

**RODOLFO PACHECO DE MORAES**

**O papel dos marcadores MMP-9, TIMP-1, RECK e miR-338-3p no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata**

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

Programa de Urologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dra. Sabrina Thalita dos Reis  
Faria

**São Paulo**

**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Moraes, Rodolfo Pacheco de

O papel dos marcadores MMP-9, TIMP-1, RECK e miR338-3p no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata / Rodolfo Pacheco de Moraes. -- São Paulo, 2021.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientadora: Sabrina Thalita dos Reis Faria.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata 2.Biópsia  
guiada por imagem 3.Biomarcadores  
4.Metaloproteinases da matriz 5.Inibidores  
teciduais de metaloproteinases 6.MicroRNAs

USP/FM/DBD-067/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## Dedicatória

Aos meus pais, Américo e Alice, a base da minha vida, que auxiliaram na construção do meu caráter e que estão sempre dispostos a me apoiar;

À minha esposa, Édyla, que me fortalece e que ilumina meus caminhos todos os dias;

Por fim, ao meu filho Gabriel, que representa o melhor de mim, a minha grande razão de viver.

## **Agradecimentos**

À Prof<sup>a</sup>. Sabrina Reis, minha orientadora e grande líder, que me guiou nessa trajetória e que me deu segurança para prosseguir;

Ao Prof. Alberto Antunes, por quem tenho uma grande admiração e cuja trajetória serve de inspiração;

À Prof<sup>a</sup>. Kátia Ramos Leite, que coordena o LIM55 com brilhantismo e faz com que ele funcione como uma unidade indissociável;

A Nayara Viana, Ruan Pimenta, Gabriel Arantes, Vanessa Guimarães, Juliana Camargo e Iran Amorim, que sempre estiveram dispostos a me ajudar a entender o universo da Biologia Molecular e que foram fundamentais na execução da pesquisa e da tese;

A Elisa Cruz, que se dedica à pós graduação de forma exemplar e sempre está disposta a solucionar os nossos problemas.

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 figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Dados epidemiológicos	15
1.2 Fatores de risco	16
1.3 Diagnóstico	18
1.4 Fatores prognósticos	21
1.5 Outros marcadores de diagnóstico e prognóstico	26
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
<b>3 MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1 Pacientes	34
3.2 Biópsia prostática, análise histopatológica e coleta da urina	35
3.3 Coleta dos dados	36
3.4 Extração do RNA e do miRNA	36
3.5 Síntese do DNA complementar (cDNA)	37
3.6 Análise da expressão dos genes e do miRNA	38
3.7 ELISA	39
3.8 Variáveis	40
3.9 Análise estatística	40
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>41</b>
4.1 Análise de expressão dos genes MMP-9, TIMP-1, RECK e do miR-338-3p	42
4.2 Análise de expressão proteica	47
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>54</b>
5.1 Expressão dos genes e do miR-338-3p	56
5.2 Expressão proteica urinária	60

<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65

## Lista de abreviaturas

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

BP – Biópsia prostática

BTPUS – Biópsia transperineal da próstata guiada por ultrassonografia

BTRUS – Biópsia transretal da próstata guiada por ultrassonografia

CaP – Câncer de Próstata

cDNA – DNA complementar

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio de imun absorção enzimática

FDA – *Food and Drug Administration*

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

hK2 – Calicreína humana 2

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

HPB – Hiperplasia prostática benigna

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISUP – *International Society of Urological Pathology*

LIM55 – Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia da FMUSP

miR – microRNA

miRNA – microRNA

MMP – Metaloproteinase de matriz

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

p2PSA – pró-PSA

PCA3 – *Prostate cancer gene 3*

PHI – *Prostate Health Index*

PSA – Antígeno prostático específico

PTR – Prostatectomia radical

qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RECK – Proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínio Kazal

RM – Ressonância magnética

RNA – Ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro



TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinase

TR – Toque retal da próstata

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Incidência e mortalidade globais do CaP (extraída de Sung et al – 2021)	15
<b>Figura 2.</b> Distribuição dos 10 tipos mais frequentes de câncer estimados para cada ano do triênio 2020-2022 no Brasil excluindo o câncer de pele não-melanoma (extraída de Ministério da Saúde - INCA - Estimativa 2020). .....	16
<b>Figura 3.</b> Padrões histológicos do CaP: à esquerda, o diagrama original do sistema de classificação de Gleason; à direita, o diagrama esquemático ISUP Gleason modificado (extraída de Epstein et al – 2016) .....	24
<b>Figura 4.</b> Distribuição dos testes de qRT-PCR realizados para determinação da expressão tecidual de cada gene e miRNA.....	43
<b>Figura 5.</b> Distribuição dos pacientes portadores de CaP quanto à expressão gênica de MMP9, TIMP-1, RECK e do miR338-3p em amostras de tecido prostático.....	45
<b>Figura 6.</b> Distribuição dos testes de ELISA realizados para determinação da expressão urinária de cada proteína. ....	48

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Definição histológica do novo sistema de classificação do CaP – ISUP (2014).....	22
<b>Tabela 2.</b> Classificação TNM para o CaP de acordo com o <i>American Joint Committee on Cancer</i> (AJCC) – 8ª edição. ....	23
<b>Tabela 3.</b> NCCN Guidelines versão 1.2021 - CaP - Estratificação de risco para doença clinicamente localizada.....	26
<b>Tabela 4.</b> Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes submetidos a análise de expressão gênica e do miR-338-3p em tecido prostático proveniente de BTRUS.....	44
<b>Tabela 5.</b> Comparação da expressão gênica e do miR-338-3p em amostras teciduais de próstata de pacientes com diagnóstico de CaP.....	46
<b>Tabela 6.</b> Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes submetidos a análise de expressão proteica urinária dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e RECK.....	49
<b>Tabela 7.</b> Comparação da expressão proteica urinária dos marcadores MMP-9, RECK e TIMP-1 entre pacientes com e sem diagnóstico de CaP.....	50
<b>Tabela 8.</b> Comparação da expressão proteica urinária da MMP-9 entre pacientes com e sem diagnóstico de CaP por idade e valores do PSA. ....	51
<b>Tabela 9.</b> Comparação da expressão proteica urinária do TIMP-1 entre pacientes com e sem diagnóstico de CaP por idade e valores do PSA. ....	51
<b>Tabela 10.</b> Comparação da expressão proteica urinária da RECK entre pacientes com e sem diagnóstico de CaP por idade e valores do PSA. ....	52
<b>Tabela 11.</b> Comparação da expressão proteica urinária dos marcadores MMP-9 RECK e TIMP-1 em pacientes com diagnóstico de CaP entre os grupos prognósticos. ....	53

## Resumo

Moraes RP. *O papel dos marcadores MMP-9, TIMP-1, RECK e miR-338-3p no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021

**INTRODUÇÃO:** O câncer de próstata (CaP) é a segunda neoplasia maligna mais diagnosticada na população masculina. Embora a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) seja universalmente aceita nos protocolos de rastreamento do CaP e como fator prognóstico, este marcador apresenta algumas limitações, sendo responsável por um número grande de biópsias prostáticas desnecessárias. Novos marcadores biológicos com a intenção de aumentar a acurácia no diagnóstico da doença clinicamente significativa vêm sendo buscados. A metaloproteinase de matriz tipo 9 (MMP-9) tem sido implicada no processo de desenvolvimento e de progressão de alguns tipos de cânceres. Alguns inibidores endógenos da MMP-9, dentre eles o inibidor tecidual de metaloproteinase tipo 1 (TIMP-1), a proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínio Kazal (RECK) e o microRNA 338-3p (miR-338-3p), por outro lado, têm sido estudados como possíveis fatores protetores. O objetivo do estudo foi avaliar o papel da MMP-9 e de seus reguladores (TIMP-1, RECK e miR-338-3p) para o diagnóstico e prognóstico do CaP. **MÉTODOS:** Foram selecionados 134 pacientes submetidos a biópsia transretal da próstata guiada por ultrassonografia para análise de expressão tecidual pelo método de qRT-PCR (61 casos x 73 controles); destes pacientes, foram selecionados 90 (45 casos e 45 controles) para análise de expressão proteica em amostras de urina pelo método de ELISA. **RESULTADOS:** Quanto à expressão tecidual dos genes e miRNA, aproximadamente 58% dos pacientes foram superexpressos para MMP-9, enquanto 73%, 65% e 69% foram subexpressos para TIMP-1, RECK e miR-338-3p, respectivamente. O miR-338-3p apresentou menor expressão nos pacientes com nível de PSA > 20ng/mL ( $p=0,045$ ) e toque retal anormal ( $p = 0,006$ ), enquanto o RECK teve uma maior expressão nos pacientes com toque retal anormal ( $p = 0,01$ ) e TIMP-1 foi mais expresso nos pacientes do grupo 5 da *International Society of Urological Pathology* (ISUP) ( $p = 0,01$ ). Não foi identificada diferença estatística nos níveis das proteínas MMP-9, TIMP-1 e RECK em amostras urinárias entre casos e controles, com nível de expressão para MMP-9 de  $1,78 \pm 1,00$  versus  $1,45 \pm 0,98$ ;  $p=0,130$  (casos versus controles). **CONCLUSÃO:** Encontramos um perfil de superexpressão para MMP-9 e de subexpressão para TIMP-1, RECK e miR-338-3p em amostras de tecido prostático de pacientes com CaP. Observamos uma maior expressão urinária da proteína MMP-9 nos pacientes portadores de CaP. Não pudemos definir de forma consistente esses perfis de expressão como fatores prognósticos.

**Descritores:** Câncer de próstata; Biópsia guiada por imagem; Marcadores biológicos; Metaloproteinases de matriz; Inibidores teciduais de metaloproteinases; MicroRNA

## Summary

Moraes RP. *The role of MMP-9, TIMP-1, RECK, and miR-338-3p for the diagnosis and prognosis of prostate cancer*. [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

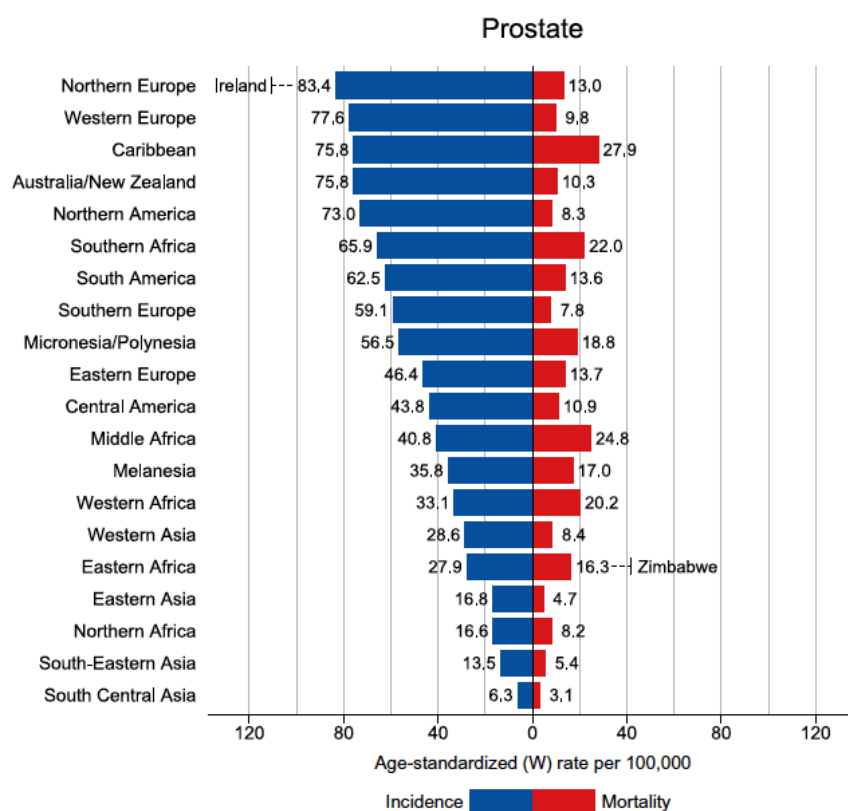
**INTRODUCTION:** Prostate cancer (PCa) is the second most frequent malignancy found in men worldwide. Although the level of prostate specific antigen (PSA) is universally accepted for PCa screening and prognostic definition, it has some limitations and has found to be responsible for a large number of unnecessary prostate biopsies. New biomarkers aiming to increase the accuracy for the diagnosis of clinically significant disease are being continually researched. The matrix metalloproteinase type 9 (MMP-9) protein has been implicated in the process of development and progression of some types of cancers. On the other hand, some endogenous inhibitors for MMP-9, including the tissue inhibitor of metalloproteinase type 1 (TIMP-1), the reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK), and the microRNA-338-3p (miR-338-3p), have been studied as possible protective factors. The aim of the study was to evaluate the role of MMP-9 and its regulators (TIMP-1, RECK, and miR-338-3p) for the diagnosis and prognosis of PCa. **METHODS:** One hundred thirty-four patients submitted to a transrectal ultrasound-guided prostate biopsy were selected for analysis of tissue expression using the real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) method (61 cases, 73 controls); of these patients, 90 (45 cases and 45 controls) were selected for analysis of protein expression in the urine using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. **RESULTS:** As for tissue expression of genes and miRNA, approximately 58% of patients with PCa presented overexpressed MMP-9, while 73%, 65%, and 69% had underexpressed TIMP-1, RECK, and miR-338-3p, respectively. MiR-338-3p was expressed to a lesser degree in patients with PSA level > 20 ng/mL ( $p = 0.045$ ) and abnormal digital rectal examination ( $p = 0.006$ ), while RECK was expressed to a higher level in patients with abnormal digital rectal examination ( $p = 0.01$ ), and TIMP-1 was expressed to a higher level in patients in the grade group 5 of the International Society of Urological Pathology (ISUP) ( $p = 0.01$ ). No statistical differences were identified in the levels of MMP-9, TIMP-1, and RECK proteins in urine between cases and controls with an MMP-9 expression level of  $1.78 \pm 1.00$  versus  $1.45 \pm 0.98$ ;  $p = 0.130$  (cases versus controls). **CONCLUSION:** We found an overexpression profile for MMP-9 and an underexpression profile for TIMP-1, RECK, and miR-338-3p in prostatic tissue from patients with PCa. We observed a higher urinary expression of the MMP-9 protein in patients with PCa. We were unable to consistently define these expression profiles as prognostic factors.

**Descriptors:** Prostate cancer; Image-guided biopsy; Biomarkers; Matrix metalloproteinases; TIMP proteins; MicroRNA

# 1. INTRODUÇÃO


## 1.1 Dados epidemiológicos

O câncer de próstata (CaP) é a segunda neoplasia maligna mais diagnosticada na população masculina, sendo a mais comum nos países mais desenvolvidos. Norte Europeu, Europa Ocidental, Caribe e Nova Zelândia/Austrália são as regiões com as maiores taxas; as menores são encontradas na Ásia (Figura 1). Em 2020, foram estimados 1.414.259 novos casos de CaP em todo o mundo, o que representa 7,3% de todos os cânceres em homens <sup>(1)</sup>.



**Figura 1.** Incidência e mortalidade globais do CaP (extraída de Sung *et al* – 2021)

No Brasil, é o câncer mais comum entre os homens em todas as regiões, excluindo o câncer de pele não melanoma. Estimam-se 65.840 novos casos desta neoplasia para cada ano do triênio 2020-2022, correspondendo a um risco estimado de 62,95 novos casos a cada 100 mil homens (Figura 2). A Região Nordeste é a que apresenta um maior risco estimado (72,35/100 mil) enquanto a Região Norte é a que apresenta o menor risco (29,39/100 mil) <sup>(2)</sup>.

Localização Primária	Casos	%	
Próstata	65.840	29,2%	Homens 
Cólon e reto	20.520	9,1%	
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	
Estômago	13.360	5,9%	
Cavidade oral	11.180	5,0%	
Esôfago	8.690	3,9%	
Bexiga	7.590	3,4%	
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	
Laringe	6.470	2,9%	
Leucemias	5.920	2,6%	

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 2.** Distribuição dos 10 tipos mais frequentes de câncer estimados para cada ano do triênio 2020-2022 no Brasil excluindo o câncer de pele não-melanoma (extraída de Ministério da Saúde - INCA - Estimativa 2020).

## 1.2 Fatores de risco

A etiologia do CaP é multifatorial e ainda não totalmente conhecida. Alguns fatores de risco são reconhecidos: idade, história familiar, etnia, tabagismo, obesidade, fatores dietéticos, além de fatores genéticos como mutações em genes de reparo do DNA (*BRCA1* e *BRCA2*, entre outros) <sup>(2, 3)</sup>.



O risco de desenvolver a doença aumenta consideravelmente após os 50 anos de idade para os pacientes de cor branca e sem história familiar da doença; para os pacientes de cor negra e com história familiar, esse risco começa a aumentar aos 40 anos. Achados incidentais de CaP em idades inferiores a 30 anos foram demonstrados em estudos a partir de autópsias, com aumento das taxas de prevalência a cada década de vida <sup>(3, 4)</sup>.

Pacientes com história positiva para CaP em pai ou um irmão apresentam um risco de desenvolver a doença 1,8 vezes maior que os que não apresentam história familiar; nos homens com o pai e um irmão acometidos, esse risco aumenta para 5,5 vezes, enquanto aqueles com 2 irmãos acometidos apresentam risco 7,7 vezes maior <sup>(5, 6)</sup>.

Homens afro-americanos, quando comparados a homens brancos, geralmente desenvolvem o CaP em idades mais jovens, além de apresentarem doença com maior risco de progressão e de necessidade de tratamento definitivo <sup>(7)</sup>.

Além dos fatores já citados, fatores dietéticos também são relacionados ao desenvolvimento do CaP ou a um pior prognóstico da doença. Dietas ricas em proteína, gordura e carne vermelha são alguns dos fatores relacionados <sup>(8)</sup>. Por sua vez, o aumento no índice de massa corpórea aumenta o risco de mortalidade pelo CaP, assim como a chance de desenvolver recidiva bioquímica <sup>(9)</sup>.

Os defeitos nos genes de reparo do DNA, já bem estabelecidos como fatores de risco para os cânceres ginecológicos, vêm sendo reconhecidos nos últimos anos como fatores de risco para o desenvolvimento do CaP, além de conferirem um pior

prognóstico para a doença (maior risco de progressão e morte), em especial defeitos no gene *BRCA2* <sup>(10, 11)</sup>.

### 1.3 Diagnóstico

O diagnóstico do CaP depende da confirmação histopatológica a partir da biópsia da próstata (BP) guiada por ultrassonografia, seja ela por via transretal (BTRUS) ou transperineal (BTPUS), indicada nos casos de suspeita da neoplasia (elevação do antígeno prostático específico (PSA) e/ou toque retal da próstata (TR) alterado) <sup>(12, 13)</sup>.

A busca por antígenos prostáticos para finalidades diversas (estudo do CaP, da infertilidade, como prova forense) data do início dos anos 1960s, mas apenas no ano de 1980 o PSA foi identificado em amostras de sangue de pacientes com CaP metastático <sup>(14)</sup>. Sua utilização na prática clínica no início dos anos 1980s revolucionou a história do CaP devido ao aumento da sua taxa de detecção, responsável pelo aumento da incidência desta neoplasia que ocorreu neste período <sup>(15)</sup>.

O PSA é uma serina protease produzida especificamente pelas células epiteliais do tecido prostático, cuja concentração pode estar elevada em inúmeras condições, dentre elas a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o CaP. Aproximadamente 90% dos pacientes com idade igual ou superior a 50 anos apresentam níveis de PSA abaixo de 4,0ng/mL, valor frequentemente utilizado como ponto de corte para a realização da BP <sup>(16)</sup>.

A dosagem do PSA apresenta sensibilidade de aproximadamente 20% e especificidade de 60 a 94% para o diagnóstico do CaP utilizando como ponto de corte um nível de 4ng/mL. Uma tentativa de aumentar a sensibilidade do método com a redução do limite do valor do PSA aceitável pode, no entanto, reduzir a sua especificidade e elevar a chance de detecção de doença clinicamente insignificante (17, 18).

Contudo, alguns artifícios podem ser utilizados com a intenção de aumentar a especificidade do exame sem comprometer a sua sensibilidade (relação PSA livre/ PSA total, densidade do PSA (PSA/ volume da glândula), velocidade de aumento do PSA, além do ajuste dos valores para a idade) (17).

Apesar dessas manobras utilizadas para melhorar sua especificidade, o PSA permanece como um marcador falho para o diagnóstico do CaP. Fórmulas matemáticas que levam em consideração os valores do PSA e de suas isoformas (*Prostate Health Index* (PHI) e 4Kscore) têm mostrado resultados superiores aos obtidos com a dosagem do PSA total e de sua fração livre, com redução no número de biópsias e de tratamentos desnecessários (19).

O PHI é um marcador composto que leva em consideração o PSA total, a fração livre do PSA e o [-2] pro-PSA (p2PSA) como parte de uma fórmula matemática. Quanto maior o ponto de corte utilizado para indicação da BP, menor a chance de resultados negativos, assim como menor é a chance de diagnóstico de doença clinicamente insignificante (20, 21).

O 4Kscore é um teste que associa a quantificação de 4 caliceínas (PSA total, PSA livre, PSA intacto e caliceína humana 2 (hK2)) a dados clínicos como idade,

achados do exame do TR e história de biópsia prévia. Quanto maior o ponto de corte utilizado, maior o número de biópsias evitadas. A utilização de um ponto de corte de 7,5% é capaz de evitar 32,2% das biópsias, com retardo no diagnóstico de doença clinicamente significativa em 4,8% dos casos (grupos 2 ou 3 da *International Society of Urological Pathology* (ISUP)) (22, 23).

O exame do TR, por sua vez, apresenta uma sensibilidade de 51% para o diagnóstico do CaP e uma especificidade de 59%, com valor preditivo positivo de 41% e valor preditivo negativo de 64% (24).

A BTRUS é um procedimento invasivo que apresenta taxas de até 30% de falha em detectar o CaP (25). A BTPUS, embora também represente um procedimento invasivo, tem conferido menores taxas de complicações, além de uma maior possibilidade de diagnóstico de lesões anteriores e menor taxa de *upgrading* pós prostatectomia radical (PTR) (13).

A realização da ressonância magnética (RM) multiparamétrica da próstata com protocolos específicos para a detecção da doença, utilizada para orientar a BP, pode aumentar as taxas de detecção de doença clinicamente significativa e reduzir as taxas de detecção de doença clinicamente insignificante (26, 27).

Apesar do benefício incontestável deste método de imagem para orientar tanto a indicação quanto a execução do procedimento de BP, há uma grande variabilidade interobservador nos resultados, principalmente em centros com menor experiência em sua realização (28).

Várias são as complicações relacionadas à BP como dor, hematúria (até 84%), sangramento retal (até 45%), hemospermia (até 92,6%), sintomas do trato urinário

inferior (até 25%), retenção urinária aguda (até 6%) e infecção do trato urinário (até 17,5%). Embora sejam altas as taxas de complicações associadas, menos de 4% dos pacientes submetidos ao procedimento necessitarão ser hospitalizados <sup>(29)</sup>.

Com a utilização da BP orientada pela RM, também é possível reduzir de forma expressiva estas taxas de complicações devido à redução no número de fragmentos prostáticos obtidos por este método quando comparado à BP sistemática padrão <sup>(30)</sup>.

#### **1.4 Fatores prognósticos**

O prognóstico da doença depende basicamente do grau de diferenciação histológica (escore de Gleason / Grupo ISUP) (Tabela 1) <sup>(31)</sup>, do seu estágio tumoral (classificação TNM) (Tabela 2) <sup>(32)</sup>, e do nível do PSA.

**Tabela 1.** Definição histológica do novo sistema de classificação do CaP – ISUP (2014).

<b>Grupo 1</b>	Escore de Gleason 6	Apenas glândulas bem formadas discretas
<b>Grupo 2</b>	Escore de Gleason 3+4=7	Glândulas predominantemente bem formadas com menor componente de glândulas malformadas/fundidas/cribriformes
<b>Grupo 3</b>	Escore de Gleason 4+3=7	Glândulas predominantemente malformadas/fundidas/cribriformes com menor componente de glândula bem formada *
<b>Grupo 4</b>	Escore de Gleason 8 (4+4, 3+5, 5+3)	Apenas glândulas malformadas/fundidas/cribriformes; Glândulas predominantemente bem formadas e componente menor sem glândulas ** ou Predominantemente ausência de glândulas e menor componente de glândulas bem-formadas **
<b>Grupo 5</b>	Escore de Gleason 9-10	Ausência de formação de glândula (ou com necrose) com ou sem glândulas mal formadas / fundidas / cribriformes *

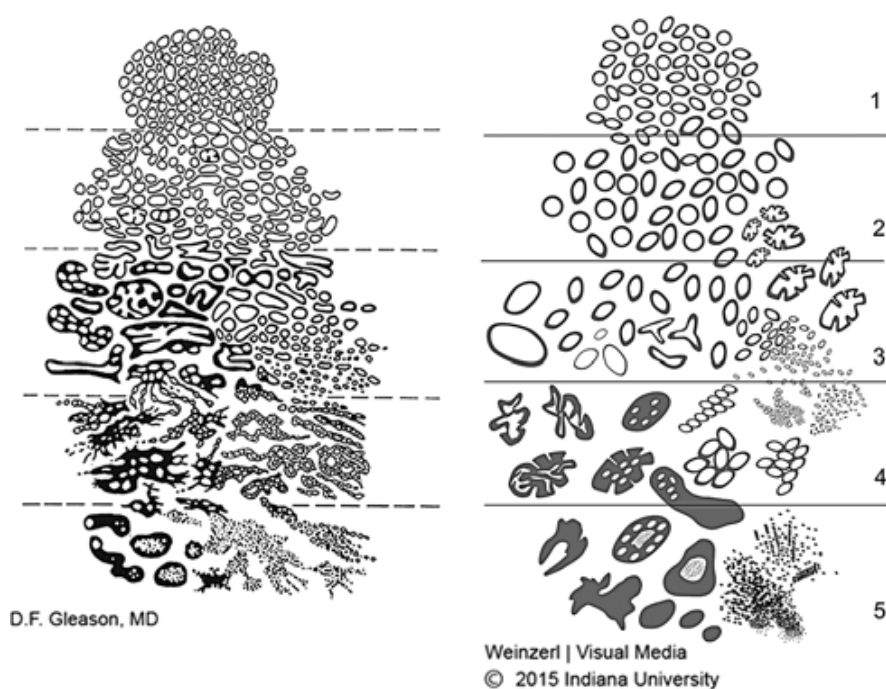
\*Para casos com > 95% de glândulas malformadas / fundidas / cribriformes ou falta de glândulas em uma biópsia por agulha ou em prostatectomia radical, o componente <5% de glândulas bem formadas não é considerado no grau.

\*\*Glândulas malformadas / fundidas / cribriformes podem ser um componente menor.

**Tabela 2.** Classificação TNM para o CaP de acordo com o *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* – 8ª edição.

<b>Categoria</b>	<b>Critério</b>
<b>Clínico (cT)</b>	
<b>Categoria T</b>	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor clinicamente inaparente, não palpável
T1a	Achado de tumor incidental em 5% ou menos do tecido ressecado
T1b	Achado de tumor incidental em mais que 5% do tecido ressecado
T1c	por agulha, encontrado em 1 ou ambos lados, porém não palpável
T2	Tumor palpável e confinado à próstata
T2a	Tumor envolve metade ou menos de um dos lados
T2b	Tumor envolve mais da metade de um dos lados, mas não os dois lados
T2c	Tumor envolve os dois lados
T3	Tumor extraprostático que não é fixo ou não envolve estruturas adjacentes
T3a	Extensão extraprostática (unilateral ou bilateral)
T3b	Tumor invade uma ou ambas vesículas seminais
T4	Tumor fixo ou invade estruturas adjacentes outras que não as vesículas seminais, como esfíncter externo, reto, bexiga, músculo elevador, e/ou parede pélvica
<b>Patológico (pT)</b>	
<b>Categoria T</b>	
T2	Órgão confinado
T3	Extensão extraprostática
T3a	Extensão extraprostática (unilateral ou bilateral) ou invasão microscópica do colo vesical
T3b	Tumor invade uma ou ambas vesículas seminais
T4	Tumor fixo ou invade estruturas adjacentes outras que não as vesículas seminais, como esfíncter externo, reto, bexiga, músculo elevador, e/ou parede pélvica
<b>Categoria N</b>	
Nx	Linfonodos regionais não foram avaliados
N0	Ausência de linfonodos regionais positivos
N1	Metástases em linfonodos regionais
<b>Categoria M</b>	
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Metástases à distância
M1a	Linfonodos não regionais
M1b	Ossos
M1c	Outros sítios com ou sem doença óssea

O escore de Gleason foi um sistema de classificação histológica para o câncer de próstata publicado por Donald F. Gleason em 1966 a partir do estudo de espécimes de BP por agulha, de ressecção transuretral da próstata e de PTR de 270 pacientes. Foram propostos 5 padrões ou graus, onde o escore final correspondia ao somatório dos dois padrões mais frequentes. Essa classificação proposta sofreu algumas modificações nos quase 50 anos seguintes, dando origem em 2014 ao sistema atualmente utilizado pela ISUP (Tabela 1) (Figura 3) <sup>(31, 33)</sup>.



**Figura 3.** Padrões histológicos do CaP: à esquerda, o diagrama original do sistema de classificação de Gleason; à direita, o diagrama esquemático ISUP Gleason modificado (extraída de Epstein et al – 2016)



De acordo com estes parâmetros (TNM, escore de Gleason / Grupo ISUP) e PSA), a *European Association of Urology* estratifica os pacientes como riscos baixo, intermediário e alto para recidiva bioquímica na doença localizada ou localmente avançada<sup>(6)</sup>.

Risco baixo seriam considerados os pacientes com tumores cT1-T2a, escore de Gleason até 6 (grupo ISUP 1) e PSA menor que 10 ng/mL; risco intermediário, aqueles com tumores cT2b, escore de Gleason igual a 7 (grupos ISUP 2 e 3) e PSA de 10 a 20 ng/mL (pelo menos 1 dos critérios, na ausência de critério de alto risco); risco alto, quando apresentarem tumores cT2c-T4, presença de linfonodos acometidos (N+), escore de Gleason maior ou igual a 8 (grupos ISUP 4 e 5) e PSA maior que 20 ng/mL (pelo menos 1 critério)<sup>(12)</sup>.

Em uma análise retrospectiva, onde foram avaliados pacientes submetidos a PTR como forma de tratamento para o câncer de próstata, foi observado que os pacientes com riscos baixo, intermediário e alto apresentaram taxas de sobrevida livre de recidiva bioquímica em cinco anos de 96,5, 88,9 e 72,6%, respectivamente. Dentre os pacientes de risco intermediário, apenas o TR alterado foi fator de risco para recidiva bioquímica<sup>(34)</sup>.

Por sua vez, o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), apresenta um sistema de classificação para doença clinicamente localizada um pouco mais complexo que distribui os pacientes em riscos muito baixo, baixo, intermediário (favorável e desfavorável), alto e muito alto (Tabela 3)<sup>(35)</sup>.

**Tabela 3.** NCCN Guidelines versão 1.2021 - CaP - Estratificação de risco para doença clinicamente localizada.

<b>Grupo de risco</b>	<b>Características clínicas/patológicas</b>		
<b>Muito baixo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T1c, e</li> <li>• ISUP 1, e</li> <li>• PSA &lt;10ng/mL, e</li> <li>• Até 3 fragmentos de próstata positivos, ≤50% câncer em cada fragmento, e</li> <li>• Densidade do PSA &lt;0,15ng/mL/g</li> </ul>		
<b>Baixo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T1-T2a, e</li> <li>• ISUP 1, e</li> <li>• PSA &lt;10ng/mL</li> </ul>		
<b>Intermediário</b>	<p>Não tem qualquer característica de alto ou muito alto risco, e tem 1 ou mais características de risco intermediário (CRI)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• T2b-T2c</li> <li>• ISUP 2 ou 3</li> <li>• PSA 10-20ng/mL</li> </ul>	<b>Intermediário favorável</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 CRI, e</li> <li>• ISUP 1 ou 2, e</li> <li>• &lt;50% dos fragmentos positivos</li> </ul>
		<b>Intermediário desfavorável</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 ou 3 CRI</li> <li>• ISUP 3</li> <li>• ≥50% dos fragmentos positivos</li> </ul>
<b>Alto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T3a, ou</li> <li>• ISUP 4 ou 5, ou</li> <li>• PSA &gt;20ng/mL</li> </ul>		
<b>Muito alto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• T3b-T4, ou</li> <li>• Gleason primário 5, ou</li> <li>• 2 ou 3 características de alto risco</li> <li>• &gt; 4 fragmentos ISUP 4 ou 5</li> </ul>		

### 1.5 Outros marcadores de diagnóstico e prognóstico

Considerando que o câncer é um produto de descontrole de vias moleculares envolvidas com a proliferação, sobrevivência, morte celular programada, relação epitélio-

estroma, escape da vigilância imune, entre outros fatores, marcadores moleculares têm sido propostos para uso clínico.

O *prostate cancer gene 3 (PCA3)*, é um gene que transcreve um longo RNAm não codificante, que tem sua expressão aumentada em tecido de CaP. Este teste é um escore calculado a partir da concentração do RNAm do PCA3 em relação ao RNAm do PSA, obtida por uma reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) a partir de amostra de urina coletada após massagem prostática <sup>(36)</sup>.

Foi aprovado pela *Food and Drug Administration (FDA)* em 2012 com o objetivo de auxiliar na decisão de repetir a biópsia prostática nos pacientes com 1 ou mais biópsias prévias negativas <sup>(36)</sup>. Apresenta sensibilidade de 63% e especificidade de 74% quando utilizado o escore de 35 como ponto de corte <sup>(37)</sup>.

Uma das principais etapas desempenhadas pelas células neoplásicas dos tumores sólidos no processo de carcinogênese é a invasão dos tecidos adjacentes, que é possível graças à degradação de barreiras teciduais como a membrana basal e a matriz extracelular. Um grande grupo de enzimas proteolíticas, as metaloproteinases de matriz (MMPs), desempenha um papel importante nesse processo <sup>(38, 39)</sup>.

Na família das MMPs, a metaloproteinase de matriz tipo 2 (MMP-2) (gelatinase A) e a metaloproteinase de matriz tipo 9 (MMP-9) (gelatinase B) têm sido implicadas no processo de desenvolvimento e de progressão de alguns tipos de câncer como próstata, bexiga, colorretal e pulmão, devido à capacidade que apresentam de degradar o colágeno tipo IV e a gelatina, que são os principais componentes da membrana basal <sup>(39, 40)</sup>.

A atividade das MMPs é regulada por inibidores endógenos. Primeiramente estão os quatro inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), onde cada um consiste em um domínio N-terminal responsável pela atividade inibitória da MMP, e um domínio C-terminal. Embora todas os TIMPs liguem-se firmemente à maioria das MMPs, eles possuem diferentes atividades inibitórias contra diferentes MMPs, sendo a MMP-9 principalmente regulada pelo TIMP-1 <sup>(39, 41)</sup>.

Entretanto existem outros inibidores de MMP, dentre eles a proteína RECK (proteína indutora de reversão rica em cisteína com domínio Kazal), que é uma glicoproteína de ancoragem em membranas celulares, cuja estrutura é diferente dos TIMPs, expressa em vários tecidos normais, mas não identificada em células derivadas de tumores. A RECK inibe MMP-9, 2 e 14, funcionando também como um regulador estrutural do processo de renovação (turnover) da matriz extracelular. A RECK inibe a MMP-9 de dois modos: supressão da sua secreção e direta inibição de sua atividade enzimática. Durante o processo de transformação celular, a expressão do gene RECK é inibida, liberando MMP-9, contribuindo assim para o comportamento invasivo de células cancerosas <sup>(42-44)</sup>.

Nos últimos anos, vários estudos foram publicados envolvendo a expressão gênica das MMPs e de seus reguladores. No CaP, nosso grupo avaliou a expressão do gene da MMP-9 e esta foi, em média, 9,2 vezes maior no CaP quando comparada à HPB, enquanto que a expressão dos genes TIMP-1 e RECK mostrou ser, em média, 7,5 e 8 vezes menor, respectivamente <sup>(45)</sup>. Por sua vez, a expressão proteica da MMP-9 foi positiva em 91,4% dos pacientes com CaP, enquanto a expressão proteica do TIMP-1 foi negativa em 52,1 dos pacientes com CaP. Adicionalmente, a

imunoexpressão do TIMP-1 foi associada a menores taxas de recorrência bioquímica<sup>(39)</sup>.

Uma classe de moléculas reguladoras vem sendo bastante estudada na atualidade, os microRNAs (miRNA ou miR). Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas, não codificadoras de proteínas, de fita simples, constituídas por 19-25 nucleotídeos que fazem parte de uma nova classe de potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida do RNA mensageiro alvo. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis proteicos, podendo também afetar a nível transcricional<sup>(46)</sup>. Evidências têm demonstrado que a expressão alterada desses miRNAs está associada à carcinogênese, às metástases e à progressão tumoral<sup>(47, 48)</sup>.

Dentre os miRNAs estudados, o miR-338-3p regula negativamente o RNAm e níveis proteicos de MMP-9 em células de câncer de fígado, suprimindo a invasão celular<sup>(49)</sup>. Sua expressão se encontra diminuída em tecidos de carcinoma de pulmão não-pequenas células e essa expressão reduzida está relacionada a um pobre grau de diferenciação do tumor, a um estágio patológico avançado e a metástases linfonodais<sup>(50)</sup>. Da mesma forma, a redução de sua expressão está associada ao desenvolvimento do câncer de hipofaringe e a um pior prognóstico da doença<sup>(51)</sup>.

Baseados nestas evidências, resolvemos avaliar o papel da MMP-9 e de seus reguladores (TIMP-1, RECK e miR-338-3p) no diagnóstico do CaP, utilizando amostras teciduais provenientes de BTRUS e também amostras de urina destes mesmos pacientes. Também os avaliamos como possíveis fatores prognósticos para a progressão da doença. A identificação de proteínas, genes, e miRNAs

diferencialmente expressos pelas células tumorais prostáticas por métodos como Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) ou qRT-PCR permitiria a sua utilização na prática clínica demonstrando o potencial translacional de nosso trabalho.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Analisar o perfil de expressão tecidual dos genes MMP-9, TIMP-1, RECK e do miR-338-3p e de expressão proteica urinária da MMP-9, do TIMP-1 e da RECK em pacientes submetidos a BTRUS

## **2.2 Objetivos específicos**

Comparar a expressão tecidual dos genes MMP-9, TIMP-1 e RECK e do miR-338-3p entre os pacientes em que a biópsia foi positiva e negativa para CaP.

Avaliar o papel dos genes MMP-9, TIMP-1 e RECK e do miR-338-3p teciduais como possíveis fatores prognósticos para a progressão do CaP.

Comparar a expressão proteica urinária da MMP-9, do TIMP-1 e da RECK entre os pacientes em que a biópsia foi positiva e negativa para CaP.

Avaliar o papel das proteínas MMP-9, TIMP-1 e RECK na urina como possíveis fatores prognósticos para a progressão do CaP.



### **3. MÉTODOS**

### 3.1 Pacientes

Foram incluídos pacientes submetidos a BTRUS pelos critérios convencionais adotados pelo Serviço de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) que concordaram em participar do estudo e em ser submetidos à BP com um mínimo de representação de 12 fragmentos no período de 15/07/2015 a 29/07/2016.

Pacientes com história de cirurgia prostática prévia, uso de medicações antiandrogênicas ou submetidos a radioterapia pélvica não foram considerados para análise.

Do total de pacientes submetidos à BTRUS, foram selecionados aleatoriamente um número de pacientes compatível com a quantidades de kits disponíveis para as análises moleculares: 134 para a análise de expressão gênica e do miR-338-3p teciduais pelo método de qRT-PCR (61 casos e 73 controles); 90 para a análise de expressão proteica urinária pelo método de ELISA (45 casos e 45 controles).

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o nº 2.001.800.

Foi proposta a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que se justificou pela utilização de amostras coletadas em projeto maior “Estudo de biomarcadores séricos e urinários diagnósticos do câncer de próstata” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP sob o nº 1.446.169, considerando que a pesquisa em pauta constitui braço do mesmo.

### **3.2 Biópsia prostática, análise histopatológica e coleta da urina**

A BTRUS foi realizada no Instituto de Radiologia do HCFMUSP, os fragmentos fixados em formol foram processados habitualmente, incluídos em parafina e analisados por patologistas do Departamento de Patologia do HCFMUSP. Um fragmento adicional foi enviado para análise molecular ao Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Urologia (LIM55) também da FMUSP. A escolha deste fragmento foi aleatória e, mesmo nos pacientes em que a biópsia foi positiva para CaP, não houve a análise histopatológica do fragmento para certificar se a amostra continha células neoplásicas. Desta forma, pretendíamos verificar a expressão tecidual dos genes e miRNA em pacientes portadores de CaP e não em fragmentos de CaP.

Os pacientes foram submetidos a uma massagem prostática por 10 segundos e a seguir foram coletados de 20 a 30 mL de urina, sendo estas amostras enviadas para o LIM55 para análise pelo método de ELISA.

Nosso estudo consistiu inicialmente na análise das amostras destes pacientes que foram encaminhadas e armazenadas no LIM55 após randomização; posteriormente, no levantamento dos dados clínicos, demográficos e patológicos a partir dos registros dos pacientes.

### 3.3 Coleta dos dados

Os dados clínicos, demográficos e patológicos foram coletados a partir dos registros dos pacientes no LIM55 e do sistema de prontuário eletrônico do HCFMUSP.

### 3.4 Extração do RNA e do miRNA

Para a extração do RNA e do miRNA dos tecidos foi utilizado o kit de isolamento miRVana®miRNA (Ambion, Austin, Tx), de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA, incluindo os miRNAs, e por isso o utilizamos para a extração do RNA das células.

A preparação das amostras dos tecidos frescos foi realizada em gelo e de maneira mais rápida possível para prevenir a degradação por proteases. Foram adicionados 500µL do tampão de lise (10 vezes o volume da massa tecidual), e 10% do volume total de aditivo para homogeneização na linhagem celular e, logo após, os tubos foram colocados em gelo por 10 minutos. Foram adicionados 500µL de fenol clorofórmio, e as amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas na velocidade máxima (10.000g) por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo onde foi adicionado um terço do volume de etanol a 100% a temperatura ambiente. A solução então foi passada para o filtro (coluna GFX) e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. Neste momento o filtro contém RNA.

Nos filtros com o RNA, foram realizadas lavagens com solução própria do kit, intercaladas com centrifugações. Após o descarte do filtrado, centrifugamos por mais 1 min a 10.000g para secagem da coluna. As colunas foram então repassadas para um novo tubo e então adicionamos 100µL de água livre de RNase pré-aquecida a 95°C no centro da coluna. Após 1 min a temperatura ambiente, o RNA foi centrifugado e armazenado a -20°C até sua utilização.

A pureza e concentração do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND1000, Wilmington, EUA) (260/280nm).

### **3.5 Síntese do DNA complementar (cDNA)**

O cDNA do miRNA foi obtido usando o kit TaqMan® miRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA). Uma quantidade de miRNA foi diluído em H<sub>2</sub>O livre de nuclease em um volume final de 20µL e concentração de 500ng/µL. Deste volume, 3µL foram submetidos a transcrição reversa, onde foram adicionados 7µL de mix contendo os reagentes do kit: 0,15µL de DNTP mix, 0,5µL da enzima transcriptase reversa, 1,5µL do tampão da enzima, 0,19µL de inibidor de RNase, 3,66µL de água livre de nuclease e 1µL de primer stem-loop com sequência específica para o miRNA, totalizando 10µL de cDNA. A reação foi realizada em equipamento PCR Veriti® (Applied Biosystem, 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® (AppliedBiosystems) que utiliza a transcriptase reversa Multiscribe™ e primers randômicos. O RNA total foi diluído em H<sub>2</sub>O livre de nuclease em um volume final de 20µL e concentração de 500ng/µL. A este volume, foram acrescentados 4µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6µL do mix de dNTPs (25X), 4µL do tampão da enzima (10X), 2µL da enzima transcriptase reversa e 8,4µL de água livre de nuclease. A solução foi submetida a ciclos de temperaturas (25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min) no termociclador Veriti® (AppliedBiosystems). Ao final das reações os cDNAs foram armazenados a -20 °C até o uso.

### 3.6 Análise da expressão dos genes e do miRNA

A expressão dos genes e do miRNA estudados foi realizada por qRT-PCR usando o sistema ABI 7500 Fast no modo *standard*, com utilização de Master Mix PCR Taqman Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os *primers* utilizados para amplificação do miRNA e dos genes foram adquiridos da Applied Biosystems (California, EUA). Como controle endógeno dos genes e do miRNA utilizamos o gene  $\beta$ 2-microglobulina (B2M) e o RNA nucleolar RNU48, respectivamente. Os níveis de expressão dos genes e do miRNA foram obtidos através da quantificação relativa dos níveis de expressão determinados pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### 3.7 ELISA

O primeiro passo para a realização da técnica de ELISA é fazer a diluição do padrão do marcador. O padrão foi reconstituído com tampão diluente conforme instrução do fabricante. Esta reconstituição levou por volta de 10 minutos. O segundo passo foi a diluição seriada do padrão do kit. Essa diluição seriada funciona como um controle do método. Ao final da leitura, se os marcadores padrões apresentarem um perfil desejado de acordo com o requerido pelo kit utilizado, é sinal de que a técnica está correta. Após a diluição do padrão, adicionamos na placa 100  $\mu$ L das amostras-padrão e de urina de cada paciente em duplicata e o processo foi conduzido conforme os protocolos convencionais.

Basicamente, a placa foi tampada e incubada por 2 horas a 37°C. Após este tempo, o líquido da placa foi removido e os poços foram secos em papel toalha e então foram adicionados 100  $\mu$ L de biotina conjugada e as amostras foram incubadas por mais 2 horas a 37°C. Novamente o líquido da placa foi removido e os poços foram secos em papel toalha e a placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem. Então, adicionamos 100  $\mu$ L de avidina-HRP e a placa foi incubada por 60 min a temperatura de 37°C. Após este período, o líquido da placa foi removido, os poços foram secos em papel toalha e lavamos mais 5 vezes com a solução de lavagem do kit, secamos e adicionamos 90  $\mu$ L de cromógeno estabilizado que também ficou incubado por 23 minutos a 37°C no escuro. Após este período adicionamos 50  $\mu$ L de *stop solution*, e por fim, fizemos a leitura em leitor de ELISA a 450 nm

### 3.8 Variáveis

Foram consideradas as variáveis idade, nível de PSA, escore de Gleason, grupo ISUP e resultado do TR para as análises comparativas. A idade foi estratificada em <60 anos, 60-70 anos e >70 anos; o PSA, em <10ng/mL, 10-20ng/mL e >20ng/mL; o grupo ISUP, em 1-5; o TR, como normal ou suspeito; já o escore de Gleason, em 6, 7 e >7. Adicionalmente, agrupamos os escores de Gleason 7 e >7 em apenas um grupo com a intenção de comparar a doença clinicamente insignificante (escore de 6) com a doença clinicamente significativa (escore  $\geq 7$ ).

### 3.9 Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizados os softwares STATA/SE®12.0 e Microsoft Excel®2010. Todos os testes foram aplicados com 95% de confiança. Para verificar a existência de associação entre as variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui-Quadrado. Para as variáveis quantitativas, foi aplicado o teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação entre dois grupos foram utilizados o Teste t Student (distribuição normal) e Mann-Whitney (não normal); para comparação entre mais de 2 grupos foram utilizados os testes de ANOVA (distribuição normal) e Kruskal-Wallis (não normal).



## **4. RESULTADOS**

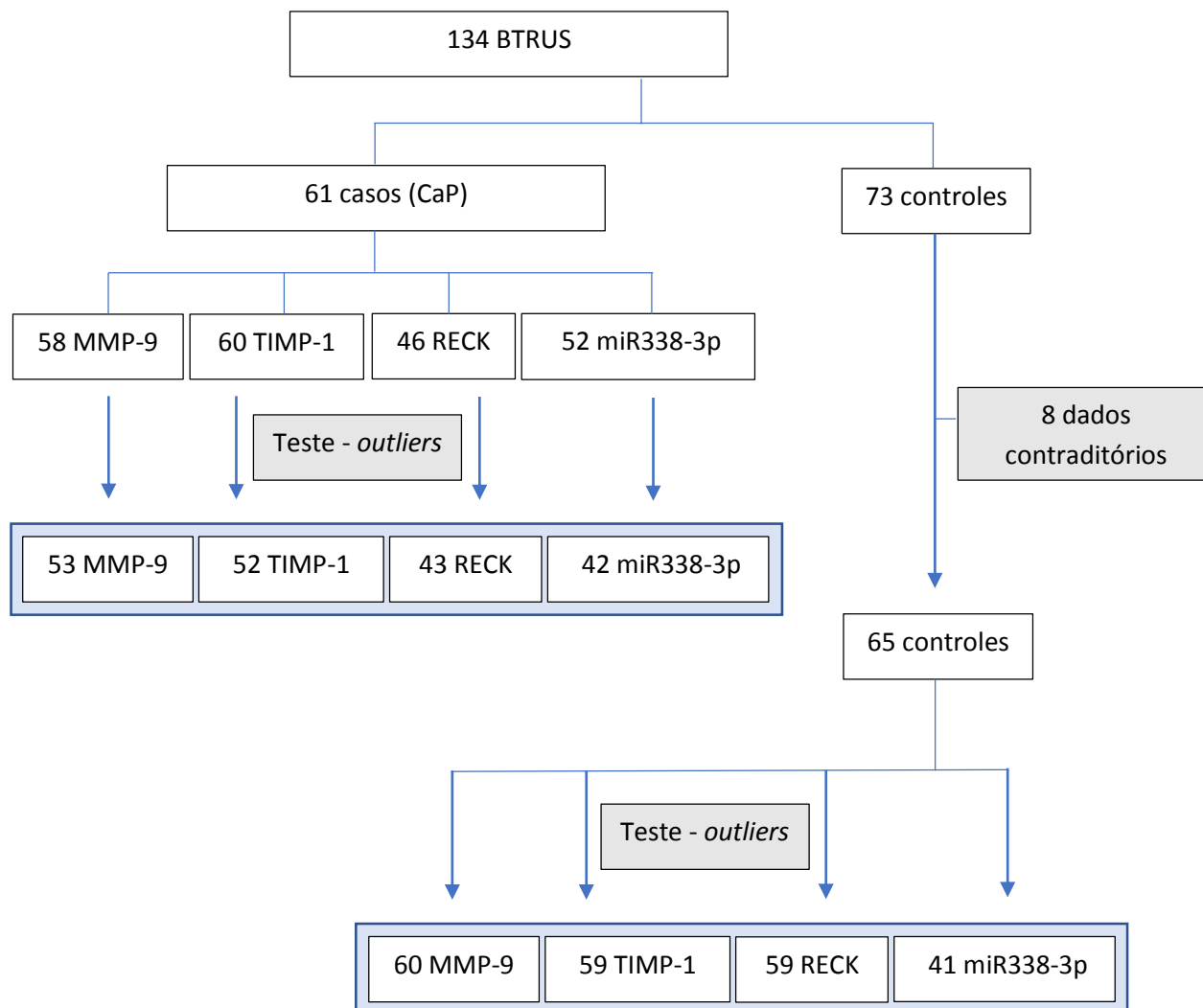
#### 4.1 Análise de expressão dos genes MMP-9, TIMP-1, RECK e do miR-338-3p

No total, 134 pacientes submetidos a BTRUS tiveram as amostras teciduais submetidas a análise de expressão gênica pelo método de qRT-PCR para MMP-9, TIMP-1, RECK e miR-338-3p, dos quais 61 apresentavam diagnóstico de CaP (casos), e 73 tinham estudo negativo para a neoplasia (controles).

Dos pacientes do grupo controle, 8 foram excluídos da análise após análise dos prontuários: 4 por terem diagnóstico prévio de CaP e estarem em vigilância ativa; 2 por terem diagnosticado a doença em re-biópsia; 2 submetidos a cirurgia para tratamento da HPB, cujo histopatológico foi positivo para CaP.

Dos 61 pacientes com diagnóstico de CaP, apenas 58 foram analisados para MMP-9, 60 para TIMP-1, 46 para RECK e 52 para miR-338-3p, de acordo com a disponibilidade de kits e de tecido prostático viável no fragmento da biópsia. Após utilização de teste para identificação de *outliers*, adicionalmente foram excluídos 5 pacientes da análise da MMP-9, 8 da TIMP-1, 3 da RECK e 10 do miR3-38-3p.

A distribuição dos testes realizados está descrita na figura 4.



**Figura 4.** Distribuição dos testes de qRT-PCR realizados para determinação da expressão tecidual de cada gene e miRNA.

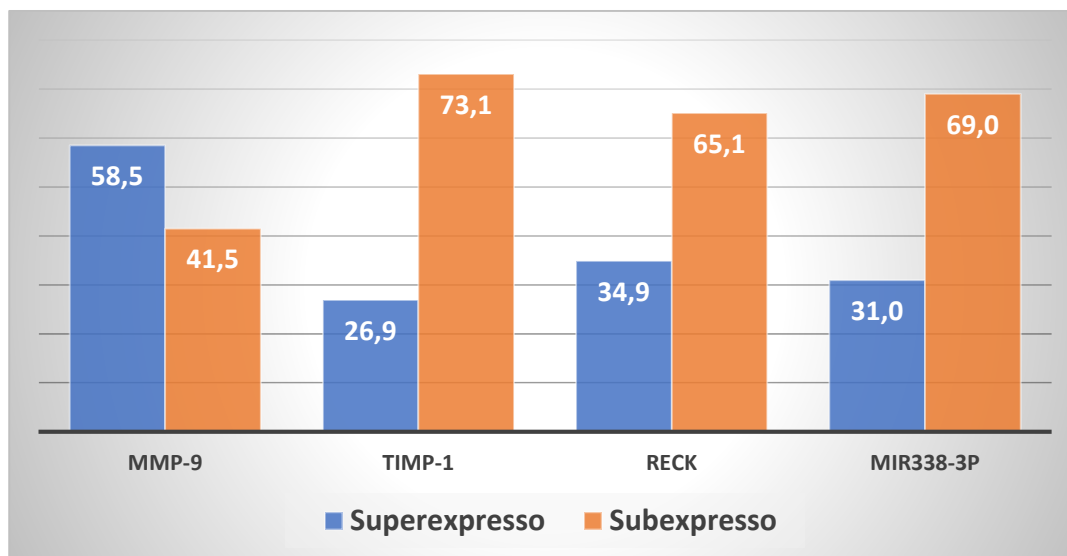
Os grupos de casos e controles foram homogêneos quanto à idade e aos valores do PSA, com a maior proporção de pacientes com CaP situados na faixa etária maior que 70 anos e PSA <10ng/mL. Quase metade dos pacientes apresentavam escore de Gleason 6. Os dados clínicos e demográficos estão apresentados na tabela 4.

**Tabela 4.** Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes submetidos a análise de expressão gênica e do miR-338-3p em tecido prostático proveniente de BTRUS.

Variáveis	Grupo		p-valor
	Com doença n (%)	Sem Doença n (%)	
<b>Idade (anos)</b>			
<60	13 (21,3)	12 (18,5)	0,167 *
60-70	22 (36,1)	34 (52,3)	
>70	26 (42,6)	19 (29,2)	
<b>PSA (ng/mL)</b>			
<10	40 (69,0)	39 (60,0)	0,262 *
10-20	9 (15,5)	18 (27,7)	
>20	9 (15,5)	8 (12,3)	
<b>Gleason</b>			
6	29 (47,5)	---	---
7	20 (32,8)	---	---
>7	12 (19,7)	---	---
<b>Gleason</b>			
6	29 (47,5)	---	---
≥ 7	32 (52,5)	---	---
<b>ISUP</b>			
1	29 (50,0)	---	---
2	14 (24,1)	---	---
3	3 (5,2)	---	---
4	7 (12,1)	---	---
5	5 (8,6)	---	---
<b>Toque retal</b>			
Normal	37 (75,5)	32 (78,0)	0,777 *
Suspeito	12 (24,5)	9 (22,0)	
	<b>Média ± DP</b>	<b>Média ± DP</b>	
Idade	67,66 ± 8,73	65,69 ± 6,85	0,165 **
PSA	26,81 ± 106,94	10,24 ± 8,46	0,570 ***

(\*) Qui-Quadrado (\*\*) t Student (\*\*\*) Mann-Whitney

Na análise da expressão tecidual dos genes e do miR-338-3p, observamos que um percentual maior dos pacientes com CaP apresentaram superexpressão de MMP-9 e subexpressão para TIMP-1, RECK e miR-338-3p em relação ao grupo controle (Figura 5).



**Figura 5.** Distribuição dos pacientes portadores de CaP quanto à expressão gênica de MMP9, TIMP-1, RECK e do miR338-3p em amostras de tecido prostático.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos valores de expressão gênica da MMP-9 em relação às variáveis avaliadas (idade, PSA, escore de Gleason, grupo ISUP e TR). Em relação à idade, a expressão foi maior no grupo de pacientes com idade superior a 70 anos, quando comparada a pacientes com idade de 60 a 70 anos e menor que 60 anos ( $p= 0,16$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Comparação da expressão gênica e do miR-338-3p em amostras teciduais de próstata de pacientes com diagnóstico de CaP.

Variáveis	MMP9	TIMP1	RECK	miR-338-3p
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
<b>Idade (anos)</b>				
<60	1,60 ± 1,82	0,63 ± 0,34	0,77 ± 0,75	1,48 ± 1,19
60-70	1,66 ± 1,60	0,75 ± 0,66	0,91 ± 0,73	1,11 ± 1,58
>70	2,76 ± 2,49	0,73 ± 0,52	0,96 ± 0,81	0,95 ± 1,14
p-valor	0,160 *	0,852 *	0,876 *	0,668 **
<b>PSA (ng/mL)</b>				
<10	2,02 ± 2,01	0,76 ± 0,54	0,82 ± 0,70	1,04 ± 1,13
10-20	1,41 ± 1,86	0,52 ± 0,56	0,90 ± 0,88	2,28 ± 1,92
>20	2,92 ± 2,65	0,84 ± 0,63	1,19 ± 0,86	0,41 ± 0,66
p-valor	0,404 *	0,480 *	0,491 *	<b>0,045 **</b>
<b>Gleason</b>				
6	2,33 ± 1,91	0,65 ± 0,53	0,71 ± 0,69	0,93 ± 1,30
7	2,04 ± 2,47	0,61 ± 0,39	0,97 ± 0,75	1,43 ± 1,27
>7	1,54 ± 1,98	1,05 ± 0,70	1,31 ± 0,79	1,02 ± 1,50
p-valor	0,624 *	0,093 *	0,126 *	0,139 **
<b>Gleason</b>				
6	2,33 ± 1,91	0,65 ± 0,53	0,71 ± 0,69	0,93 ± 1,30
≥ 7	1,87 ± 2,29	0,77 ± 0,55	1,12 ± 0,77	1,28 ± 1,34
p-valor	0,431 ¥	0,428 ¥	0,078 ¥	0,247 €
<b>ISUP</b>				
1	2,33 ± 1,91	0,65 ± 0,53	0,71 ± 0,69	0,93 ± 1,30
2	2,19 ± 2,57	0,66 ± 0,41	1,06 ± 0,85	1,51 ± 1,36
3	2,89 ± 3,29	0,50 ± 0,13	1,10 ± 0,74	1,98 ± 1,20
4	0,56 ± 0,46	0,66 ± 0,59	0,99 ± 0,74	1,33 ± 1,64
5	3,50 ± 2,55	1,63 ± 0,34	1,71 ± 0,75	0,08 ± 0,10
p-valor	0,284 *	<b>0,010 *</b>	0,167 *	0,084 **
<b>Toque retal</b>				
Normal	2,11 ± 2,19	0,68 ± 0,48	0,84 ± 0,66	1,58 ± 1,50
Suspeito	2,69 ± 2,29	1,05 ± 0,65	1,59 ± 0,81	0,39 ± 0,66
p-valor	0,483 ¥	0,091 ¥	<b>0,010 ¥</b>	<b>0,006 ¥</b>

(\*) ANOVA (\*\*) Kruskal-Wallis (¥) t Student (€) Mann-Whitney

Em relação à TIMP-1, a expressão gênica foi maior no grupo de pacientes do grupo ISUP 5 quando comparada aos demais grupos (1 a 4) ( $p=0,01$ ). Houve uma tendência a maior expressão nos pacientes com escore de Gleason > 7 quando

comparado aos pacientes com escores 6 e 7, porém não foi alcançada a significância estatística ( $p=0,093$ ). O mesmo foi observado nos pacientes com TR suspeito em relação aos que apresentavam TR normal ( $1,05 \pm 0,65$  versus  $0,68 \pm 0,48$ ;  $p=0,091$ ) (Tabela 5).

Quanto à proteína RECK, não foi observada diferença de expressão gênica em relação a idade, PSA, escore de Gleason e grupo ISUP, embora tenha havido uma tendência a maior expressão nos pacientes com doença clinicamente significativa levando em consideração o grau histológico (escore de Gleason  $\geq 7$  versus 6) ( $p=0,078$ ). Por sua vez, pacientes com TR suspeito apresentaram expressão maior comparada aos pacientes com o exame normal ( $1,58 \pm 1,50$  versus  $0,39 \pm 0,66$ ,  $p=0,006$ ) (Tabela 5).

O miR-338-3p mostrou ser menos expresso nos pacientes com nível de PSA  $> 20\text{ng/mL}$  quando comparados aos que tinham PSA de  $10\text{-}20\text{ng/mL}$ . Também foi menos expresso nos pacientes com TR suspeito. Não houve diferença estatisticamente significativa na sua expressão quando avaliadas as variáveis idade, escore de Gleason e grupo ISUP (erro alfa limítrofe para o grupo ISUP) (Tabela 5).

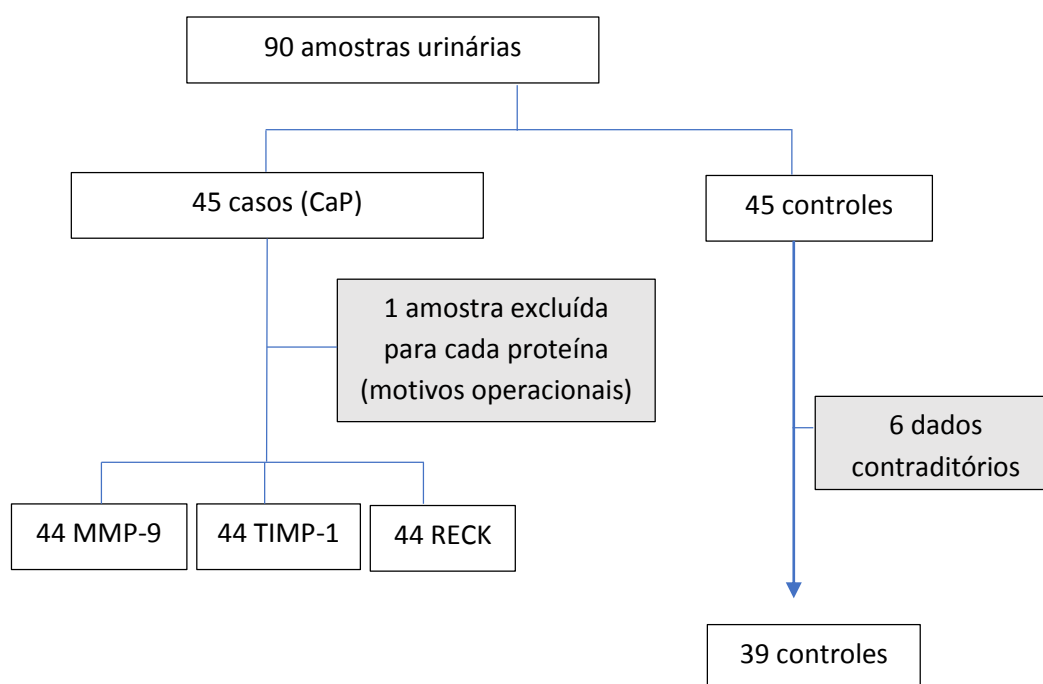
#### **4.2 Análise de expressão proteica**

No total, 90 pacientes submetidos a BTRUS foram incluídos para análise de expressão proteica de amostras urinárias pelo método de ELISA para MMP-9, TIMP-

1 e RECK, dos quais 45 apresentavam diagnóstico de CaP (casos), e 45 tinham estudo histopatológico negativo para a neoplasia (controles).

Após análise dos prontuários eletrônicos, 6 pacientes do grupo de controles foram excluídos do estudo (3 tinham diagnóstico prévio de CaP e estavam em vigilância ativa, 2 foram positivos para CaP na re-biópsia, e 1 foi positivo no pós-operatório de cirurgia para HPB). Por questões operacionais (número de testes disponíveis), 1 paciente do grupo de casos foi excluído aleatoriamente da análise para cada proteína.

A distribuição dos testes realizados está descrita na Figura 6.



**Figura 6.** Distribuição dos testes de ELISA realizados para determinação da expressão urinária de cada proteína.

Casos e controles foram homogêneos quanto à idade. Proporcionalmente, um número maior de pacientes apresentou TR suspeito no grupo de casos quando



comparados aos controles ( $p=0,078$ ). Por sua vez, os pacientes com CaP tiveram uma tendência a apresentar maiores valores de PSA ( $p=0,087$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes submetidos a análise de expressão proteica urinária dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e RECK.

Variáveis	Grupo		p-valor
	Casos n (%)	Controles n (%)	
<b>Idade (anos)</b>			
<60	9 (20,0)	7 (17,9)	0,267 *
60-70	19 (42,2)	23 (59,0)	
>70	17 (37,8)	9 (23,1)	
<b>PSA (ng/mL)</b>			
<10	28 (66,7)	27 (69,2)	0,283 *
10-20	5 (11,9)	8 (20,5)	
>20	9 (21,4)	4 (10,3)	
<b>Gleason</b>			
6	26 (57,8)	---	---
7	10 (22,2)	---	---
>7	9 (20,0)	---	---
<b>Gleason</b>			
6	26 (57,8)	---	---
≥ 7	19 (42,2)	---	---
<b>ISUP</b>			
1	26 (59,1)	---	---
2	7 (15,9)	---	---
3	2 (4,5)	---	---
4	5 (11,4)	---	---
5	4 (9,1)	---	---
<b>Toque retal</b>			
Normal	16 (61,5)	24 (82,8)	0,078 *
Suspeito	10 (38,5)	5 (17,2)	
	<b>Média ± DP</b>	<b>Média ± DP</b>	
<b>Idade</b>	67,47 ± 8,84	64,87 ± 5,85	0,122 **
<b>PSA</b>	34,03 ± 125,30	9,70 ± 9,17	0,087 ***

(\*) Qui-Quadrado (\*\*) t Student (\*\*\*) Mann-Whitney

Aproximadamente 2/3 dos pacientes estudados apresentavam PSA <10ng/mL. Dos pacientes com diagnóstico de CaP, mais da metade foi classificada como Gleason 6 (Tabela 6).

A média das expressões proteicas da MMP-9 e da RECK foram maiores no grupo de casos, enquanto do TIMP-1 foi menor nesse grupo, porém sem significância estatística (erro alfa de 13% para a MMP-9) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Comparação da expressão proteica urinária dos marcadores MMP-9, RECK e TIMP-1 entre pacientes com e sem diagnóstico de CaP.

Variáveis	Grupo		p-valor
	Com doença Média ± DP	Sem Doença Média ± DP	
MMP9	1,78 ± 1,00	1,45 ± 0,98	0,130 *
TIMP 1	1,37 ± 1,27	1,59 ± 1,21	0,311 **
RECK	0,49 ± 0,74	0,47 ± 0,85	0,642 **

(\*) t Student (\*\*) Mann-Whitney

Não houve diferença estatisticamente significativa das médias das expressões da MMP-9 em amostras de urina entre os grupos de casos e controles quando analisadas para cada categoria de idade e valor do PSA, no entanto, houve uma tendência a maior expressão da MMP-9 no grupo de pacientes com CaP que apresentavam PSA >20ng/mL (Tabela 8).

**Tabela 8.** Comparação da expressão proteica urinária da MMP-9 entre pacientes com e sem diagnóstico de CaP por idade e valores do PSA.

Variáveis	MMP9		p-valor
	Com doença Média ± DP	Sem Doença Média ± DP	
<b>Idade (anos)</b>			
<60	1,44 ± 1,11	1,38 ± 0,98	0,957 *
60-70	1,95 ± 1,03	1,44 ± 0,97	0,108 **
>70	1,79 ± 0,93	1,54 ± 1,11	0,609 *
<b>PSA (ng/mL)</b>			
<10	1,61 ± 0,96	1,33 ± 0,88	0,274 **
10-20	1,38 ± 1,20	2,00 ± 1,24	0,380 *
>20	2,28 ± 0,97	1,13 ± 0,90	0,090 *

(\*) Mann-Whitney (\*\*) t Student

Em relação à TIMP-1, houve uma tendência a maior expressão desta proteína em amostras de urina no grupo de pacientes com a doença que apresentavam PSA de 10-20ng/mL, não havendo, no entanto, significância estatística em qualquer categoria das variáveis analisadas (Tabela 9).

**Tabela 9.** Comparação da expressão proteica urinária do TIMP-1 entre pacientes com e sem diagnóstico de CaP por idade e valores do PSA.

Variáveis	TIMP-1		p-valor
	Com doença Média ± DP	Sem Doença Média ± DP	
<b>Idade (anos)</b>			
<60	1,27 ± 1,19	1,77 ± 1,24	0,355 *
60-70	1,49 ± 1,34	1,66 ± 1,22	0,670 **
>70	1,30 ± 1,30	1,30 ± 1,25	0,609 *
<b>PSA (ng/mL)</b>			
<10	1,32 ± 1,22	1,76 ± 1,22	0,194 *
10-20	2,45 ± 1,41	0,97 ± 0,97	0,079 *
>20	0,74 ± 0,91	1,77 ± 1,49	0,280 *

(\*) Mann-Whitney (\*\*) t Student

Assim como para as demais proteínas analisadas, não foi observada diferença estatisticamente significativa das médias das expressões da RECK em amostras de urina entre os grupos de casos e controles para cada categoria das variáveis, no entanto, houve uma tendência a maior expressão no grupo de pacientes sem CaP que apresentavam PSA >20ng/mL (Tabela 10).

**Tabela 10.** Comparação da expressão proteica urinária da RECK entre pacientes com e sem diagnóstico de CaP por idade e valores do PSA.

Variáveis	RECK		p-valor
	Com doença Média ± DP	Sem Doença Média ± DP	
<b>Idade (anos)</b>			
<60	0,62 ± 0,81	0,28 ± 0,35	0,452 *
60-70	0,53 ± 0,89	0,51 ± 0,99	0,875 *
>70	0,39 ± 0,53	0,53 ± 0,78	0,850 *
<b>PSA (ng/mL)</b>			
<10	0,44 ± 0,64	0,51 ± 0,97	0,618 *
10-20	0,80 ± 0,77	0,34 ± 0,62	0,306 *
>20	0,14 ± 0,17	0,49 ± 0,34	0,090 *

(\*) Mann-Whitney

Com a intenção de avaliar os marcadores MMP-9, TIMP-1 e RECK urinários como fatores prognósticos para o CaP, comparamos as suas expressões em pacientes com o diagnóstico histológico da doença, levando em consideração a distribuição estratificada por risco.

Não foi possível estabelecer uma associação entre a expressão urinária dessas proteínas e os fatores prognósticos “escore de Gleason, grupo ISUP e TR” (Tabela 11).

**Tabela 11.** Comparação da expressão proteica urinária dos marcadores MMP-9 RECK e TIMP-1 em pacientes com diagnóstico de CaP entre os grupos prognósticos.

Variáveis	MMP9	TIMP1	RECK
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
<b>PSA (ng/dL)</b>			
<10	1,61 ± 0,96	1,32 ± 1,22	0,44 ± 0,64
10-20	1,38 ± 1,20	2,45 ± 1,41	0,80 ± 0,77
>20	2,28 ± 0,97	0,74 ± 0,91	0,14 ± 0,17
p-valor	0,165 *	<b>0,045 *</b>	0,341 **
<b>Gleason</b>			
6	1,77 ± 0,96	1,59 ± 1,26	0,54 ± 0,82
7	1,65 ± 1,08	1,16 ± 1,31	0,56 ± 0,76
>7	1,97 ± 1,13	1,01 ± 1,31	0,29 ± 0,48
p-valor	0,787 *	0,429 *	0,609 **
<b>Gleason</b>			
6	1,77 ± 0,96	1,59 ± 1,26	0,54 ± 0,82
≥ 7	1,81 ± 1,08	1,09 ± 1,28	0,43 ± 0,64
p-valor	0,901 ¥	0,199 ¥	0,400 €
<b>ISUP</b>			
1	1,77 ± 0,96	1,59 ± 1,26	0,54 ± 0,82
2	1,94 ± 1,12	1,00 ± 1,25	0,63 ± 0,84
3	1,35 ± 0,16	2,22 ± 1,61	0,63 ± 0,77
4	1,65 ± 1,11	1,70 ± 1,44	0,49 ± 0,58
5	2,38 ± 1,16	0,15 ± 0,18	0,03 ± 0,03
p-valor	0,739 *	0,184 *	0,509 **
<b>Toque retal</b>			
Normal	1,43 ± 0,97	1,07 ± 1,04	0,48 ± 0,89
Suspeito	1,75 ± 0,99	0,94 ± 0,93	0,28 ± 0,51
p-valor	0,497 €	0,752 €	0,527 €

(\*) ANOVA (\*\*) Kruskal-Wallis (¥) t Student (€) Mann-Whitney

Em relação aos valores do PSA, foi observada menor expressão da TIMP-1 na urina de pacientes com CaP e níveis de PSA >20ng/mL quando comparados aos pacientes com níveis de 10-20ng/mL. Em relação à MMP-9 e RECK, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores de expressão destas proteínas estratificados por nível do PSA (Tabela 11).

## **5. DISCUSSÃO**

Nosso estudo teve como objetivos avaliar o nível de expressão gênica tecidual em amostras de BTRUS de pacientes com CaP, onde observamos superexpressão do gene MMP-9 e subexpressão dos genes TIMP-1, RECK e do miR-338-3p; e avaliar o nível de expressão proteica urinária das proteínas MMP-9, TIMP-1, RECK nos mesmos pacientes, sendo observada uma maior expressão da proteína MMP-9, embora sem significância estatística.

Para as análises comparativas, utilizamos a variável idade, levando em consideração que o risco para desenvolvimento da neoplasia se eleva com o envelhecimento e, portanto, a diferença na expressão relacionada à idade poderia justificar esse maior risco.

Os valores do PSA e os escores de Gleason foram estratificados em 3 grupos, os quais são utilizados pelos principais sistemas de classificação de risco. Para os escores de Gleason, realizamos uma nova estratificação em 2 grupos com a intenção de separar doença clinicamente insignificante (escore de Gleason < 7) de doença clinicamente significativa (escore de Gleason  $\geq$  7).

Mais de 60% dos pacientes no nosso estudo tinham nível de PSA < 10ng/mL, e mais de 75% apresentavam TR normal, o que se espera nos dias atuais pelo incentivo das políticas públicas de saúde em relação ao rastreamento da doença.

Quase metade dos pacientes com diagnóstico de CaP apresentavam escore de Gleason 6 (ISUP 1), que representa um percentual grande de pacientes nos quais a biópsia prostática talvez pudesse ser evitada, sem levar em conta aqueles cuja biópsia foi negativa.

Nos pacientes com CaP, uma maior proporção estava no grupo “> 70 anos”, seguida do grupo “60-70 anos”, em concordância com estudo de Hori *et al.*, que demonstra um aumento progressivo da incidência da doença a partir dos 40 anos, com pico em torno dos 70-79 anos <sup>(52)</sup>.

### **5.1 Expressão dos genes e do miR-338-3p**

A maioria dos pacientes com diagnóstico de CaP foi superexpressa para MMP-9 e subexpressa para TIMP-1, RECK e miR-338-3p. Esses achados são consistentes com a hipótese de que a MMP-9 desempenha um papel no processo oncogênico e que o TIMP-1, a RECK e o miR-338-3p atuam como seus inibidores e, portanto, como fatores protetores.

A idade é reconhecidamente um fator de risco para o desenvolvimento do CaP. Nenhum dos marcadores estudados, no entanto, apresentou relação com esta variável.

Não foi possível estabelecer uma relação entre a expressão gênica tecidual de MMP-9 e os fatores prognósticos, uma vez que não houve diferença na sua expressão de acordo com os valores do PSA, escores de Gleason e grupo ISUP.

Também não foi possível observar no nosso estudo associação entre a expressão gênica do TIMP-1 e os fatores prognósticos “PSA” e “escore de Gleason” para o CaP. Por sua vez, pacientes grupo ISUP 5 apresentaram maior expressão gênica quando comparada aos demais grupos. Por ter essa proteína efeitos inibitórios



sobre a MMP-9, esperávamos que sua expressão estivesse reduzida nos pacientes com pior prognóstico.

Da mesma forma, a expressão gênica da RECK foi semelhante dentre os grupos prognósticos para o CaP, incluindo o “grupo ISUP”. Este gene foi mais expresso nos pacientes com TR suspeito quando comparado aos pacientes com TR normal. Seguindo o mesmo raciocínio do TIMP-1, era de se esperar que pacientes com doença de maior gravidade apresentassem menor expressão desse gene.

Reis et al estudaram 40 espécimes de próstata provenientes de pacientes portadores de CaP submetidos a PTR utilizando o método de imunohistoquímica e acompanharam os pacientes por um tempo médio de 92,5 meses. Observaram uma relação entre a perda da imunoexpressão para TIMP-1 e uma maior recorrência bioquímica da doença (22,2% dos pacientes com TIMP-1 positivo versus 56,3% dos pacientes com TIMP-1 negativo,  $p= 0,042$ ) <sup>(39)</sup>.

Babichenko et al avaliaram o perfil de expressão da MMP-9 e do TIMP-1 em tecido prostático proveniente de PTR (portadores de CaP) e de BP (portadores de HPB) por estudo imunohistoquímico e observaram que a expressão da MMP-9 foi menor no grupo de pacientes com CaP, assim como a expressão do TIMP-1. O autor sugere que o efeito oncogênico da MMP-9 nesse tipo de tumor se deve não à sua maior expressão e sim a uma menor inibição pelo TIMP-1, cuja expressão está significativamente reduzida <sup>(53)</sup>.

Com o objetivo de avaliar a expressão gênica dos marcadores MMP-9, TIMP-1 e RECK em tecido maligno de próstata, Reis et al estudaram amostras teciduais de pacientes com diagnóstico de CaP clinicamente localizado submetidos a PTR,

utilizando o método de qRT-PCR. Neste estudo, identificaram que a MMP-9 foi superexpressa nesse grupo de pacientes (9,2 vezes em relação aos controles) enquanto o TIMP-1 e RECK foram subexpressos (0,75 e 0,85 vezes, respectivamente). Observaram ainda que a MMP-9 teve maior expressão nos pacientes com PSA  $\geq 10$ ng/mL em relação aos pacientes com PSA  $< 10$ ng/mL. Estes achados reforçam a hipótese do papel da MMP-9 no processo carcinogênico <sup>(45)</sup>. Em estudo posterior realizado pelo nosso grupo, comportamento semelhante de expressão gênica tecidual de MMP-9, TIMP-1 e RECK em pacientes portadores de carcinoma urotelial da bexiga, com a maior parte dos pacientes sendo superexpressos para MMP-9 e subexpressos para TIMP-1 e RECK. Neste estudo, observou-se que pacientes com tumores de alto grau e invasivos apresentaram expressão de MMP-9 superior aos pacientes com doença de baixo grau e localizadas (40).

Por outro lado, em uma população de pacientes portadores de carcinoma colorretal, Seubert et al encontraram uma maior expressão do RNAm de TIMP-1 nos pacientes que desenvolveram metástases hepáticas em relação aos que estavam livres de metástases. Adicionalmente, realizaram estudo experimental com ratos utilizando células tumorais de carcinoma colorretal, pancreático, de mama e linfoma e identificaram que níveis sistêmicos elevados de TIMP-1 criavam um ambiente pré-metastático no fígado que desviava as células tumorais para este órgão, mas não para outros <sup>(54)</sup>.

Rabien et al realizaram estudo para determinação da expressão da proteína RECK em amostras teciduais de próstata pós PTR pelo método de Western blot e observaram que a expressão desta proteína estava reduzida em aproximadamente 80% nas células tumorais em relação ao tecido normal adjacente. Adicionalmente,

demonstraram que a superexpressão da proteína RECK foi capaz de diminuir o processo de invasão tecidual em até 80% para a linhagem celular DU-145 utilizando um sistema de invasão comerciável, embora não tenha afetado a proliferação celular (44).

Por sua vez, Chen et al observaram uma menor expressão gênica da RECK nas células tumorais prostáticas quando comparada à expressão nas células normais adjacentes utilizando o método de qRT-PCR, além de terem identificado a RECK como alvo do miR-15b, um miRNA com potencial oncogênico. Adicionalmente observaram que a expressão provocada de RECK inibiu a proliferação celular e o potencial invasivo em linhagens celulares de CaP (55).

A maior parte dos pacientes com CaP mostraram ser subexpressos para o miR-338-3p. Os grupos de pacientes com PSA > 20ng/mL e com TR suspeito foram os que apresentaram menores níveis de expressão. Considerando que o PSA e o TR são marcadores reconhecido para o diagnóstico e para o prognóstico do CaP, e que valores de PSA acima de 20ng/mL estão associados a um maior risco de doença a distância, esta relação observada entre o miR-338-3p e estas variáveis sugere o papel protetor do miR-338-3p para a progressão da doença. No entanto, não observamos este mesmo fenômeno quando avaliamos o grau histológico da doença, outro fator prognóstico bem estabelecido.

Bakkar et al. avaliaram a função do miR-338-3p em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* e sua expressão foi validada em amostras clínicas e em uma coorte de CaP localizado e metastático. Neste estudo foi observado que houve uma redução da expressão do miR-338-3p em amostras teciduais de próstata, à medida que houve

uma progressão de doença benigna para CaP localizado e CaP metastático. A superexpressão do miR-338-3p, por sua vez, resultou em redução da invasão celular e da expressão de genes sinalizadores de quimiocinas CXCL12, CXCR4 e CXCR7 em modelos celulares de CaP *in vitro* <sup>(56)</sup>.

Cai et al. compararam a expressão do miR-338-3p em tecidos de CaP e tecidos normais adjacentes e observaram que a expressão deste miRNA estava reduzida no tecido tumoral. Após análise dos dados clínicos, observaram que os pacientes com níveis maiores de expressão apresentavam menores taxas de acometimento linfonodal e de metástases. *In vitro*, constataram o seu potencial inibitório no processo de proliferação e de invasão em linhagens celulares de CaP <sup>(57)</sup>.

## **5.2 Expressão proteica urinária**

A MMP-9 tem sido implicada em vários processos oncogênicos devido à sua capacidade de degradar a membrana basal celular. Por sua vez, TIMP-1 e RECK atuam como seus inibidores, desempenhando possível papel na supressão tumoral. Houve uma maior expressão da MMP-9 na urina no grupo de pacientes com CaP quando comparado ao grupo controle, porém sem diferença estatisticamente significativa. É possível que, com um aumento do número de pacientes envolvidos no estudo, a significância estatística fosse alcançada.

Roy et al analisaram amostras de urina de pacientes com diagnóstico de CaP e de controles pelo método de zimografia e identificaram que houve uma maior taxa

de expressão positiva da MMP-9 nos pacientes com CaP em relação ao grupo controle (58% versus 18%,  $P < 0,001$ )<sup>(58)</sup>.

O número reduzido de pacientes em cada grupo dificultou a análise de expressão de acordo com as variáveis estabelecidas no estudo. Apesar das limitações, houve uma tendência à maior expressão da MMP-9 e à menor expressão da RECK nos pacientes com valor do PSA  $> 20\text{ng/mL}$  e à menor expressão do TIMP-1 nos pacientes com PSA de  $10\text{-}20\text{ng/mL}$  (casos versus controles), podendo esses marcadores representar um auxílio diagnóstico nesses grupos de pacientes.

Observamos que os pacientes com nível de PSA  $> 20\text{ng/mL}$  foram subexpressos para TIMP-1 quando comparados aos pacientes com nível de PSA de  $10\text{-}20\text{ng/mL}$ . Numericamente, observamos o mesmo comportamento para a RECK e o inverso para a MMP-9, porém sem significância estatística. Esses achados levantam, mais uma vez, a hipótese de que essas proteínas possam atuar como fatores de mau prognóstico (MMP-9) ou bom prognóstico (TIMP-1 e RECK) para o CaP, considerando que este nível de PSA tem relação com doença mais agressiva.

Embora o TIMP-1 seja um inibidor da MMP-9 e, em tese, tenha um efeito inibitório na ação tumorigênica deste, alguns estudos têm demonstrado uma associação dos níveis elevados do TIMP-1 a alguns tipos de tumores como fator de pior de prognóstico<sup>(41, 59, 60)</sup>.

Em metanálise realizada para avaliar o papel do TIMP-1 como fator prognóstico nos pacientes com diagnóstico de câncer de mama, Lee et al concluíram que os níveis séricos elevados ou altos deste marcador estavam relacionados a uma sobrevida global reduzida quando comparada à dos pacientes com níveis normais ou baixos. O

mesmo não foi constatado quando avaliadas as expressões proteica e gênica teciduais. Uma das teorias que suporta essa hipótese do efeito negativo desta proteína é que ela desempenharia uma atividade inibitória na apoptose das células tumorais <sup>(59)</sup>.

Gong et al, por sua vez, estudaram a expressão do TIMP-1 em pacientes com diagnóstico de CaP resistente à castração pelo método de ELISA e observaram que os níveis séricos de TIMP-1 eram elevados nestes pacientes em relação aos pacientes com CaP hormônio sensível. Identificaram ainda uma relação entre níveis elevados de TIMP-1, níveis elevados de cromogranina A (CGA) sérica e níveis baixos de PSA, sugerindo que os níveis séricos elevados de TIMP-1 poderiam estar relacionados à degeneração neuroendócrina induzida pela terapia de deprivação androgênica no CaP <sup>(60)</sup>.

Como pontos negativos do nosso estudo, destacamos: 1) a análise das expressões dos genes e do miRNA como fatores prognósticos foi prejudicada pelo número de amostras estudadas; 2) como não houve um seguimento dos pacientes, os marcadores MMP-9, TIMP-1, RECK e miR-338-3p foram testados indiretamente como fatores prognósticos (comparações entre os grupos prognósticos já bem estabelecidos), já que os desfechos clínicos da doença não puderam ser verificados; e 3) considerando que não realizamos uma análise histológica adicional para identificar a positividade para CaP da amostra tecidual analisada, não pudemos verificar qualquer possível diferença de expressão tecidual entre amostras positivas e amostras negativas em pacientes com CaP.

## **6. CONCLUSÃO**

Encontramos um perfil de superexpressão para MMP-9 e de subexpressão para TIMP-1, RECK e miR-338-3p em amostras de tecido prostático de pacientes com CaP. Adicionalmente, foi observada uma menor expressão do miR-338-3p em pacientes com PSA > 20ng/mL e naqueles com TR alterado, além de uma maior da expressão de RECK em pacientes com TR alterado e da expressão de TIMP-1 nos pacientes grupo ISUP 5.

Observamos uma maior expressão urinária da proteína MMP-9 nos pacientes portadores de CaP, além de uma redução da expressão de TIMP-1 nos pacientes com PSA > 20ng/mL.



## **REFERÊNCIAS**

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021.
2. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil 2020 [Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>].
3. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol*. 2019;10(2):63-89.
4. Bell KJ, Del Mar C, Wright G, Dickinson J, Glasziou P. Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies. *Int J Cancer*. 2015;137(7):1749-57.
5. Shi Z, Platz EA, Wei J, Na R, Fantus RJ, Wang C-H, et al. Performance of Three Inherited Risk Measures for Predicting Prostate Cancer Incidence and Mortality: A Population-based Prospective Analysis. *European Urology*. 2020.
6. Mottet N, Van Den Bergh RCN, Briers E, Van Den Broeck T, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-EANM-ESTRO-ESUR-SIOG Guidelines on Prostate Cancer—2020 Update. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European Urology*. 2020.
7. Deka R, Courtney PT, Parsons JK, Nelson TJ, Nalawade V, Luterstein E, et al. Association Between African American Race and Clinical Outcomes in Men Treated for Low-Risk Prostate Cancer With Active Surveillance. *JAMA*. 2020;324(17):1747.
8. Cuzick J, Thorat MA, Andriole G, Brawley OW, Brown PH, Culig Z, et al. Prevention and early detection of prostate cancer. *Lancet Oncol*. 2014;15(11):e484-92.
9. Cao Y, Ma J. Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(4):486-501.
10. Junejo N, Alkhateeb S. BRCA2 gene mutation and prostate cancer risk. Comprehensive review and update. *Saudi Medical Journal*. 2020;41(1):9-17.
11. Nombela P, Lozano R, Aytes A, Mateo J, Olmos D, Castro E. BRCA2 and Other DDR Genes in Prostate Cancer. *Cancers*. 2019;11(3):352.
12. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, Briers E, Cumberbatch MG, De Santis M, et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*. 2017;71(4):618-29.
13. Bhanji Y, Allaway MJ, Gorin MA. Recent Advances and Current Role of Transperineal Prostate Biopsy. *Urologic Clinics of North America*. 2021;48(1):25-33.
14. Rao AR, Motiwala HG, Karim OM. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU Int*. 2008;101(1):5-10.
15. Djavan B, Eckersberger E, Finkelstein J, Sadri H, Taneja SS, Lepor H. Prostate-specific antigen testing and prostate cancer screening. *Prim Care*. 2010;37(3):441-59, vii.
16. Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, et al. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med*. 1991;324(17):1156-61.

17. Greene KL, Albertsen PC, Babaian RJ, Carter HB, Gann PH, Han M, et al. Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *J Urol*. 2013;189(1 Suppl):S2-S11.
18. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Lucia MS, Goodman PJ, Crowley JJ, et al. Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA*. 2005;294(1):66-70.
19. Szeliski K, Adamowicz J, Gastecka A, Drewa T, Pokrywczyńska M. Modern urology perspectives on prostate cancer biomarkers. *Cent European J Urol*. 2018;71(4):420-6.
20. de la Calle C, Patil D, Wei JT, Scherr DS, Sokoll L, Chan DW, et al. Multicenter Evaluation of the Prostate Health Index to Detect Aggressive Prostate Cancer in Biopsy Naïve Men. *J Urol*. 2015;194(1):65-72.
21. Tosoian JJ, Druskin SC, Andreas D, Mullane P, Chappidi M, Joo S, et al. Use of the Prostate Health Index for detection of prostate cancer: results from a large academic practice. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2017;20(2):228-33.
22. Parekh DJ, Punnen S, Sjoberg DD, Asroff SW, Bailen JL, Cochran JS, et al. A multi-institutional prospective trial in the USA confirms that the 4Kscore accurately identifies men with high-grade prostate cancer. *Eur Urol*. 2015;68(3):464-70.
23. Bhattu AS, Zappala SM, Parekh DJ, Punnen S. A 4Kscore Cut-off of 7.5% for Prostate Biopsy Decisions Provides High Sensitivity and Negative Predictive Value for Significant Prostate Cancer. *Urology*. 2020.
24. Naji L, Randhawa H, Sohani Z, Dennis B, Lautenbach D, Kavanagh O, et al. Digital Rectal Examination for Prostate Cancer Screening in Primary Care: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Annals of Family Medicine*. 2018;16(2):149-54.
25. Ukimura O, Coleman JA, de la Taille A, Emberton M, Epstein JI, Freedland SJ, et al. Contemporary role of systematic prostate biopsies: indications, techniques, and implications for patient care. *Eur Urol*. 2013;63(2):214-30.
26. Schoots IG, Roobol MJ, Nieboer D, Bangma CH, Steyerberg EW, Hunink MG. Magnetic resonance imaging-targeted biopsy may enhance the diagnostic accuracy of significant prostate cancer detection compared to standard transrectal ultrasound-guided biopsy: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol*. 2015;68(3):438-50.
27. Miah S, Hosking-Jervis F, Connor MJ, Eldred-Evans D, Shah TT, Arya M, et al. A Multicentre Analysis of the Detection of Clinically Significant Prostate Cancer Following Transperineal Image-fusion Targeted and Nontargeted Systematic Prostate Biopsy in Men at Risk. *Eur Urol Oncol*. 2020;3(3):262-9.
28. Rosenzweig B, Laitman Y, Zilberman DE, Raz O, Ramon J, Dotan ZA, et al. Effects of "real life" prostate MRI inter-observer variability on total needle samples and indication for biopsy. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2020;38(10):793.e13-.e18.
29. Borghesi M, Ahmed H, Nam R, Schaeffer E, Schiavina R, Taneja S, et al. Complications After Systematic, Random, and Image-guided Prostate Biopsy. *Eur Urol*. 2017;71(3):353-65.
30. Kasivisvanathan V, Rannikko AS, Borghi M, Panebianco V, Mynderse LA, Vaarala MH, et al. MRI-Targeted or Standard Biopsy for Prostate-Cancer Diagnosis. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(19):1767-77.
31. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus

- Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(2):244-52.
32. Buyyounouski MK, Choyke PL, McKenney JK, Sartor O, Sandler HM, Amin MB, et al. Prostate cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(3):245-53.
  33. Samaratunga H, Delahunt B, Yaxley J, Srigley JR, Egevad L. From Gleason to International Society of Urological Pathology (ISUP) grading of prostate cancer. *Scand J Urol*. 2016;50(5):325-9.
  34. Furubayashi N, Negishi T, Ura S, Mutaguchi J, Taguchi K, Shimokawa M, et al. Patients treated with radical prostatectomy with positive digital rectal examination findings in the intermediate-risk group are prone to PSA recurrence. *Oncol Lett*. 2016;11(6):3882-8.
  35. National Comprehensive Cancer Network - NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Prostate Cancer 2021 [Version 1.2021]:[Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/prostate.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/prostate.pdf).
  36. Filella X, Foj L. Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2016;17(11).
  37. Cui Y, Cao W, Li Q, Shen H, Liu C, Deng J, et al. Evaluation of prostate cancer antigen 3 for detecting prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 2016;6:25776.
  38. Salimi Sartakhti J, Manshaei MH, Sadeghi M. MMP-TIMP interactions in cancer invasion: An evolutionary game-theoretical framework. *J Theor Biol*. 2017;412:17-26.
  39. Reis ST, Viana NI, Iscaife A, Pontes-Junior J, Dip N, Antunes AA, et al. Loss of TIMP-1 immune expression and tumor recurrence in localized prostate cancer. *Int Braz J Urol*. 2015;41(6):1088-95.
  40. Reis ST, Leite KRM, Piovesan LF, Pontes-Junior J, Viana NI, Abe DK, et al. Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of Bladder Cancer. *BMC Urology*. 2012;12(1):18.
  41. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491-4.
  42. Chang CK, Hung WC, Chang HC. The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2008;12(6B):2781-9.
  43. Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell*. 2001;107(6):789-800.
  44. Rabien A, Ergün B, Erbersdobler A, Jung K, Stephan C. RECK overexpression decreases invasive potential in prostate cancer cells. *Prostate*. 2012;72(9):948-54.
  45. Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, de Sousa-Canavez JM, Dall'Oglio MF, Passerotti CC, et al. MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK underexpression is associated with prognosis in prostate cancer. *Int J Biol Markers*. 2011;26(4):255-61.
  46. Ambros V, Lee RC, Lavanway A, Williams PT, Jewell D. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr Biol*. 2003;13(10):807-18.

47. Liu HT, Gao P. The roles of microRNAs related with progression and metastasis in human cancers. *Tumour Biol.* 2016.
48. Leite KR, Reis ST, Viana N, Morais DR, Moura CM, Silva IA, et al. Controlling RECK miR21 Promotes Tumor Cell Invasion and Is Related to Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *J Cancer.* 2015;6(3):292-301.
49. Huang XH, Chen JS, Wang Q, Chen XL, Wen L, Chen LZ, et al. miR-338-3p suppresses invasion of liver cancer cell by targeting smoothed. *J Pathol.* 2011;225(3):463-72.
50. Sun J, Feng X, Gao S, Xiao Z. microRNA-338-3p functions as a tumor suppressor in human non-small-cell lung carcinoma and targets Ras-related protein 14. *Mol Med Rep.* 2015;11(2):1400-6.
51. Hong Y, Chen X, Liang Z, Xu Z, Li Y, Pan Y. MiR-338-3p inhibits cell migration and invasion in human hypopharyngeal cancer via downregulation of ADAM17. *Anticancer Drugs.* 2020;31(9):925-31.
52. Hori M, Palmer M. Age-specific prostate cancer incidence rate in the world. *Japanese Journal of Clinical Oncology.* 2021;51(1):164-5.
53. Babichenko II, Andriukhin MI, Pulbere S, Loktev A. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-9 and inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in prostate adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(12):9090-8.
54. Seubert B, Grünwald B, Kobuch J, Cui H, Schelter F, Schaten S, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice. *Hepatology.* 2015;61(1):238-48.
55. Chen R, Sheng L, Zhang HJ, Ji M, Qian WQ. miR-15b-5p facilitates the tumorigenicity by targeting RECK and predicts tumour recurrence in prostate cancer. *J Cell Mol Med.* 2018;22(3):1855-63.
56. Bakkar A, Alshalalfa M, Petersen LF, Abou-Ouf H, Al-Mami A, Hegazy SA, et al. microRNA 338-3p exhibits tumor suppressor role and its down-regulation is associated with adverse clinical outcome in prostate cancer patients. *Mol Biol Rep.* 2016;43(4):229-40.
57. Cai C, Zhi Y, Wang K, Zhang P, Ji Z, Xie C, et al. CircHIPK3 overexpression accelerates the proliferation and invasion of prostate cancer cells through regulating miRNA-338-3p. *OncoTargets and Therapy.* 2019;Volume 12:3363-72.
58. Roy R, Louis G, Loughlin KR, Wiederschain D, Kilroy SM, Lamb CC, et al. Tumor-specific urinary matrix metalloproteinase fingerprinting: identification of high molecular weight urinary matrix metalloproteinase species. *Clin Cancer Res.* 2008;14(20):6610-7.
59. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Serum TIMP-1 predicts survival outcomes of invasive breast carcinoma patients: a meta-analysis. *Arch Med Res.* 2011;42(6):463-8.
60. Gong Y, Chippada-Venkata UD, Galsky MD, Huang J, Oh WK. Elevated circulating tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) levels are associated with neuroendocrine differentiation in castration resistant prostate cancer. *Prostate.* 2015;75(6):616-27.