems), e encaminhado para o laboratório de investigação médica da disciplina de urologia do HCFMUSP (LIM55), onde foi processado.

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisas do HCFMUSP.

3.5 Classificação de prostatite

Categorizamos nossos pacientes em três grupos a depender da presença ou ausência de prostatite histológica e do grau da mesma segundo J. Irani (1997)(70). Foram classificados como, 0 os pacientes não portadores de prostatite; 1 (leve) os pacientes portadores de prostatite aonde havia contato das células inflamatórias com o epitélio glandular, sem formação de nódulos e sem infiltração do mesmo; e 2 (intensa) os tecidos prostáticos portadores de prostatite onde havia invasão do epitélio glandular e formação de nódulos pelas células inflamatórias. Para tal classificação, todas as lâminas foram avaliadas por uma mesma uro-patologista, perfazendo um total de 345 lâminas avaliadas e devidamente classificadas nos três graus de prostatite citadas acima. As figuras 2, 3 e 4 ilustram exemplos de pacientes classificados.

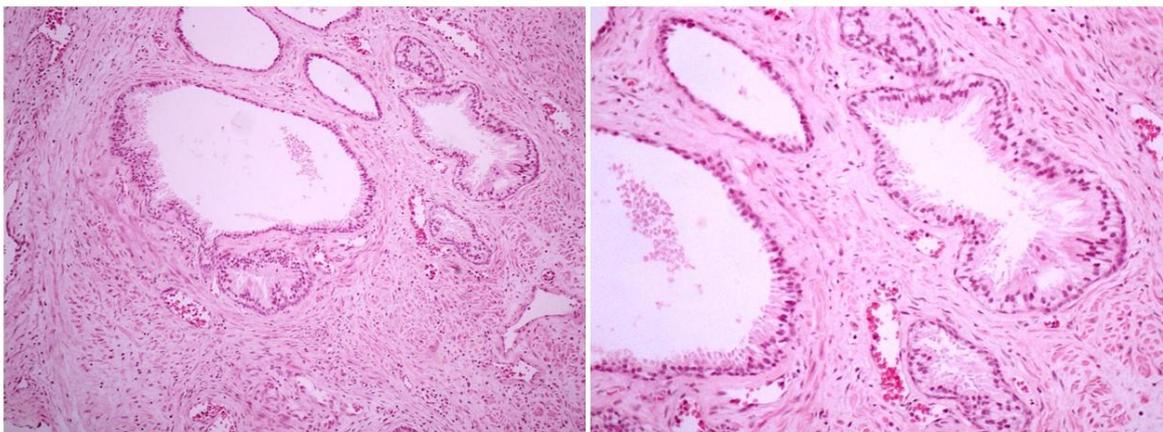


Figura 2 - Microfotografia exemplificando a Categoria 0 – Ausência de prostatite

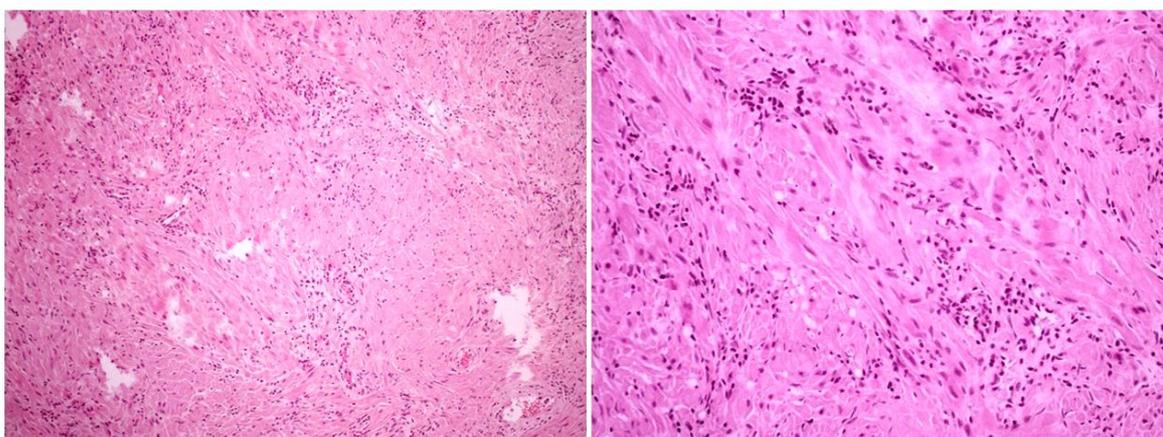


Figura 3 - Microfotografia exemplificando a Categoria 1 – Prostatite leve

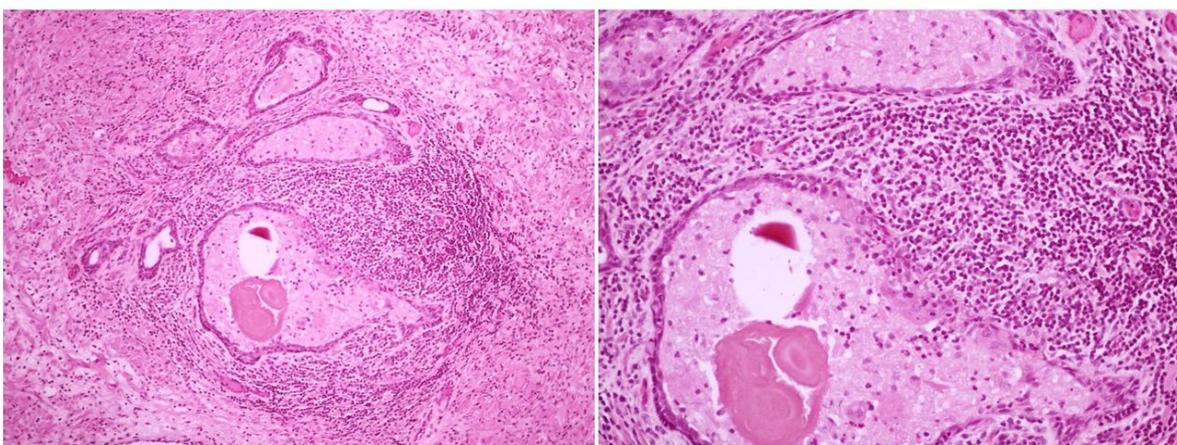


Figura 4 - Microfotografia exemplificando a Categoria 2 – Prostatite intensa

3.6 Extração do RNA e miRNA

O miRNA e o RNA foram isolados com o kit miRVana (Ambion®) de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA. Ao tubo contendo a amostra foram adicionados 500 µL do tampão de lise (10 vezes o volume da massa tumoral). As amostras foram então maceradas no equipamento *Tissue Laser*. Adicionamos 50 µL do aditivo de homogeneizar e a solução foi deixada 4 minutos no gelo. Foram adicionados 500 µl de fenol-clorofórmio e as amostras foram vortexadas e centrifugadas na velocidade máxima (14.000 RPM) por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida para um novo tubo e foi adicionado um terço do volume de etanol 100%. A solução foi transferida para um filtro e centrifugada a 10.000 g por 15 seg. O filtro contém o RNA total e foi reservado. No filtrado encontram-se os miRNAs, e a esse volume foram adicionados dois terços de etanol 100%. A solução foi transferida para uma nova coluna e centrifugada a 10.000 g por 15 seg. Nos filtros do miRNA e no de RNA foi feita uma lavagem com 700 µl de *wash solution 1/3*, e as amostras foram centrifugadas por 10 seg. a 10.000 g. Foram feitas então duas lavagens com 500 µl de *wash solution 2/3*, e nos intervalos as amostras foram centrifugadas por 10 seg. a 10.000 g. O filtrado foi descartado e foram adicionados 100 µl de água *RNAse free* a 95°C no filtro e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g por 10 seg.

A concentração e pureza do microRNA e do RNA foram estimadas em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280 nM). O

filtrado contendo o miRNA e o RNA foi então armazenado em freezer -80°C até ser utilizado.

3.7 Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) do miRNA foi obtido usando *TaqMan*[®] *miRNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uma quantidade de 200 ng/mL de miRNA foi diluída em 20 µL de água. Deste volume 3 µL foi submetido à transcrição reversa, onde foram adicionados 7 µL de mix contendo os reagentes do kit: 0,15 µL de DNTP mix, 0,5 µL da enzima transcriptase reversa, 1,5 µL do tampão da enzima, 0,19 µL de inibidor de RNase, 3,66 µL de água livre de nucleasse e 1 µL de *primer stem-loop* com sequência específica para os miRNA, totalizando 10 µL de cDNA. A reação foi realizada em equipamento PCR Veriti[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo os seguintes parâmetros: 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C e 5 min a 85 °C.

A síntese do cDNA do RNA foi realizada utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription*[®] (Applied Biosystems) que utiliza a Transcriptase reversa MultiScribe e *primers* randômicos. O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20 µL e concentração de 500 µL/ng. A este volume foram acrescentados 4 µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 µL do mix de dNTPs (25X), 4 µL do tampão da enzima (10X), 2 µL da enzima transcriptase reversa e 8,4 µL de água livre de nuclease. A solução foi então submetida a ciclos de

temperaturas (25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min) no termociclador Veriti® (Applied Biosystems). Ao final das reações ambos os cDNA foram armazenados a -20 °C até o uso.

3.8 qRT-PCR

As reações foram realizadas no termociclador *ABI 7500 Fast* (Applied Biosystems, CA, EUA) no modo standard. Para quantificação das amostras foram utilizados primers específicos *TaqMan®* (Applied Biosystems, CA, EUA) (tabela 2).

Tabela 2 – Ensaios utilizados para quantificação dos genes e miRNAs

Genes e microRNAs	Ensaio
miR-126	002228
miR-146a	000468
miR-181c	00482
miR-155	002623
miR-223	002295
IL2	Hs00174114_m1
IL6	Hs00985639_m1
IL8	Hs00174103_m1
IL17	Hs00174383_m1
RNU43	001095
B2M	Hs00187842_m1

As reações ocorreram nas seguintes concentrações: 0,5 µl do primer específico, 5 µl de *TaqMan®* Universal PCR máster mix (Applied Biosystems, CA, EUA), 3,5 µl de água livre de nuclease e 1µl de cDNA.

O nível de expressão dos miRNA e dos genes alvo foi obtido pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo

método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (71). No gráfico logarítmico, esse método padroniza a expressão do grupo controle como uma linha basal (representada pelo número 1) e a expressão relativa de cada miRNA e RNA para cada amostra de HPB é demonstrada em vezes o normal para mais nos casos de superexpressão e para menos nos de subexpressão.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e o RNU43 foi usado como controle endógeno dos miRNA estudados, enquanto que o gene da $\beta 2$ -microglobulina (B2M) desempenhou esse papel para os RNA estudados.

3.9 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS 19.0. Para comparação da expressão dos genes e miRNA com as variáveis clínicas nós utilizamos o Teste T de Student para variáveis homogêneas, e Mann-Whitney para variáveis não homogêneas.

Em toda análise estatística foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram p-valor inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Comparação dos dados clínico demográficos dos pacientes em relação aos graus de prostatite

Quando subdividimos os pacientes de acordo com o grau de prostatite, 22 pacientes foram classificados como portadores de prostatite de grau leve, e 24 foram classificados como portadores de prostatite grau intenso. Não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa, na comparação entre os dados clínico-demográficos dos pacientes e os graus de prostatite (tabelas 3 e 4). A tabela 4 apresenta os dados dessa comparação para as características clínicas que não conseguimos coletar de todos os pacientes do estudo.

Tabela 3 – Análise dos dados clínico demográficos do estudo em relação aos graus de prostatite histológica (total 48 pacientes)

	Sem prostatite (0) (n = 2)		Prostatite leve (1) (n = 22)		Prostatite severa (2) (n = 24)		p
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
Idade	63,2	4,4	67,1	7,6	65,2	7,5	0,56
USG (gramas)	69,1	33,2	57,6	16,2	56,8	28,4	0,62
PSA pré	1,8	1	2,2	0,9	2,1	1	0,75
PSA pós	1,1	0,3	0,7	0,3	1,1	1	0,48
QoL	4,8	0,8	4,5	0,6	4,3	0,7	0,47
I-PSS	21,4	1,9	20,2	6,9	20,7	4,3	0,9

Tabela 4 – Análise dos dados demográficos do estudo em relação aos graus de prostatite histológica (total 26 pacientes)

	Sem prostatite (0) (n = 2)		Prostatite leve (1) (n = 7)		Prostatite severa (2) (n = 17)		P
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
IMC	30	8,4	28,1	2,4	26,8	4,2	0,54
Estradiol	32,7	3,2	18,8	4,5	26,9	9,3	0,07
LH	4,9	3,5	9,9	10	6	3,9	0,34
FSH	5,7	2,3	17,2	3,1	7,7	5	0,23
Glicose	113,5	20,5	96,1	9,7	104	15,2	0,31
Triglicérides	109	72,1	135,5	77,2	151,9	51,9	0,58
Colesterol total	193	38,1	201,3	36,9	178,7	28,2	0,31
LDL	113,5	20,5	128,6	28,8	110,7	24	0,34
HDL	57,5	3,5	45,5	17,8	45,8	10,6	0,45
Testosterona total	667,5	259,5	383,3	121,7	435,2	156,4	0,08

4.2 Padrão de expressão dos microRNAs e das interleucinas nos pacientes portadores de HPB com prostatite

De acordo com a classificação de prostatite, dois pacientes não possuíam nenhum grau da mesma no tecido analisado e estes foram utilizados como controle para cálculo da expressão relativa dos genes e microRNAs (representados na linha 1 do gráfico) (figura 5). A análise de expressão dos microRNAs 126, 146a, 155 e 181c através do método qRT-PCR nos tecidos de pacientes portadores de HPB demonstrou um padrão de superexpressão dos miRNAs 155, 181 e 223 e uma expressão heterogênea dos miRNAs 126 e 146a.



Figura 5 - Perfil de expressão dos microRNAs nos pacientes portadores de HPB com prostatite comparados com os pacientes sem prostatite

Entre as interleucinas, IL2 e IL6 apresentaram superexpressão na maioria dos pacientes portadores de prostatite quando comparados com os pacientes não portadores de prostatite. Já a IL8 e a IL17 apresentaram maior subexpressão na maioria dos pacientes analisados (figura 6). Destacamos que não conseguimos avaliar o padrão de expressão em grande parte dos

nossos pacientes. Foram realizados alguns experimentos de repetição nesses casos, mas não conseguimos obter resultados satisfatórios. Apesar disso, dentre os pacientes onde conseguimos essa mensuração, essa interleucina apresentou subexpressão na maioria deles (69%).

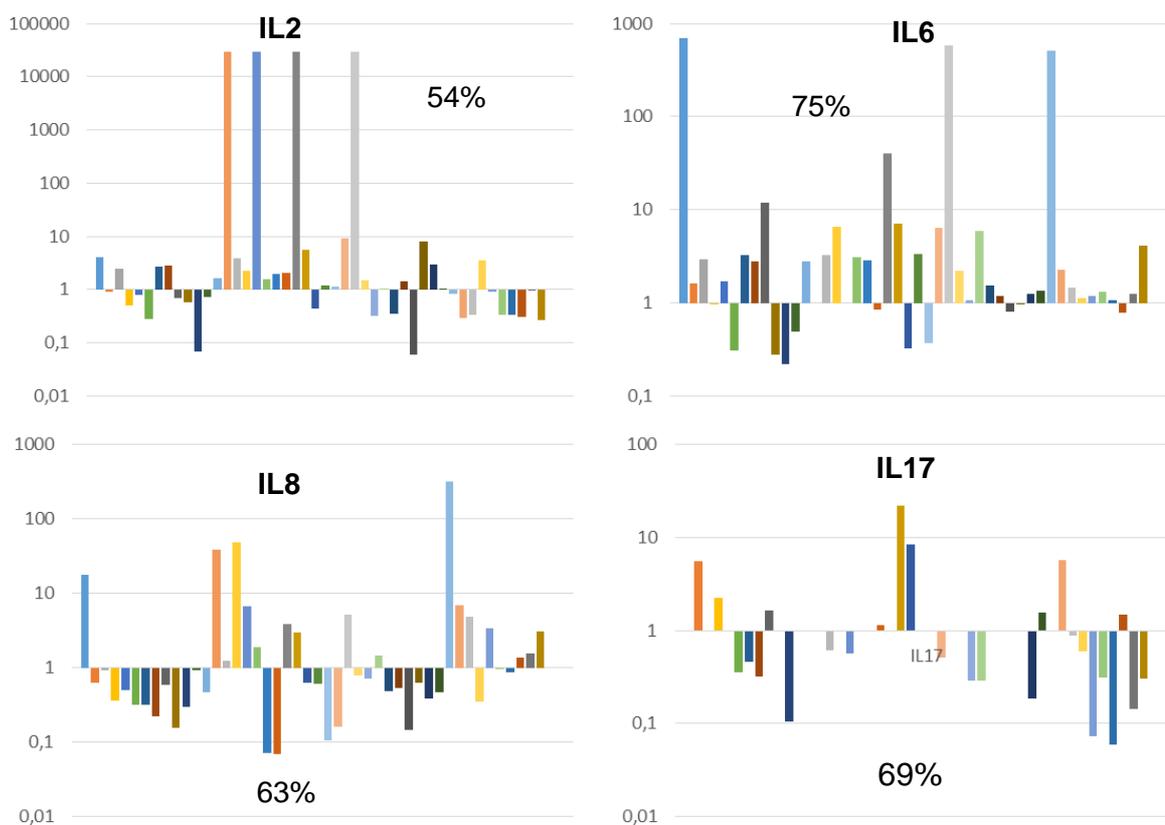


Figura 6 - Perfil de expressão das interleucinas nos pacientes portadores de HPB com prostatite comparados com os pacientes sem prostatite

Quando subdividimos os pacientes de acordo com o grau de prostatite, 22 pacientes foram classificados como portadores de prostatite de grau leve, e 24 foram classificados como portadores de prostatite grau intenso. Na comparação do nível de expressão dos genes e microRNAs entre os pacientes com prostatite leve e intensa, encontramos uma associação

significativamente estatística, apenas para o miR-126 que apresentou maior expressão nos pacientes com prostatite intensa ($p=0,04$) (tabela 5). À semelhança deste miR, os miRNAs 146a, 155, 181 e 223 também apresentaram maior expressão no grupo de pacientes com prostatite intensa, embora sem significância estatística. Entre as interleucinas, a IL2 e a IL 17 apresentaram maior expressão nos pacientes com prostatite de grau leve, e a IL6 e IL8 apresentaram maior expressão no grupo de pacientes com prostatite intensa.

Tabela 5 - Expressão dos microRNAs e das interleucinas de acordo com o grau de prostatite

Genes	Grau de prostatite		p
	Média (desv. Padrão)		
	Prostatite leve (n=22)	Prostatite intensa (n=24)	
IL-2	4051,11 (1,95)	1238,8 (1,95)	0,594*
IL-6	39,28 (209,13)	47,57 (209,13)	0,278*
IL-8	5,69 (2,41)	14,65 (2,41)	0,321*
IL-17	3,14 (0,27)	1,38 (0,27)	0,442*
miR-126	1,66 (3,57)	2,68 (1,16)	0,040*
miR-146a	1,77 (2,00)	2,34 (1,63)	0,596*
miR-155	2,08 (0,95)	5,00 (1,29)	0,908*
miR181	3,13 (21,18)	4,09 (8,87)	0,240*
miR-223	2,71 (7,90)	7,94 (7,09)	0,782*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

4.3 Padrão de expressão dos microRNAs e das interleucinas nos pacientes portadores de HPB com prostatite em relação aos fatores clínicos patológicos

Na comparação do nível de expressão dos genes e microRNAs com o peso da próstata, não encontramos nenhuma associação significativa do ponto de vista estatístico (tabela 6). Apesar disso, podemos observar maior expressão das interleucinas 8 e 17 em próstatas menores, e maior expressão das interleucinas 2 e 6 e de todos os miRNAs estudados, nas próstatas ≥ 40 g.

Tabela 6 - Expressão dos microRNAs e das interleucinas de acordo com o peso da próstata

Genes	USG (gramas)		p
	Média (desv. Padrão)		
	<40g (n=13)	≥ 40 g (n=33)	
IL-2	2,35(3,33)	2,60(2,92)	0,488*
IL-6	58,68(202,44)	1096,17(41,39)	0,257*
IL-8	41,94(128,61)	4,49(10,43)	0,798*
IL-17	0,97(1,45)	0,72(0,91)	0,981*
miR-126	1,52(1,85)	1,82(2,66)	0,855*
miR-146a	1,12(0,99)	1,28(1,98)	0,502*
miR-155	0,73(0,92)	0,90(1,27)	0,742*
miR181	5,67(6,25)	8,81(16,55)	0,932*
miR-223	3,58(3,77)	4,63(8,11)	0,311*

A análise de expressão dos microRNAs e das interleucinas de acordo com o PSA pré-operatório e a idade dos pacientes está demonstrada na tabela 7. Não encontramos nenhuma diferença estatística significativa em relação ao nível de PSA, que foi categorizado em PSA-pré < 2,5ng/ml e \geq 2,5 ng/ml. Os pacientes foram subdivididos também de acordo com a idade em < 65 anos e > 65 anos. Nesta comparação, encontramos que os microRNAs 146a e 155 estão mais expressos nos pacientes mais velhos ($p= 0,01$ e $p=0,05$, respectivamente).

Tabela 7 - Expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação ao PSA pré-operatório e a idade

Genes	PSA pré Média (desv. Padrão)		P	Idade Média (desv. Padrão)		P
	<2,5ng/ml (n=31)	≥2,5ng/ml (n=15)		<65 anos (n=21)	≥65anos (n=25)	
IL-2	2,34(2,63)	2,89(3,75)	0,790*	3,02(3,97)	2,12(1,90)	0,695*
IL-6	1107,21(4275,00)	174,19(355,12)	0,137*	1667,71(5140,05)	76,58(253,13)	0,501*
IL-8	5,46(15,49)	34,94(119,24)	0,550*	26,57(101,23)	5,42(14,39)	0,766*
IL-17	0,65(0,90)	1,12(1,46)	0,502*	0,64(0,97)	1,00(1,28)	0,491*
miR-126	1,89(2,80)	1,42(1,47)	0,860*	1,10(1,47)	2,28(2,95)	0,51*
miR146a	1,19(1,55)	1,32(2,15)	0,343*	0,63(0,72)	1,74(2,17)	0,01*
miR-155	0,74(0,89)	1,09(1,62)	0,972*	0,47(0,57)	1,18(1,44)	0,05*
miR181	9,28(16,92)	5,12(6,34)	0,535*	4,37(5,30)	10,91(18,56)	0,83*
miR-223	3,52(5,98)	5,02(9,05)	0,770*	3,29(7,09)	5,21(7,18)	0,69*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

Comparamos também o nível de expressão dos genes e microRNAs com o PSA pós-operatório e com o índice de qualidade de vida dos pacientes. Como demonstrado na tabela 8, o PSA pós-operatório foi categorizado em < 1 ng/ml ou ≥ 1 ng/ml, e o índice de qualidade de vida, representados em 1 para os pacientes com escore < 4 e 2 para os pacientes com escore ≥ 4. Nessas comparações encontramos significância estatística apenas para o miR-126 que se mostrou significativamente mais expresso nos pacientes que apresentaram PSA pós-operatório <1ng/ml (p=0,015).

Tabela 8 - Perfil de expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação ao PSA pós-operatório e a qualidade de vida

Genes	PSA pós (ng/ml)		p	Qualidade de vida		
	Média (desv. Padrão)			Média (desv. Padrão)		p
	<1ng/ml (n=27)	≥1 ng/ml (n=19)		Mediana (1=26)	Mediana (2=17)	
IL-2	2,23(3,02)	3,00(3,04)	0,147*	3752(13245,8)	2870(11821,9)	0,825*
IL-6	33,86(161,03)	1895,91(5372,22)	0,233*	20,6(94,2)	62,2(167)	0,789**
IL-8	2,02(2,54)	33,62(106,39)	0,696*	5,3(15,3)	38,1(127,7)	0,535**
IL-17	0,71(0,97)	0,95(1,32)	0,800*	0,6(1,1)	1,3(1,6)	0,236*
miR-126	2,18(2,83)	1,12(1,61)	0,015*	1,5(1,7)	1,3(1,5)	0,670*
miR-146a	1,33(1,73)	1,10(1,81)	0,289*	1,2(1,3)	1,4(2,3)	0,692*
miR-155	1,07(1,37)	0,55(0,73)	0,176*	0,8(1,2)	0,5(0,7)	0,383*
miR181	9,52(18,17)	5,66(5,62)	0,920*	1,1(1,3)	1,2(1,8)	0,931*
miR-223	4,92(8,57)	3,49(4,40)	0,664*	2,1(2,8)	3(5,2)	0,513*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

O IPSS foi categorizado de acordo com a sua média, dividindo os pacientes em grupo 1 com escore de IPSS-AUA < 22 e outro grupo 2 com escore IPSS-AUA ≥ 22. Na categorização do IMC os pacientes foram subdivididos em IMC < 25 Kg/m² e > 25 Kg/m². A correlação entre a expressão dos microRNAs e das interleucinas de acordo com o IPSS não demonstrou diferença estatística significativa. Considerando o IMC encontramos que o microRNA 155 apresentou maior expressão nos pacientes com IMC mais alto (p=0,03) (tabela 9).

Tabela 9 - Expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação ao IPSS e ao índice de massa corpórea (IMC)

Genes	IPSS		p	IMC		p
	Média (desv. Padrão)			Média (desv. Padrão)		
	1 (n=33)	2 (n=10)		<25kg/m ² (n=5)	≥25Kg/m ² (n=20)	
IL-2	29,56(11810,8)	4876,9(15414)	0,677*	4,55(4,63)	2,96(3,49)	0,974*
IL-6	46,6(143,1)	2,1(2,8)	0,631**	3,12(3,65)	1806,47(5245,00)	0,201*
IL-8	21,1(92,4)	8,9(19,4)	0,684*	14,41(30,90)	6,85(12,97)	0,786*
IL-17	0,8(1,4)	1(1,2)	0,727*	0,19(0,13)	0,88(1,28)	0,929*
miR-126	1,4(1,5)	1,5(1,9)	0,908*	0,97(1,24)	1,49(1,36)	0,480*
miR-146a	1,4(1,9)	1(1)	0,509*	0,52(0,47)	1,41(1,92)	0,328*
miR-155	0,7(1)	0,6(0,9)	0,840*	0,18(0,10)	1,24(1,55)	0,030*
miR181	1,1(1,2)	1,2(2,2)	0,834*	6,09(7,83)	7,43(9,95)	1,00*
miR-223	2,2(2,9)	3,4(6,3)	0,41*	2,33(3,02)	5,25(7,78)	0,277*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

A análise do perfil de expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação a presença ou ausência de Hipertensão arterial sistêmica e aos níveis de glicose, categorizados em ≤ 100 mg/dl e > 100 mg/dl não apresentou nenhuma diferença significativamente estatística. Os dados estão demonstrados na tabela 10.

Tabela 10 - Perfil de expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação a presença ou ausência de hipertensão arterial sistêmica e aos níveis de glicemia

Genes	HAS		p	Glicose		p
	Média (desv. Padrão)			Média (desv. Padrão)		
	1-Ausência (n=13)	2-Presença (n=12)		<100 mg/dl (n=12)	≥100 mg/dl (n=12)	
IL-2	3,41(3,67)	3,23(3,94)	0,974*	2,30(1,63)	4,63(5,07)	0,439*
IL-6	1459,53(4718,12)	1430,93(4941,16)	0,201*	1429,73(4941,54)	1582,21(4906,21)	0,141*
IL-8	10,31(19,28)	6,25(15,60)	0,786*	11,80(24,08)	5,21(7,35)	0,356*
IL-17	0,68(1,12)	0,79(1,28)	0,929*	0,34(0,22)	1,23(1,64)	0,630*
miR-126	1,19(1,10)	1,60(1,55)	0,480*	0,94(0,94)	1,91(1,54)	0,106*
miR-146a	1,20(2,14)	1,26(1,31)	0,328*	0,72(0,75)	1,80(2,34)	0,166*
miR-155	0,91(1,08)	1,15(1,80)	0,870*	0,58(0,71)	1,55(1,86)	0,299*
miR181	5,22(6,01)	9,26(12,06)	0,415*	4,29(4,81)	10,41(12,19)	0,133*
miR-223	5,44(8,78)	3,83(5,05)	0,936*	4,61(8,92)	5,02(5,49)	0,419*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

A análise do nível de expressão dos microRNAs e interleucinas em relação a dosagem dos triglicérides, onde os pacientes foram categorizados em ≤ 150 mg/dl e ≥ 150 mg/dl e o HDL, com categorização dos pacientes em ≤ 40 mg/dl e > 40 mg/dl, está demonstrada na tabela 11. Observamos diferença estaticamente significativa, apenas para a interleucina 8 que se mostrou mais expressa nos pacientes com níveis menores de HDL ($p=0,02$).

Tabela 11 - Expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação aos níveis de triglicérides e HDL

Gene s	Triglicérides		P	HDL		P
	Média (desv. Padrão)			Média (desv. Padrão)		
	<150 mg/dl (n=15)	≥150 mg/dl (n=9)		<40 mg/dl (n=7)	≥40 mg/dl (n=17)	
IL-2	3,56(3,32)	3,16(4,68)	0,346*	3,53(5,26)	3,37(3,43)	0,322*
IL-6	1265,39(4398,07)	1906,93(5705,36)	0,121*	2568,72(6424,60)	1068,37(4143,61)	0,409*
IL-8	3,49(6,88)	16,85(26,38)	0,069*	20,91(28,90)	3,39(6,62)	0,024*
IL-17	0,64(1,10)	0,97(1,42)	0,191*	0,28(0,14)	1,02(1,43)	0,366*
miR-126	1,68(1,51)	0,99(0,92)	0,355*	2,31(1,90)	1,06(0,87)	0,240*
miR-146^a	1,39(2,12)	1,05(1,11)	0,976*	1,16(1,49)	1,30(1,94)	0,975*
miR-155	0,93(1,54)	1,28(1,39)	0,788*	1,54(2,18)	0,87(1,08)	0,975*
miR-181	9,44(11,42)	3,85(3,76)	0,222*	8,72(9,50)	6,78(9,85)	0,546*
miR-223	3,35(4,95)	7,26(9,87)	0,155*	5,54(6,03)	4,52(7,84)	0,325*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

De acordo com a análise da expressão das interleucinas e dos microRNAs em relação aos níveis de colesterol total, onde os pacientes foram subdivididos em <200mg/dl e ≥200mg/dl e com a relação estrógeno/Testosterona (Es/Test), onde os pacientes foram categorizados em pacientes com uma relação < ou igual a 5% (1) e >5% (2) nos grupos com prostatite leve e prostatite severa, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa (tabela 12).

Tabela 12 - Expressão dos microRNAs e das interleucinas em relação aos níveis de colesterol total e a relação estrógeno/testosterona

Genes	Colesterol Total		P	Es/Test		P
	Média (desv. Padrão)			Média (desv. Padrão)		
	<200 mg/dl (n=17)	≥200 mg/dl (n=7)		1 (n=11)	2 (n=12)	
IL-2	3,36(4,43)	3,50(2,28)	0,332*	4435,1(14696,2)	8127(18973,1)	0,61*
IL-6	2066,91(5669,83)	143,69(372,95)	0,634*	57,6(175,5)	44,8(141,9)	0,856*
IL-8	9,74(20,27)	5,49(9,75)	0,391*	4,7(8,9)	14,9(26,8)	0,356**
IL-17	0,61(1,09)	1,03(1,42)	0,482*	1(1,6)	1,5(1,9)	0,603*
miR-126	1,38(1,46)	1,54(1,09)	0,465*	1,2(1)	1,5(1,4)	0,542*
miR-146^a	0,94(1,22)	2,03(2,70)	0,357*	2(2,7)	1,1(1,5)	0,339*
miR-155	1,04(1,61)	1,12(1,15)	0,427*	0,8(1,0)	1,1(1,5)	0,670*
miR181	5,90(7,15)	10,86(13,99)	0,325*	1(0,8)	1,6(1,8)	0,737**
miR-223	3,49(4,57)	8,05(11,33)	0,172*	2,1(2,5)	4,3(6,1)	0,270*

* Teste T ** Teste de Mann-Whitney

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Dados na literatura apontam que o processo inflamatório parece ter relação com a gênese da HPB, se não como papel direto, levando ao aumento das células prostáticas, pelo menos na formação do meio ambiente propício ao desenvolvimento prostático. Em nossa casuística evidenciamos uma presença de prostatite histológica em 96% dos espécimes prostáticos avaliados. Dos 48 pacientes incluídos no estudo, 22 possuíam grau leve de prostatite e 24 possuíam grau intenso de prostatite, segundo análise anatomopatológica feita, usando como parâmetros de classificação o trabalho de Jacques Irani et al., 1997 (70). Não encontramos nenhuma diferença estatisticamente significativa na comparação entre os dados clínico-demográficos dos pacientes em relação aos graus de prostatite.

Diversas pesquisas da literatura têm relatado a grande importância dos miRNAs na regulação de uma série de processos biológicos, contribuindo tanto para o desenvolvimento, como para a regulação do sistema imune (72). Além da importância dos miRNAs na diferenciação das células do sistema imune, pesquisas indicam um papel relevante destas moléculas com o controle da resposta inflamatória (73). Dessa forma, nosso estudo teve como objetivo avaliar a expressão dos miRNAs 126, 146a, 155, 181 e 223, bem como das interleucinas 2, 6, 8 e 17, no processo inflamatório associado à HPB.

Considerando a expressão dos miRNAs estudados nos pacientes com HPB comparado ao grupo controle (tecido prostático sem nenhum grau de

prostatite), encontramos superexpressão dos miRNAs 155, 181 e 223, e uma expressão heterogênea dos miRNAs 126 e 146a.

Até o momento, existem vários estudos associando a expressão diferencial dos miRNAs no câncer de próstata, mas poucos artigos investigaram a regulação destas moléculas na HBP. Em nossa revisão da literatura, apenas dois estudos examinaram a expressão de miRNA na HBP e controles saudáveis, sendo um deles realizado por nosso grupo, onde encontramos a possível associação entre a expressão dos miRNAs 143 e 145 e a patogênese da HPB através da regulação de seus genes alvo (74, 75). Entretanto, ainda não foram realizados estudos envolvendo a expressão de microRNAs regulatórios do processo inflamatório associado à HPB.

O microRNA 126, especificamente nas células endoteliais, é capaz de modular a angiogênese in vivo, e sua deleção em ratos resulta em vazamento vascular, hemorragias e letalidade embrionária. Em estudo anterior realizado por nosso grupo, encontramos uma relação estatisticamente positiva do miRNA 126 com a presença de prostatite crônica histológica em pacientes com HPB (dados não publicados). No presente trabalho, este miRNA apresentou uma expressão anárquica nas amostras de pacientes portadores de HPB com prostatite comparado ao grupo controle. Entretanto, quando subdividimos os pacientes entre grau de prostatite leve e intensa, encontramos maior expressão do miR-126 nos pacientes com prostatite intensa ($p=0,040$). De acordo com os dados clínicos patológicos dos pacientes, encontramos maior expressão do miR-126 no grupo de pacientes que apresentaram PSA pós-operatório $<1\text{ng/ml}$ ($p=0,015$).

Al-Kafaji et al., identificou uma acentuada redução na expressão do miR-126 em amostras de sangue de pacientes câncer de próstata em comparação com amostras sanguíneas de pacientes com HPB (76). Isso nos faz supor, que a alta expressão deste miR pode estar associada ao processo inflamatório relacionado à gênese da HPB, o que foi corroborado pelos nossos achados de superexpressão em nossa casuística de pacientes com prostatite intensa.

Outro importante miRNA associado ao processo inflamatório é o miR-146a. Foi demonstrado uma maior expressão de miR-146, quando células eram estimuladas com lipopolissacarídeos bacterianos e citocinas, incluindo IL-1B e TNF-ALPHA (77). Este miRNA através da inibição de IRAK1 e TRAF6, também pode promover um feedback negativo na produção de IL 8 e IL 6, tendo assim um importante controle na resposta imune (78). Em um estudo que analisou a regulação da inflamação na retina de pacientes diabéticos, foi encontrado que a desregulação do nível diário de microRNA146 e sua diminuição no controle inflamatório tinha potencial implicações no desenvolvimento de retinopatia diabética (79).

Em nossa casuística, este miRNA apresentou expressão heterogênea com subexpressão em 52% das amostras de pacientes portadores de HPB com prostatite. Outro achado importante, foi a maior expressão deste miR nos pacientes com >65 anos ($p=0,01$). Em recente trabalho publicado por Nakamura et al. (80) foi demonstrado que a regulação positiva do miR-146a foi associada com à inflamação crônica da próstata de animais.

O miRNA 155, localizado no cromossomo 21, também possui importância na regulação dos processos inflamatórios (67). Em trabalho que avaliou o papel de tal microRNA no controle do processo inflamatório em pacientes portadores de artrite gotosa aguda, foi demonstrado que esse microRNA se encontrava super-regulado no líquido sinovial de pacientes portadores de gota, porém sua hiper-expressão estava associada ao desencadeamento da cascata de inflamação e na produção de pró-inflamatórias citocinas.

Em nosso trabalho este o miR-155 apresentou superexpressão na maioria das amostras dos pacientes portadores de HPB com prostatite. Quando comparamos a expressão deste miR de acordo com o grau de prostatite, observamos maior expressão no grupo de pacientes com prostatite intensa, porém sem significância estatística. Além disso, este miR apresentou maior expressão no grupo de pacientes com >65 anos ($p=0,05$) e com pacientes que apresentavam IMC $>25\text{kg/m}^2$ ($p=0,030$). Em trabalho conduzido por Guo et al. (81), avaliou o perfil de expressão do miR-155 em amostras de câncer de próstata e correlacionou com dados clínicos patológicos dos pacientes, tais como idade, IMC, volume tumoral, estadiamento, metástases linfonodais entre outras. Como resultado, encontraram maior expressão deste miR nos tumores em comparação com o tecido adjacente e essa expressão correlacionou-se positivamente com o estadiamento, volume tumoral e presença de metástase linfonodal. Em nosso trabalho também encontramos superexpressão do miR-155 em HPB, porém encontramos essa interessante

associação entre a expressão e os pacientes mais velhos e com maior IMC, que ainda não foi demonstrada na literatura.

Pesquisas *in vitro* já demonstraram que o miRNA 181 possui um papel importante na regulação do desenvolvimento de células T, bem como no controle da expressão de seus receptores (TCR) (66). O microRNA 181 tem se mostrado com um importante papel na resposta inflamatória. Sun et al., demonstraram que o miR-181 tem um importante papel na resposta inflamatória no endotélio celular, e que está envolvido na falência cardíaca crônica, devido a indivíduos idosos apresentarem uma reduzida expressão dos miR-181, facilitando uma desregulação do sistema imunológico (82).

Em nosso trabalho, o miR-181 apresentou superexpressão na maioria das amostras de pacientes portadores de HPB com prostatite. Nenhum trabalho na literatura avaliou a expressão do miR-181 especificamente na HPB. Em recente trabalho, Virtue et al. (83) demonstraram que a desregulação da expressão do miR-181 está associada ao desenvolvimento de inflamação, de obesidade e resistência à insulina em camundongos. Interessantemente, em nosso trabalho, encontramos maior expressão do miR-181 em pacientes que apresentavam prostatite intensa, que possuíam maior peso prostático, que eram mais velhos, que possuíam IMC elevado, que apresentavam hipertensão arterial, níveis de glicemia e colesterol elevados. Todas essas associações, embora sem significância estatística, apontam o importante papel do miR-181 na regulação do metabolismo e inflamação.

Em nosso trabalho encontramos superexpressão do miR-223 em 73% dos pacientes que possuíam prostatite associada a HPB. O miR- 223 tem se

revelado um importante regulador da resposta imunológica. Trabalhos em ratos mutantes mostraram que quando os receptores de miRNA 223 foram bloqueados, estes animais desenvolviam uma resposta inflamatória importante, principalmente nos pulmões; e uma destruição tecidual exuberante quando expostos a endotoxinas como LPS (lipopolissacarídeos) (68).

Este miRNA parece exercer uma regulação negativa na proliferação e diferenciação dos neutrófilos, exercida pela atuação no fator de transcrição Mef2c. Também foi demonstrado que o miR-223 é expresso apenas em neutrófilos e macrófagos e não por linfócitos e monócitos e isso se dá devido à regulação dos fatores de transcrição (84).

O papel deste miR associado à HPB ainda é pouco explorado. Entretanto, Sharova et al. (85) investigaram possíveis miRNAs que poderiam ser usados como marcadores de diagnóstico para o CaP. O mir-223 foi diferencialmente expresso entre as amostras de HPB e CaP, apresentando maior expressão nas amostras de pacientes com HPB. Em nosso trabalho, a expressão deste miR foi maior em pacientes que possuíam prostatite severa em comparação com prostatite leve, embora sem significância estatística. Dessa forma, acreditamos que o miR-223 possa ser importante para a gênese da HPB, possivelmente através dos mecanismos de regulação da inflamação.

Em relação às interleucinas analisadas em nosso trabalho, a IL2 e a IL6 apresentaram superexpressão na maioria das amostras de pacientes com HPB com presença de prostatite. Já a IL8 e a IL17 apresentam maior subexpressão nesses mesmos pacientes. De acordo com o grau de prostatite

e com os fatores clínicos patológicos, nenhuma interleucina apresentou correlação estatisticamente significativa.

A IL2 está relacionada à resposta imune e à promoção da proliferação e diferenciação de linfócitos T (86). Huang et al. (87) demonstraram que os níveis de expressão gênica e proteica de IL2 são significativamente maiores em amostras sanguíneas de pacientes com CaP e com HPB associada a prostatite em comparação com amostras de pacientes que possuíam apenas HPB. Em nosso trabalho encontramos também maior expressão desta interleucina em pacientes que possuíam algum grau de prostatite associado à HPB, em relação a pacientes sem prostatite.

A IL6 está associada ao desequilíbrio que ocorre entre o sistema nervoso, endócrino e imunológico que inicia um sinal de crescimento alterado do cérebro para a próstata, ocasionando efeitos adversos, como a inflamação (88). Foi demonstrado que existe uma maior expressão desta IL em pacientes portadores de HPB quando comparado a pacientes não portadores (89). Em nosso trabalho nós também demonstramos superexpressão da IL6 em pacientes com HPB com presença de prostatite. Quando subdividimos os pacientes de acordo com o grau de prostatite, encontramos maior expressão de IL6 em pacientes com prostatite intensa, porém sem significância estatística.

Alguns trabalhos já investigaram a relação da interleucina 8 com os tecidos prostáticos. Em um destes estudos, tecidos prostáticos eram tratados com solução recombinante de IL-8, que apresentou uma maior proliferação

do tecido estromal com epitelial da próstata, comparados com tecidos prostáticos sem a utilização da mesma interleucina (29).

Outro estudo avaliou o papel da IL8 como indutor da reação estromal da zona transicional da próstata. Foi demonstrado que existia uma maior expressão de IL8, em tecidos estromais na zona de transição da próstata, comparados com tecido prostático normal. Dessa forma conclui-se que a IL8 atua na promoção e regulação da proliferação estromal na HPB (90). Entretanto, em nossa casuística a IL8 apresentou um padrão de subexpressão nos pacientes com HPB com presença de prostatite. Além disso, quando subdividimos os pacientes de acordo com o grau de prostatite, esta interleucina foi mais expressa em amostras de pacientes que possuíam prostatite leve. Especulamos, que talvez a IL8 possa estar sendo regulada pelo miR-146a, uma vez que esse gene é alvo desse miR em outros tecidos. Entretanto para que se confirme tal suposição, são necessários ensaios funcionais.

Apesar da dificuldade técnica que tivemos para análise da IL17, nos pacientes onde conseguimos obter sua expressão, este gene apresentou-se predominantemente subexpresso nas amostras de HPB com prostatite. De forma contrária aos nossos resultados, Gao et al. (91), encontraram maior expressão gênica e proteica da IL17 em amostras de HPB com inflamação comparado a amostras de HPB apenas. Os autores inferem que a maior expressão de IL17 nos pacientes com HPB com inflamação pode estar associada ao desenvolvimento e progressão da HPB.

Vários trabalhos têm estudado a relação da síndrome metabólica com a HPB. Hammarsten e Peeker, 2011 publicaram o primeiro estudo prospectivo avaliando a relação do volume prostático e componentes individuais da síndrome metabólica em 158 homens com HPB, onde ficou elucidado que hipertensão arterial, obesidade, altos níveis de insulina e baixos níveis de colesterol HDL eram fatores de risco para o desenvolvimento de HPB (25).

Esse trabalho analisou os níveis de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, índice de massa corpórea e presença de hipertensão arterial, porém não encontramos diferenças estatísticas em relação a esses parâmetros e ao volume prostático, presença ou ausência de prostatite, bem como em relação aos graus de prostatite.

A compreensão da relação entre a síndrome metabólica e seus componentes e o desenvolvimento há HPB, seria de extrema importância na prevenção, diagnóstico e tratamento da doença, uma vez que esses fatores possuem caráter modificável, o que beneficiaria o controle de tal patologia.

Sabemos que a presença de testosterona e di-hidrotestosterona são fatores essenciais para o aumento da próstata, uma vez que a mesma não se desenvolve em pacientes com deficiência da 5-alfa-redutase e em eunucos (92). Em nosso trabalho avaliamos os níveis de testosterona total e estrógeno em relação aos graus de prostatite, porém não encontramos relação significativa.

Consideramos que o número de pacientes incluídos em nosso estudo foi relativamente pequeno. Entretanto, tentamos ser bem criteriosos quanto aos critérios de exclusão. Esse fato pode ter contribuído para a ausência de

significância estatística de acordo com o grau das prostatite e na avaliação dos parâmetros clínicos. Da mesma forma, a inclusão apenas de pacientes cirúrgicos restringe a aplicação destes dados para toda população de pacientes com HPB.

Do ponto de vista molecular, a análise do perfil proteico dos genes aqui estudados poderia fornecer melhor validação dos resultados analisados, assim como a realização das análises em um maior número de pacientes. Os ensaios funcionais *in vitro* também seriam importantes, uma vez que poderíamos controlar o processo inflamatório tecidual, expondo linhagens celulares precursoras de HPB em meio composto por células inflamatórias, bem como o controle dos microRNAs, para uma completa elucidação da relação dos microRNAs com o processo inflamatório e sua relação com o desenvolvimento da Hiperplasia Prostática.

Em resumo, a expressão desregulada dos miRNAs e dos genes aqui estudados, podem estar envolvidos no desenvolvimento do processo de prostatite e da HPB. Entretanto, o mecanismo específico dessa relação ainda precisa ser determinado e acreditamos que o presente estudo fornece bases para investigações adicionais sobre essa regulação.

6. CONCLUSÕES

Os microRNAs 126 e 146a apresentaram superexpressão nas amostras de HPB associada a prostatite, enquanto que os miRs 155, 181 e 223, apresentaram subexpressão. Em relação às interleucinas, a IL2 e a IL6 apresentaram superexpressão na maioria dos pacientes portadores de prostatite, enquanto que a IL8 e a IL17 apresentaram maior subexpressão nesse mesmo grupo de amostras.

Na comparação entre o nível de expressão dos genes e miRNAs e a grau de prostatite, encontramos associação significativamente estatística apenas para o miR-126 que apresentou maior expressão no grupo de pacientes com prostatite intensa.

De acordo com os fatores clínicos patológicos, encontramos que os miRNAs 146 a e 155 apresentam expressão significativamente maior em pacientes mais velhos, o miR-126 encontra-se mais expresso em pacientes que apresentam PSA pós-operatório <1ng/ml, o miR-155 apresentou maior expressão nos pacientes com IMC mais alto e a IL-8 se mostrou mais expressa nos pacientes com níveis menores de HDL.

7. REFERÊNCIAS

1. McVary KT. Clinical evaluation of benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol.* 2003;5 Suppl 4:S3-S11.
2. McVary KT. BPH: epidemiology and comorbidities. *Am J Manag Care.* 2006;12(5 Suppl):S122-8.
3. Lee KL, Peehl DM. Molecular and cellular pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 2004;172(5 Pt 1):1784-91.
4. St Sauver JL, Jacobsen SJ. Inflammatory Mechanisms Associated with Prostatic Inflammation and Lower Urinary Tract Symptoms. *Curr Prostate Rep.* 2008;6(2):67-73.
5. McNeal JE. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol.* 1978;15(4):340-5.
6. Bartsch G, Müller HR, Oberholzer M, Rohr HP. Light microscopic stereological analysis of the normal human prostate and of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 1979;122(4):487-91.
7. Deering RE, Bigler SA, King J, Choongkittaworn M, Aramburu E, Brawer MK. Morphometric quantitation of stroma in human benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 1994;44(1):64-70.
8. JE. M. Prostate In: Sternberg SS, ed. *Histology for pathologists.* . 2nd ed 1997.
9. FRANKS LM. Atrophy and hyperplasia in the prostate proper. *J Pathol Bacteriol.* 1954;68(2):617-21.
10. McNeal JE. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog Clin Biol Res.* 1984;145:27-53.
11. MAURÍCIO A. CHAGAS MAB, WALDEMAR S. COSTA., RONALDO DAMIÃO FJBS. STEREOLOGICAL ANALYSIS OF HISTOLOGIC COMPONENTS IN TRANSITION ZONE OF NORMAL AND HYPERPLASTIC HUMAN PROSTATES. 2001; 27:[26-31 pp.].
12. Mostofi FK PJE. *Tumors of the male genital system.* Washington: Army Forces Institute of Pathology 1973.
13. Marks LS, Treiger B, Dorey FJ, Fu YS, deKernion JB. Morphometry of the prostate: I. Distribution of tissue components in hyperplastic glands. *Urology.* 1994;44(4):486-92.
14. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol.* 1999;155(6):1985-92.
15. Tang J, Yang J. Etiopathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Indian J Urol.* 2009;25(3):312-7.
16. SCOTT WW. What makes the prostate grow. *J Urol.* 1953;70(3):477-88.
17. Vermeulen A, Deslypere JP, De Meirleir K. A new look to the andropause: altered function of the gonadotrophs. *J Steroid Biochem.* 1989;32(1B):163-5.
18. Partin AW, Oesterling JE, Epstein JI, Horton R, Walsh PC. Influence of age and endocrine factors on the volume of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 1991;145(2):405-9.
19. Walsh PC, Hutchins GM, Ewing LL. Tissue content of dihydrotestosterone in human prostatic hyperplasia is not supranormal. *J Clin Invest.* 1983;72(5):1772-7.
20. Steiner MS. Review of peptide growth factors in benign prostatic hyperplasia and urological malignancy. *J Urol.* 1995;153(4):1085-96.

21. Lucia MS, Lambert JR. Growth factors in benign prostatic hyperplasia: basic science implications. *Curr Urol Rep*. 2008;9(4):272-8.
22. Neuhouser ML, Schenk J, Song YJ, Tangen CM, Goodman PJ, Pollak M, et al. Insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3 and risk of benign prostate hyperplasia in the prostate cancer prevention trial. *Prostate*. 2008;68(13):1477-86.
23. Coffey DS, Walsh PC. Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am*. 1990;17(3):461-75.
24. McPherson SJ, Wang H, Jones ME, Pedersen J, Iismaa TP, Wreford N, et al. Elevated androgens and prolactin in aromatase-deficient mice cause enlargement, but not malignancy, of the prostate gland. *Endocrinology*. 2001;142(6):2458-67.
25. Hammarsten J, Peeker R. Urological aspects of the metabolic syndrome. *Nat Rev Urol*. 2011;8(9):483-94.
26. Golden SH, Robinson KA, Saldanha I, Anton B, Ladenson PW. Clinical review: Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the United States: a comprehensive review. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(6):1853-78.
27. Ozden C, Ozdal OL, Urgancioglu G, Koyuncu H, Gokkaya S, Memis A. The correlation between metabolic syndrome and prostatic growth in patients with benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol*. 2007;51(1):199-203; discussion 4-6.
28. Sidney S, Quesenberry C, Sadler MC, Lydick EG, Guess HA, Cattolica EV. Risk factors for surgically treated benign prostatic hyperplasia in a prepaid health care plan. *Urology*. 1991;38(1 Suppl):13-9.
29. Juniewicz PE, Berry SJ, Coffey DS, Strandberg JD, Ewing LL. The requirement of the testis in establishing the sensitivity of the canine prostate to develop benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1994;152(3):996-1001.
30. Lepor H. Pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol*. 2004;6 Suppl 9:S3-S10.
31. Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol*. 2005;40(3):121-8.
32. Lima H LF. Hiperplasia prostática benigna. *Urologia fundamental*2010.
33. Bianchi-Frias D, Vakar-Lopez F, Coleman IM, Plymate SR, Reed MJ, Nelson PS. The effects of aging on the molecular and cellular composition of the prostate microenvironment. *PLoS One*. 2010;5(9).
34. Wilson JD. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Am J Med*. 1980;68(5):745-56.
35. Kristal AR, Arnold KB, Schenk JM, Neuhouser ML, Weiss N, Goodman P, et al. Race/ethnicity, obesity, health related behaviors and the risk of symptomatic benign prostatic hyperplasia: results from the prostate cancer prevention trial. *J Urol*. 2007;177(4):1395-400; quiz 591.
36. Morrison AS. Prostatic hypertrophy in greater Boston. *J Chronic Dis*. 1978;31(5):357-62.
37. Akdogan M, Hassoun BS, Gurakar A, El-Sahwi K, Jazzar A, Wright H, et al. Prostate-specific antigen levels among cirrhotic patients. *Int J Biol Markers*. 2002;17(3):161-4.
38. Partin AW, Page WF, Lee BR, Sanda MG, Miller RN, Walsh PC. Concordance rates for benign prostatic disease among twins suggest hereditary influence. *Urology*. 1994;44(5):646-50.

39. Sanda MG, Beaty TH, Stutzman RE, Childs B, Walsh PC. Genetic susceptibility of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 1994;152(1):115-9.
40. Glynn RJ, Campion EW, Bouchard GR, Silbert JE. The development of benign prostatic hyperplasia among volunteers in the Normative Aging Study. *Am J Epidemiol.* 1985;121(1):78-90.
41. Wei JT, Calhoun E, Jacobsen SJ. Urologic diseases in America project: benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 2005;173(4):1256-61.
42. Rohrmann S, Smit E, Giovannucci E, Platz EA. Association between markers of the metabolic syndrome and lower urinary tract symptoms in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Int J Obes (Lond).* 2005;29(3):310-6.
43. Joseph MA, Harlow SD, Wei JT, Sarma AV, Dunn RL, Taylor JM, et al. Risk factors for lower urinary tract symptoms in a population-based sample of African-American men. *Am J Epidemiol.* 2003;157(10):906-14.
44. Parsons JK. Modifiable risk factors for benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms: new approaches to old problems. *J Urol.* 2007;178(2):395-401.
45. Parsons JK, Bergstrom J, Barrett-Connor E. Lipids, lipoproteins and the risk of benign prostatic hyperplasia in community-dwelling men. *BJU Int.* 2008;101(3):313-8.
46. Parsons JK, Kashefi C. Physical activity, benign prostatic hyperplasia, and lower urinary tract symptoms. *Eur Urol.* 2008;53(6):1228-35.
47. Di Silverio F, Gentile V, De Matteis A, Mariotti G, Giuseppe V, Luigi PA, et al. Distribution of inflammation, pre-malignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis. *Eur Urol.* 2003;43(2):164-75.
48. Herwig R, Mitteregger D, Djavan B, Kramer G, Margreiter M, Leers MP, et al. Detecting prostate cancer by intracellular macrophage prostate-specific antigen (PSA): a more specific and sensitive marker than conventional serum total PSA. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(6):430-7.
49. Nickel JC. Inflammation and benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 2008;35(1):109-15; vii.
50. Penna G, Fibbi B, Amuchastegui S, Cossetti C, Aquilano F, Laverny G, et al. Human benign prostatic hyperplasia stromal cells as inducers and targets of chronic immuno-mediated inflammation. *J Immunol.* 2009;182(7):4056-64.
51. Roehrborn C. Advances in the Treatment of Lower Urinary Tract Symptoms and Benign Prostatic Hyperplasia: Highlights from the 21st European Association of Urology Congress. *Reviews in Urology.* 2006;8.
52. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
53. Moss EG, Tang L. Conservation of the heterochronic regulator *Lin-28*, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Dev Biol.* 2003;258(2):432-42.
54. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-97.
55. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004;18(24):3016-27.

56. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, et al. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004;117(1):69-81.
57. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004;432(7014):235-40.
58. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85.
59. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-6.
60. Steiner GE, Newman ME, Paikl D, Stix U, Memaran-Dagda N, Lee C, et al. Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate. *Prostate*. 2003;56(3):171-82.
61. Carmell MA, Hannon GJ. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11(3):214-8.
62. Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*. 2004;10(3):544-50.
63. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2005;309(5740):1573-6.
64. Viana NI. O papel dos micros RNAs 143 e 145 e seus genes alvo na etiopatogenia da hiperplasia prostática benigna [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2012.
65. Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Res*. 2005;15(5):336-60.
66. Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*. 2007;129(1):147-61.
67. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(5):1604-9.
68. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 2008;451(7182):1125-9.
69. Barry MJ, Fowler FJ, O'leary MP, Bruskewitz RC, Holtgrewe HL, Mebust WK, et al. The American Urological Association Symptom Index for Benign Prostatic Hyperplasia. *J Urol*. 2017;197(2S):S189-S97.
70. Irani J, Levillain P, Goujon JM, Bon D, Doré B, Aubert J. Inflammation in benign prostatic hyperplasia: correlation with prostate specific antigen value. *J Urol*. 1997;157(4):1301-3.
71. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
72. Bi Y, Liu G, Yang R. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *J Cell Physiol*. 2009;218(3):467-72.
73. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):111-22.

74. Viana NI, Reis ST, Dip NG, Morais DR, Moura CM, Silva IA, et al. MicroRNAs 143 and 145 may be involved in benign prostatic hyperplasia pathogenesis through regulation of target genes and proteins. *Int J Biol Markers*. 2014;29(3):e246-52.
75. Haj-Ahmad TA, Abdalla MA, Haj-Ahmad Y. Potential Urinary Protein Biomarker Candidates for the Accurate Detection of Prostate Cancer among Benign Prostatic Hyperplasia Patients. *J Cancer*. 2014;5(2):103-14.
76. Al-Kafaji G, Said HM, Alam MA, Al Naieb ZT. Blood-based microRNAs as diagnostic biomarkers to discriminate localized prostate cancer from benign prostatic hyperplasia and allow cancer-risk stratification. *Oncol Lett*. 2018;16(1):1357-65.
77. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-6.
78. Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, Chan EK. miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34590-9.
79. Wang Q, Bozack SN, Yan Y, Boulton ME, Grant MB, Busik JV. Regulation of retinal inflammation by rhythmic expression of MiR-146a in diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(6):3986-94.
80. Nakamura N, Davis K, Yan J, Sloper DT, Chen T. Increased estrogen levels altered microRNA expression in prostate and plasma of rats dosed with sex hormones. *Andrology*. 2020.
81. Guo T, Wang XX, Fu H, Tang YC, Meng BQ, Chen CH. Early diagnostic role of PSA combined miR-155 detection in prostate cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22(6):1615-21.
82. Sun X, Sit A, Feinberg MW. Role of miR-181 family in regulating vascular inflammation and immunity. *Trends Cardiovasc Med*. 2014;24(3):105-12.
83. Virtue AT, McCright SJ, Wright JM, Jimenez MT, Mowel WK, Kotzin JJ, et al. The gut microbiota regulates white adipose tissue inflammation and obesity via a family of microRNAs. *Sci Transl Med*. 2019;11(496).
84. Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):514-20.
85. Sharova E, Grassi A, Marcer A, Ruggero K, Pinto F, Bassi P, et al. A circulating miRNA assay as a first-line test for prostate cancer screening. *Br J Cancer*. 2016;114(12):1362-6.
86. Huang L, Chen J, Hong B. [Down-regulation of TIPE2 promotes the proliferation and immune activity of T lymphocytes]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2016;32(7):886-90.
87. Huang TR, Wang GC, Zhang HM, Peng B. Differential research of inflammatory and related mediators in BPH, histological prostatitis and PCa. *Andrologia*. 2018.
88. Akbarian F, Abolhasani M, Dadkhah F, Asadi F, Ahangari G. Novel Insight into Differential Gene Expression and Clinical Significance of Dopamine Receptors, COMT, and IL6 in BPH and Prostate Cancer. *Curr Mol Med*. 2019;19(8):605-19.
89. Royuela M, Ricote M, Parsons MS, García-Tuñón I, Paniagua R, de Miguel MP. Immunohistochemical analysis of the IL-6 family of cytokines and their receptors in benign, hyperplastic, and malignant human prostate. *J Pathol*. 2004;202(1):41-9.

90. Schauer IG, Ressler SJ, Tuxhorn JA, Dang TD, Rowley DR. Elevated epithelial expression of interleukin-8 correlates with myofibroblast reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2008;72(1):205-13.
91. Gao R, Liu QX, Zhou HL, Cao LS, Jiang T, Tang SX, et al. [Expressions of interleukin-17 and interleukin-8 in the prostatic tissue of the patients with BPH or BPH with inflammation]. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2017;23(8):697-702.
92. Roper WG. The etiology of benign prostatic hypertrophy. *Med Hypotheses*. 1998;50(1):61-5.

Apêndice

American Urological Association (AUA) 2013 Annual Scientific Meeting



#1742



**Role of microRNAs in the regulation
of tissue inflammation in patients
with Benign Prostatic Hyperplasia:
Preliminary results.**

FABIO OLIVEIRA MD.

Laboratory of Medical Investigation, Urology Department – LIM-55
University of Sao Paulo Medical School