

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

Rodrigo Minuto Paiva

**AVALIAÇÃO DE MICRORNAS COMO BIOMARCADORES MOLECULARES NO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

Porto Alegre
2020

Rodrigo Minuto Paiva

**AVALIAÇÃO DE MICRORNAS COMO BIOMARCADORES MOLECULARES NO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ilma Simoni Brum

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Paiva, Rodrigo Minuto
Avaliação de microRNAs como biomarcadores
moleculares no câncer de próstata / Rodrigo Minuto
Paiva. -- 2020.
151 f.
Orientadora: Ilma Simoni Brum.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas:
Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. microRNAs. 2. câncer de próstata. 3.
biomarcadores. 4. diagnóstico. I. Brum, Ilma Simoni,
orient. II. Título.

Rodrigo Minuto Paiva

**AVALIAÇÃO DE MICRORNAS COMO BIOMARCADORES MOLECULARES NO
CÂNCER DE PRÓSTATA**

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

Aprovado em: 14 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vanessa Suñe Mattevi – UFCSPA

Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira – HCPA

Profa. Dra. Patrícia Ashton Prolla – HCPA

Prof. Dr. Guilherme Baldo – UFRGS

Dedico este trabalho aos tesouros da minha vida,

Mãe, Pai e Andi

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Ilma Simoni Brum da Silva, por sua orientação e ensinamentos durante a execução deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente, ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde, pelo privilégio de estudar em uma instituição com ensino público e de qualidade.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, local de meu trabalho, e que oferece todas as ferramentas necessárias para o desenvolvimento da ciência e pesquisa.

Ao Grupo Hermes Pardini, especialmente, a Danielle Alves Gomes Zauli e Elvis Cueva Mateo, por idealizarem este projeto, estabelecendo uma parceria entre HCPA, UFRGS e Grupo Hermes Pardini, bem como pelo apoio financeiro.

À minha chefia Ana Paula Alegretti por viabilizar o primeiro contato que permitiu a formação desta parceria de estudo.

Ao Prof. Brasil Silva Neto por viabilizar toda a fase de coleta de amostras junto às equipes do Serviço de Urologia e Centro Cirúrgico Ambulatorial do HCPA.

Às colegas Daisy Crispim e Taís Assmann pela viabilização e treinamento inicial, respectivamente, de parte do experimento no Serviço de Endocrinologia do HCPA.

À Vanessa Bielefeldt Leotti, pelas consultorias estatísticas.

Aos meus colegas de laboratório Elisa Costabeber, Maria Cristina de Oliveira Amaro Ritter, Eduardo Wandame Gomez, Denise da Silva Menezes e Claire Beatriz Soares, pelo apoio nos momentos em que precisei me afastar da rotina de trabalho.

Aos meus queridos pais, Léo Paiva de Paiva e Lilia Maria lung Minuto, pelo amor, dedicação e educação, elementos essenciais de minha formação.

À minha família amada, Mana, Verinha (*in memoriam*), Dedé (*in memoriam*), Felipe, Michele e Luiz Antônio, pelo apoio e torcida de sempre.

Ao meu amado esposo, Anderson Santos de Souza Paiva, pelo total apoio e compreensão em todas as horas em que estive ausente para realização deste trabalho.

RESUMO

A incidência do câncer de próstata (CaP) vem aumentando na população brasileira. Os diagnósticos atuais de CaP são baseados na detecção do antígeno específico da próstata (PSA) no sangue, no exame digital retal (DRE) e na biópsia da próstata. No entanto, o uso do DRE e do exame de triagem de PSA têm valor diagnóstico limitado. MicroRNAs (miRNAs) são pequenas sequências de RNA não codificador que regulam genes específicos envolvidos no início e no desenvolvimento do CaP. MiRNAs estáveis foram encontrados em fluidos biológicos, como plasma e urina, surgindo como uma nova classe não invasiva de biomarcadores para detecção do CaP. O objetivo deste estudo foi investigar o perfil de expressão dos miRNAs em amostras de plasma, urina e tecido da próstata de pacientes com diagnóstico de CaP e indivíduos controles, visando utilizar estes marcadores como exame de triagem para CaP. O estudo foi realizado com três conjuntos de amostras, divididos nas fases de “descoberta”, “triagem” e “validação”. Na fase de descoberta foram selecionados 44 miRNAs a partir de um estudo piloto e dados da literatura para serem analisados na fase de triagem por RT-qPCR. A expressão dos 44 miRNAs foi investigada nos três espécimes clínicos de 40 pacientes (20 pacientes com CaP e 20 controles), usando cartões de *miRNA TaqMan Custom Array* (Thermo Fisher Scientific). Nove miRNAs foram diferencialmente expressos na fase de triagem entre casos e controles nas amostras de plasma, urina e tecido. Destes nove miRNAs, quatro foram selecionados para fase de validação em 22 pacientes com CaP e 28 indivíduos controles, utilizando a mesma metodologia de PCR. Na etapa de validação foi constatado que os miR-200b-3p, miR-21-5p e miR-375 foram significativamente mais expressos no tecido de CaP em relação ao controle, apresentando valores AUC de 0,640, 0,740 e 0,815, respectivamente. Apenas o miR-375 foi significativamente regulado positivamente (AUC = 0,677) em amostras de plasma de pacientes com CaP em comparação com os controles. O miR-200b-3p plasmático mostrou valor AUC semelhante (0,664) em pacientes com CaP, mas sem significância estatística ($P > 0,05$). Os miRNAs urinários não mostraram valores de AUC com relevância estatística. A associação de pares de miRNAs ou sua combinação com valores de PSA não resultou em melhoria adicional aos valores de AUC observados, quando comparado com os valores de um único miRNA. Nossos resultados sugerem que o miR-375 deve ser considerado um potencial biomarcador de triagem para o diagnóstico de CaP, uma vez que a diferença

de expressão significativa no plasma e no tecido da próstata. Entretanto, estudos prospectivos de grande escala ainda são necessários para corroborar nossos achados como biomarcadores adjuntos aos exames de PSA e DRE, auxiliando no diagnóstico de câncer de próstata.

Palavras-chave: câncer de próstata, diagnóstico, biomarcadores, miRNA.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) incidence has been rising in Brazilian population. Current PCa diagnostics are based on the detection of prostate specific antigen (PSA) in blood, digital rectal examination (DRE) and prostate biopsy. However, DRE and PSA screening have diagnostic value limited. MicroRNAs (miRNAs) are small sequences of non-coding RNA regulating specific genes involved in the onset and development of PCa. Stable miRNAs have been found in biofluids, such as plasma and urine, emerging as a non-invasive new class of biomarkers for PCa detection. The aim of the study was to investigate microRNA expression profile in plasma, urine and prostate tissue samples from patients with diagnosis of PCa and subject controls, using these markers as a screening test for PCa. The study was performed with three sample sets, divided in “discovery”, “screening” and “validation” phases. In the discovery phase 44 miRNAs were selected from a pilot study and data from the literature, to be carried out in the screening phase by RT-qPCR. Expression of 44 miRNAs was screened in three different clinical specimens of 40 patients (20 PCa patients and 20 controls) using TaqMan Custom Array miRNA cards (Thermo Fisher Scientific). Nine miRNAs were differentially expressed in the screening phase between cases and controls among plasma, urine and tissue samples. Then, four of the dysregulated miRNAs were selected for validation in 22 PCa patients and 28 subject controls, using the same PCR methodology. After validation, miR-200b-3p, miR-21-5p and miR-375 were significantly overexpressed in PCa tissue with AUC of 0.640, 0.740 and 0.815, respectively. Only miR-375 was significantly upregulated (AUC = 0.677) in plasma samples of PCa patients in comparison to the controls. Plasmatic mir-200b-3p showed similar AUC value (0.664) in PCa patients, but without significance ($P > 0.05$). Urinary miRNAs showed no significant statistical AUC values. Testing pair of miRNA or their combination with PSA values resulted in no further improvement of AUC values observed for single miRNA. Our results suggest that miR-375 should be considered as potential screening biomarker for the diagnosis of PCa, since the difference in expression was significant in plasma and prostate tissue. However, large-scale prospective studies are still needed to validate our findings as adjunct biomarkers for PSA and DRE in diagnosis of prostate cancer.

Keywords: prostate cancer, diagnosis, biomarkers, miRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Biópsia de próstata guiada por ultrassom.....	24
Figura 2 – Representação esquemática da biossíntese dos miRNAs.....	28
Figura 3 – Silenciamento do mRNA pelo Complexo RISC.....	28
Figura 4 – Funções dos miRNAs na patogênese do CaP.....	31
Figura 5 – miR-21, miR-141, miR-143, miR-145, miR-221 e miR-222 na patogênese do CaP: resumo de suas funções e interações com o alvo.....	33
Figura 6 – Fluxograma do desenho do estudo.....	43
Figura 7 – Desenho esquemático dos sextantes da próstata na biópsia guiada por ultrassom.....	44
Figura 8 – Desenho comparativo dos cartões A comercial (384 miRs) e customizado (48 miRs).....	52
Figura 9 – Representação gráfica da expressão relativa dos miRNAs no tecido (miR-21-5p, miR-200b-3p e miR-375), plasma (miR-548am-5p, miR-200b-3p e miR-375) e urina (miR-21-5p e miR-375) entre os grupos CaP e controle na fase de validação.....	62
Figura 10 – Curvas ROC para análise dos miRNAs teciduais (A–C), plasmáticos (D–F) e urinários (G–H) para discriminar amostras com CaP de controles.....	63
Figura 11 – Curva ROC múltipla da combinação do miR-375, miR-200b-3p e PSA para diferenciar indivíduos com CaP e controles.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Expressão de miRNAs no tecido prostático.....	36
Tabela 2 – Cartão TaqMan customizado contendo as principais informações sobre os 48 miRNAs selecionados.....	49
Tabela 3 – miRNAs alvos e genes de referência selecionados para fase de validação.....	53
Tabela 4 – Características clínicas e laboratoriais de todos os pacientes analisados no estudo.....	56
Tabela 5 – Expressão relativa dos miRNAs no tecido prostático na fase de triagem utilizando cartão customizado de 48 miRNAs.....	58
Tabela 6 – Expressão relativa dos miRNAs no plasma na fase de triagem utilizando cartão customizado de 48 miRNAs.....	59
Tabela 7 – Expressão relativa dos miRNAs na urina na fase de triagem utilizando cartão customizado de 48 miRNAs.....	60
Tabela 8 – Expressão dos miRNAs no tecido prostático, plasma e urina de pacientes CaP e controles na fase de validação.....	61
Tabela 9 – Valores de sensibilidade e especificidade dos miRNAs pesquisados na fase de validação a partir da análise das curvas ROC.....	64
Tabela 10 – Resultados da análise das curvas ROC de miRNAs plasmáticos testados em combinação.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Exames de rastreamento e diagnóstico para câncer de próstata.....	17
1.1.1	<i>Exame de toque retal (DRE).....</i>	17
1.1.2	<i>PSA como biomarcador de câncer de próstata.....</i>	17
1.1.3	<i>Outros Biomarcadores.....</i>	21
1.1.3.1	<i>Antígeno 3 do câncer de próstata (PCA3).....</i>	21
1.1.3.2	<i>Antígeno precoce do câncer de próstata (EPCA) e Antígeno-2 precoce do câncer de próstata (EPCA-2).....</i>	21
1.1.3.3	<i>TMPRSS2 - ERG.....</i>	22
1.1.3.4	<i>Gene da fosfatase e homólogo da tensina (PTEN).....</i>	22
1.1.4	<i>Biópsia da próstata.....</i>	23
1.2	microRNAs como novos biomarcadores moleculares de CaP.....	25
1.2.1	<i>Biogênese e função dos miRNAs.....</i>	26
1.2.2	<i>miRNAs e câncer.....</i>	30
1.2.3	<i>Função dos miRNAs no câncer de próstata.....</i>	31
1.2.4	<i>Expressão de miRNAs no tecido com CaP.....</i>	34
1.2.5	<i>miRNAs circulantes no CaP.....</i>	37
2	OBJETIVOS.....	41
2.1	Objetivo geral.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
3	ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	42
3.1	População e desenho do estudo.....	42
3.2	Crítérios de inclusão e exclusão.....	43
3.3	Coleta do material biológico.....	43
3.4	Processamento e armazenamento das amostras.....	45

3.5	Extração de RNA.....	46
3.6	Síntese de cDNA e pré-amplificação.....	47
3.7	PCR em tempo real para avaliação da expressão dos miRNAs.....	48
3.7.1	<i>Fase de descoberta e customização do cartão de miRNAs.....</i>	<i>48</i>
3.7.2	<i>Fase de triagem.....</i>	<i>51</i>
3.7.3	<i>Fase de validação.....</i>	<i>52</i>
3.8	Análise dos resultados, normalização e análise estatística.....	53
3.9	Aspectos éticos e segurança no trabalho.....	55
4	RESULTADOS.....	56
4.1	Resultados das características clínicas e laboratoriais dos pacientes.....	56
4.2	Resultados da fase de descoberta de miRNAs.....	57
4.3	Resultados da fase de triagem de miRNAs.....	58
4.4	Resultados da fase de validação dos miRNAs.....	60
4.5	miRNAs como biomarcadores de diagnóstico.....	62
5	DISCUSSÃO.....	67
5.1	Dados clínico-laboratoriais da população de estudo.....	67
5.2	Análise geral da expressão dos miRNAs.....	69
5.3	miR-375 como biomarcador de CaP.....	69
5.4	miR-200b como biomarcador de CaP.....	72
5.5	miR-21 como biomarcador de CaP.....	73
5.6	Combinação dos miRNAs para o diagnóstico laboratorial.....	75
5.7	Relação dos miRNAs com valores de PSA e escore de Gleason.....	75
5.8	Aplicação dos miRNAs no diagnóstico laboratorial.....	76
6	CONCLUSÃO.....	81
7	REFERÊNCIAS.....	83
8	APÊNDICE.....	99
	APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	99

APÊNDICE B – Questionário (ficha clínica).....	102
APÊNDICE C – Artigo I: <i>Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review</i>	103
APÊNDICE D – Artigo II: <i>miR-375 as prostate cancer biomarker: a microRNA investigation in plasma, urine and biopsy tissue</i>	117

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer mais diagnosticado entre os homens no mundo, com aproximadamente 1,3 milhões de novos casos em 2018 e a quinta principal causa de morte por câncer (BRAY *et al.*, 2018). A *American Cancer Society* estimou para 2020 nos Estados Unidos (EUA) cerca de 191.930 novos casos de CaP com 33.330 mortes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2020). No Brasil, de acordo com os dados do Ministério da Saúde, existe uma estimativa para este ano de 65.840 novos casos de CaP, sendo que no ano de 2017 foram registradas 15.391 mortes (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020). Sua incidência aumenta com a idade, acometendo principalmente homens com mais de 50 anos, resultando em grandes impactos nos sistemas de saúde, com uma tendência ao crescimento devido à crescente exposição da população a fatores de risco, ao aumento da expectativa de vida, a melhoria e evolução dos métodos diagnósticos e da qualidade dos sistemas de informação. Além disso, a ocorrência de sobrediagnóstico, em função da disseminação do rastreamento do CaP através do exame de toque retal ou exame digital retal (DRE) e antígeno prostático específico (PSA), contribui para o aumento das taxas de incidência (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2013).

O CaP é classificado como um adenocarcinoma ou câncer glandular, acometendo em especial a zona periférica da glândula prostática (DE MARZO *et al.*, 2004; SHEN; ABATE-SHEN, 2010). A história natural deste tipo de câncer não é bem conhecida, e seu comportamento clínico pode ser um tumor bem diferenciado microscopicamente que nunca será um câncer de alto grau clinicamente significativo ou um câncer agressivo que causa metástase principalmente para medula e linfonodos, podendo levar a morte (EFTHIMIOU; SKREPETIS; BOURNIA, 2013; MOHAMMED, 2014). Segundo Yang e colaboradores, a alta taxa de mortalidade de pacientes com CaP é devido primariamente ao fato de que a doença usualmente torna-se clinicamente aparente depois que já ocorreu metástase. A taxa de 5 anos de sobrevivência de pacientes com CaP localizado e regional pode atingir 100%, mas entre os pacientes com CaP com metástase, esta taxa de sobrevivência diminui para menos de 30% (YANG; ZHENG; ZHU, 2014).

O surgimento do CaP depende da interação de vários eventos que incluem fatores genéticos/familiares, hormonais, ambientais e alimentares. Os principais fatores não modificáveis são idade, raça negra e ter parente de primeiro grau (pai ou

irmão) com CaP antes dos 60 anos de idade (REDDY *et al.*, 2003). Mais do qualquer outro tipo, é considerado um câncer de terceira idade, já que cerca de 75% dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. Dentre os fatores de risco modificáveis o único que apresenta evidências em estudos mais recentes é a síndrome metabólica, estando associada principalmente com tumores clinicamente significantes e de alto grau (STOCKS *et al.*, 2015).

Várias técnicas estão disponíveis para o diagnóstico de CaP, e as principais incluem DRE, biópsia prostática e determinação sérica do PSA. A necessidade de realização da biópsia prostática deve ser avaliada pelo médico com base nos níveis de PSA e/ou no DRE. Durante a biópsia prostática, em média, 8 a 18 fragmentos do tecido prostático são retirados para a realização do exame anatomopatológico, sendo que a biópsia prostática transretal guiada por ultrassom é um dos métodos padrão-ouro para o diagnóstico do CaP. Entretanto, a biópsia é um processo extremamente invasivo, podendo acarretar em algumas complicações como dor, sangramento retal, hematúria, hematospermia e infecções (DAS *et al.*, 2019; HÜBNER; SHARIAT; REMZI, 2018). Segundo Loeb e colaboradores, a taxa de infecções graves decorrente da biópsia tem aumentado nos últimos anos em consequência da resistência bacteriana crescente aos antimicrobianos, elevando assim o número de hospitalizações pós-biópsia (LOEB *et al.*, 2011). Neste sentido, novos biomarcadores têm sido estudados visando melhorar o manejo clínico-laboratorial da detecção precoce do CaP.

REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Exames de rastreamento e diagnóstico para câncer de próstata

Várias técnicas estão disponíveis para o rastreamento e diagnóstico de CaP, e as principais incluem DRE, determinação sérica do PSA (exames de rastreamento) e biópsia prostática (exame diagnóstico). A necessidade de realização da biópsia prostática deve ser avaliada pelo médico com base nos níveis de PSA e/ou DRE.

1.1.1 Exame de toque retal (DRE)

O DRE da próstata permanece como método preliminar primário desde antes da popularização do teste de PSA. Este exame tem importância no rastreamento e no estadiamento da doença. O procedimento é realizado pelo médico urologista, no qual insere o dedo indicador na porção final do intestino grosso (reto) do paciente. Desse modo, é possível avaliar o formato, o tamanho e a textura da próstata, além de identificar a presença de nódulos que possam ser indicativos de um tumor maligno. Apesar da importância, este exame apresenta uma série de limitações, tais como subjetividade, variabilidade interpessoal entre os examinadores, bem como inconclusividade na presença de doenças prostáticas associadas como a hiperplasia benigna da próstata (HBP) e prostatite (SCHRÖDER *et al.*, 1998).

1.1.2 PSA como biomarcador de câncer de próstata

O *National Cancer Institute* define um biomarcador como uma substância encontrada no tecido, sangue ou outros fluidos corporais que pode ser um sinal de câncer ou determinada condição benigna (não cancerígena). A maioria dos biomarcadores tumorais é sintetizada por ambas células, normais e cancerígenas, mas são produzidas em quantidades maiores por células cancerígenas (MOHAMMED, 2014). Um candidato ideal a biomarcador tem que superar limitações, tais como sensibilidade, especificidade e robustez insuficiente, além de baixo poder preditivo. Ele ainda deve ter característica não invasiva e ser extraído

preferencialmente de fontes como sangue e urina. As principais características de um biomarcador tumoral ideal são sua especificidade para um determinado tipo de tumor e sua sensibilidade, sendo que seus níveis devem sinalizar com precisão a progressão e a regressão do tumor.

De um modo geral, da mesma forma que os biomarcadores se correlacionam com suas respectivas neoplasias, os biomarcadores de próstata exibem algumas ou todas as seguintes habilidades: diagnóstica, prognóstica, preditiva e farmacodinâmica. Biomarcadores de diagnóstico representam uma estratégia de triagem (*screening*) ou confirmação do diagnóstico de uma neoplasia. Os biomarcadores prognósticos preveem o curso natural do câncer para distinguir o desfecho do tumor. Eles também ajudam a determinar quem tratar, a intensidade do tratamento, quais candidatos provavelmente responderão a um determinado medicamento e a dose mais eficaz. Biomarcadores preditivos avaliam o provável benefício de um tratamento específico. Já os biomarcadores farmacodinâmicos avaliam os efeitos iminentes do tratamento de um medicamento em um tumor e, possivelmente, podem determinar a dosagem nos estágios iniciais do desenvolvimento clínico de um novo medicamento anticâncer (SAWYERS, 2008). A identificação de biomarcadores moleculares específicos no CaP é uma abordagem racional para enfrentar os desafios clínicos atuais de quem realiza biópsia prostática, para quem oferece certas terapias intervencionistas, bem como para acompanhar o desfecho de um tratamento (BARBIERI *et al.*, 2013; BERGER *et al.*, 2011).

Novos biomarcadores têm sido descritos nos últimos anos para detecção do CaP, entre eles o *Prostate Health Index*, o escore PCA3 e o painel de quatro calicreínas (FILELLA; FOJ, 2015; STEPHAN; JUNG; RALLA, 2015). Os biomarcadores emergentes tem o objetivo de melhorar a especificidade do PSA na detecção de CaP, mostrando uma relação com a agressividade do tumor. Atualmente, o PSA continua sendo o biomarcador mais utilizado na detecção de CaP, apesar das controvérsias em torno de seu uso como ferramenta de triagem. Na verdade, os resultados mostram que a triagem baseada nos níveis de PSA resulta em uma maior incidência de CaP de baixo risco, a maioria das quais não requer tratamento (FILELLA; FOJ, 2016).

O fato de o CaP ser o câncer mais comum em vários países desenvolvidos foi, em parte, causado pelo uso generalizado e crescente do PSA nos últimos 30 anos. Essa serina protease foi descrita pela primeira vez como PSA em 1979 (WANG;

VALENZUELA; MURPHY, 2002). Desde meados da década de 1980, o PSA tem revolucionado o manejo do CaP. O PSA é biologicamente responsável pela liquefação do sêmen e secretado no plasma seminal, sendo rara a liberação retrógrada de PSA na corrente sanguínea em homens saudáveis (LILJA; ULMERT; VICKERS, 2008). Somente se a membrana basal das células epiteliais da próstata for destruída, o PSA poderá escapar excessivamente para a circulação sanguínea. Embora existam várias razões para os valores de PSA aumentar como na prostatite, HBP ou manipulações da próstata, há uma forte correlação do PSA sérico com a incidência de CaP (LILJA; ULMERT; VICKERS, 2008). Neste aspecto, o PSA não é específico para o câncer, pois a elevação dos níveis de PSA também ocorre em outras patologias da glândula prostática.

Em 1994, o teste de PSA foi oficialmente aprovado para o diagnóstico do CaP, juntamente com o DRE, pelo órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA), e tornou-se o método padrão-ouro para a detecção precoce e diagnóstico. O nível sanguíneo de PSA maior que 4,0 ng/mL é uma indicação de CaP. Entretanto, seu valor diagnóstico é limitado pela sua baixa sensibilidade e especificidade (BRYANT *et al.*, 2012; MOHAMMED, 2014; SHAPPELL, 2008). Recentemente, a triagem pelo PSA tem gerado controvérsia, visto que ele é detectado aumentado em 30-50% dos casos de HBP e em somente 20% dos casos de CaP. Evidências sugerem que alguns pacientes com CaP podem apresentar níveis de PSA abaixo de 4,0 ng/mL, enquanto que os níveis de PSA podem ser afetados por vários outros fatores, tais como prostatite, infecção do trato urinário, inflamação crônica ou HBP (ANDRIOLE JR, 2012; BARRY, 2001). O grande número de biópsias prostáticas negativas e, potencialmente desnecessárias, é reconhecido como um problema clínico na atual abordagem para avaliação do paciente. Além disso, os pacientes com PSA persistentemente elevado e biópsias prostáticas negativas são de difícil tratamento e cura.

Enquanto o PSA é o parâmetro-chave não questionado para o gerenciamento de um CaP conhecido, existem limitações decisivas para o diagnóstico de CaP. Como mencionado, doenças benignas da próstata, como HBP ou prostatite, bem como manipulações da próstata (DRE, biópsia, cateterismo, ejaculação) também podem causar elevação das concentrações séricas de PSA (POLASCIK; OESTERLING; PARTIN, 1999), enquanto andar de bicicleta parece ter um efeito menor (JIANDANI *et al.*, 2015). Isso leva a uma baixa especificidade e baixo valor preditivo positivo se uma

única medida de PSA é usada para prever CaP, especialmente na 'zona cinza' do PSA de 2 a 10 ng/ml (POLASCİK; OESTERLING; PARTIN, 1999). Andar de bicicleta, DRE ou ejaculação são algumas das situações que devem ser evitadas alguns dias antes da coleta de sangue para o exame laboratorial de PSA. Já outros fatores como uma HBP existente, prostatite crônica ou uma grande variação biológica do PSA (20 a 30%) são inevitáveis. Contudo, já uma simples medição repetida de PSA pode reduzir significativamente o número de biópsias da próstata, mas ainda assim, 60-80% de todas as biópsias não evidenciam CaP e, portanto, seriam desnecessárias.

Para aumentar a especificidade do PSA, diferentes parâmetros foram desenvolvidos no início dos anos 90, como densidade de PSA (razão de PSA e volume prostático), velocidade do PSA (alteração do PSA durante um período de tempo), incluindo também a duplicação do PSA em intervalos de referência específicos de idade/raça (POLASCİK; OESTERLING; PARTIN, 1999). Todos esses parâmetros baseados em PSA foram apenas parcialmente bem-sucedidos e não trouxeram substancialmente uma melhora em sua especificidade.

O PSA pode circular no organismo de forma livre (PSA livre) ou conjugada com a α -1-antiquimiotripsina (PSA-ACT), podendo ser mensurado laboratorialmente. Logo, o PSA total é a soma da forma livre e complexada com a proteína. Em torno de 65-95% do PSA encontra-se na forma conjugada, estando elevado em pacientes com CaP, comparado aos pacientes sem a neoplasia. Uma outra variante de PSA recentemente descoberta é o analito p2PSA, ou [-2]pró-PSA, pertencente a um grupo de precursores inativos do antígeno prostático conhecidos como pró-PSA. Estes precursores são encontrados em concentrações mais elevadas em tumores de próstata do que em tecidos benignos, o que pode trazer maior especificidade no rastreamento da doença. O p2PSA é a principal isoforma encontrada em extratos tumorais e, por isso, considerado o marcador sérico mais específico para o câncer já descoberto até o momento. Baseado nestas características moleculares, em 2012 o FDA aprovou a dosagem laboratorial das frações de PSA para análise do índice de saúde da próstata, também chamado de PHI (STEPHAN; JUNG; RALLA, 2015).

Do inglês, *prostate health indice* (PHI) é uma nova fórmula matemática que combina todas as três formas de PSA (PSA total, PSA livre e p2PSA) em uma pontuação única que pode ser usada para auxiliar na decisão clínica (MOHAMMED, 2014). O objetivo é ter mais uma análise que possa ajudar na decisão de realizar a biópsia prostática em pacientes com DRE negativa e PSA entre 4-10 ng/mL. O uso do

PHI também prevê a probabilidade de progressão durante a vigilância ativa, fornecendo outra modalidade não invasiva que potencialmente selecione e monitore essa população de pacientes (LOEB; CATALONA, 2014).

1.1.3 Outros biomarcadores

1.1.3.1 Antígeno 3 do câncer de próstata (PCA3)

Em 1995, o PCA3 foi identificado em uma pesquisa colaborativa do Hospital Johns Hopkins (Baltimore, EUA) e a Universidade Radboud (Nijmegen, Holanda) (MCKILLOP, 2006; MOHAMMED, 2014). PCA3 é um segmento de ácido ribonucleico mensageiro não codificado (mRNA) do cromossomo 9q21-22 que foi demonstrado estar elevado em mais de 95% dos homens com CaP. Este marcador é capaz de diferenciar células prostáticas benignas e cancerígenas com uma precisão de aproximadamente 100%. Ao contrário do PSA sérico, o PCA3 não é afetado pela idade, volume da próstata ou outro tipo de doença prostática (por exemplo, prostatite) (HESSELS; SCHALKEN, 2009). Além disso, nenhum transcrito de PCA3 foi detectado em tecidos extraprostáticos, demonstrando que o PCA3 é um biomarcador de CaP específico (MARKS; BOSTWICK, 2008).

Em 2012, o FDA aprovou o teste de urina que detecta a superexpressão do gene PCA3, que é específico do CaP, bem como um preditor preciso em caso de presença de câncer. PCA3 também é considerado útil para decidir quando é necessário fazer novamente biópsia no acompanhamento de pacientes sob vigilância ativa (CRAWFORD *et al.*, 2012).

1.1.3.2 Antígeno precoce do câncer de próstata (EPCA) e Antígeno-2 precoce do câncer de próstata (EPCA-2)

EPCA e EPCA-2 são proteínas estruturais nucleares que foram identificadas como expressas no CaP, mas não em outros tecidos normais ou tipos de câncer (DHIR *et al.*, 2004; SHAPPELL, 2008). Alterações nas proteínas da matriz nuclear estão associadas à carcinogênese em uma variedade de tecidos. As proteínas da matriz nuclear do modelo experimental de Dunning de CaP em ratos foram

identificadas como proteínas diferentes das do rato controle (GETZENBERG *et al.*, 1991). Em uma análise das proteínas da matriz nuclear em tecidos humanos da próstata, a proteína 1 (designada PC-1) foi identificada em 14 de 14 das preparações da matriz nuclear de CaP, mas não foi detectada em preparações semelhantes de nenhuma das 13 amostras de próstatas benignas ou 13 amostras com HBP (PARTIN *et al.*, 1993). Até o presente momento, estas proteínas estão sendo utilizadas somente em nível de pesquisa clínica.

1.1.3.3 *TMPRSS2 - ERG*

É uma fusão entre o gene da serina 2-protease transmembrana (TMPRSS2) (localizado no cromossomo 21q22.3) e o gene da família de fatores de transcrição ERG (21q22.2) e ETV1 (7p21.1) (um alelo TMPRSS2 perde seu promotor e um dos alelos de ERG o ganha) (KUMAR-SINHA; TOMLINS; CHINNAIYAN, 2008). É um arranjo específico de DNA encontrado em 50-60% dos casos de CaP e detectado em cerca de um quarto dos pacientes com neoplasia intraepitelial prostática. A detecção deste rearranjo gênico pode ser realizada através de um teste de urina. Este exame de urina pode ajudar a identificar com elevada especificidade uma parcela de pacientes com CaP agressivo, podendo desempenhar um importante papel no monitoramento da resposta a terapias hormonais para prever o comportamento do tumor, bem como ajudar a prever melhor o desfecho clínico (MWAMUKONDA *et al.*, 2010).

1.1.3.4 *Gene da fosfatase e homólogo da tensina (PTEN)*

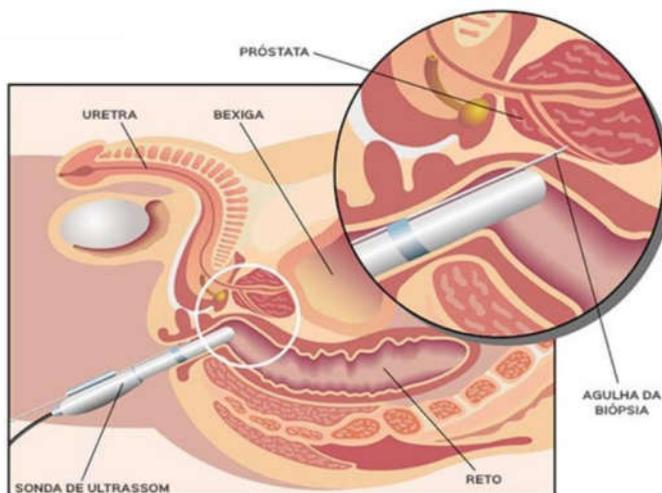
O gene *PTEN* é um gene supressor de tumor com quatro proteínas que geralmente estão alteradas no CaP. O gene produz uma proteína que desliga a via de sinalização PI3 K/AKT/mTOR, responsável pelo crescimento, metástase e sobrevivência celular. Evidências mostram que a mutação *PTEN* tem um escore de Gleason significativamente maior, pior prognóstico e maior taxa de metástases (CHAUX *et al.*, 2012).

A pesquisa sobre o gene *PTEN* visa distinguir entre o aumento de volume não cancerígeno da próstata e o CaP, com subsequente terapia apropriada (REID *et al.*, 2010).

1.1.4 *Biópsia da próstata*

Quando um indivíduo tem diagnóstico suspeito de CaP no rastreamento, necessita realizar a biópsia da glândula para confirmação histológica. Historicamente, a primeira biópsia da próstata foi realizada em 1937, com agulha e digitalmente dirigida ao nódulo da próstata. Com o advento do ultrassom e seu uso transretal, os nódulos não palpáveis passaram a ser vistos e biopsiados com agulhas apropriadas. O uso do ultrassom permite ao médico a localização do(s) nódulo(s) suspeito(s) inserindo a agulha no ponto exato para a coleta (FIGURA 1). Hodge e colaboradores (HODGE *et al.*, 1989) propuseram a biópsia sextante (seis punções) em linha parasagital, sistemática e aleatória, melhorando o diagnóstico de CaP. Este esquema original (um fragmento da base, região média e ápice bilateralmente), quando feito um pouco mais lateral, como estudado por McNeal (MCNEAL *et al.*, 1988), pode melhorar os índices de falso-negativos. Modificações na biópsia sextante padrão foram propostas tendo como foco a importância da lateralização das punções dirigidas, ou seja, obtenção de maior positividade quanto mais lateral na próstata for a biópsia (TERRIS; MCNEAL; STAMEY, 1992). Outros estudos mostraram melhora do índice de detecção de CaP com os fragmentos adicionais dirigidos mais lateralmente à técnica padrão sextante, realizando mais de 8 amostras (BABAIAN *et al.*, 2000; DURKAN *et al.*, 2002). Achados mais recentes recomendam esquemas de biópsia com 10 a 14 fragmentos como padrão para a primeira biópsia. Naqueles pacientes com suspeita clínica e biópsia prévia negativa pode-se fazer mais amostras, até acima de 21 (denominada biópsia de saturação). A biópsia é importante não só pela detecção do CaP como também no manejo clínico, ajudando a prever o prognóstico (PATEL; JONES, 2009).

Figura 1 – Biópsia de próstata guiada por ultrassom



Fonte: MD. Saúde (2020).

Com a biópsia confirmatória de CaP é necessário realizar a classificação do grau tumoral. A graduação histológica de Gleason é universalmente utilizada e atua como fator prognóstico isolado muito importante no CaP. Esta graduação constitui-se de cinco padrões, sendo que a somatória dos dois predominantes é o escore de Gleason, que varia de 2 a 10. Os números que compõem a somatória são informados entre parênteses, sendo o primeiro da sequência aquele predominante na neoplasia. Atualmente, seis é a pontuação mais baixa atribuída. Quando os pacientes são informados de que possuem um escore de Gleason 6 de 10, implica que seu prognóstico é intermediário, aumentando as chances de se ter uma neoplasia agressiva. Em tumores homogêneos a numeração é dobrada. Esta graduação é baseada na conformação arquitetural das glândulas, sua disposição e característica de crescimento e desconsidera características citológicas, sendo amplamente discutida e acordada na reunião da Sociedade Internacional de Uropatologia (*International Society of Urological Pathology – ISUP*), e publicada como consenso da graduação histológica de Gleason (EPSTEIN *et al.*, 2016).

1.2 microRNAs como novos biomarcadores moleculares de CaP

O desenvolvimento de testes não invasivos para a detecção e monitoramento de cânceres podem reduzir drasticamente os problemas mundiais que envolvem este tipo de doença. Embora estratégias convencionais de descoberta de biomarcadores baseados no sangue (por exemplo, tecnologias proteômicas) têm sido promissoras, o desenvolvimento de biomarcadores de detecção e diferenciação de câncer validados clinicamente permanecem um desafio ainda não vencido para muitos cânceres humanos (SHAPPELL, 2008).

Desde a sua descoberta em nematódeos, os microRNAs (miRNAs ou miRs) têm tido um papel importante no diagnóstico e diferenciação de vários tipos de câncer. Os miRNAs fazem parte de um grupo de RNAs de 18 a 24 nucleotídeos de extensão, fita simples e não codificantes de proteínas. São moléculas geradas pela clivagem sequencial de transcritos primários e precursores chamados de pri-microRNAs e pré-microRNAs, respectivamente, os quais serão especificados posteriormente. Estas moléculas são consideradas resistentes a vários impactos, tais como degradação enzimática, congelamento, descongelamento ou condições intensas de pH, ou seja, estabilidade que favorece a indicação dos miRNAs como biomarcadores de várias doenças (SCHÖLER *et al.*, 2010). Os padrões de expressão, função e regulação dos miRNAs em células normais e neoplásicas ainda são pouco conhecidos, mas sua localização frequente em sítios frágeis, pontos de quebra ou regiões de amplificação ou perda de heterozigotidade revelam que eles têm um significativo papel na carcinogênese humana. O padrão anormal de expressão dos vários miRNAs tem sido observado em leucemia linfocítica crônica e em muitos tumores sólidos, incluindo mama, fígado, ovário, colorretal e próstata. Cada miRNA tem a capacidade distinta de regular potencialmente a expressão de centenas de genes codificantes e, portanto, modular várias vias celulares incluindo proliferação, apoptose e resposta ao estresse. Além disso, já foi descrito que mais de 60% dos genes humanos são regulados pelos miRNAs (BUDHU; JI; WANG, 2010; SCHÖLER *et al.*, 2010). Sua expressão alterada em câncer pode ser um fator de causa ou talvez uma consequência do estado da doença. Dependendo da natureza de seus genes alvo, os miRNAs podem funcionar como supressores de tumor por repressão dos oncogenes alvo (por exemplo, let-7g, miR-15/16 e miR-34) ou como oncogenes por controlar negativamente genes que

regulam a diferenciação celular tumoral e apoptose (por exemplo, miR-155 e miR-21) (BUDHU; JI; WANG, 2010).

Visto que a capacidade de detectar o CaP nos seus estágios iniciais é o fator chave para reduzir os índices de mortalidade da doença, a identificação de biomarcadores para o diagnóstico não invasivo do CaP é de suma importância. Existem evidências que o perfil de expressão de miRNAs podem servir como biomarcadores revolucionários para vários tumores, inclusive para o CaP.

1.2.1 Biogênese e função dos miRNAs

O envolvimento de genes codificadores de proteínas no desenvolvimento de câncer tem sido extensivamente estudado nos últimos anos. Embora 90% do genoma humano seja transcrito para o RNA, apenas 2% codifica para proteínas, portanto, há um grande número de RNAs que não codificam proteína. Dados recentes sugerem que essa porção do genoma que não codifica para proteínas também desempenha um papel na carcinogênese. Esses RNAs não codificadores incluem RNA nucleolar pequeno, miRNA, RNA interferente pequeno, RNA interativo piwi e RNA não codificante longo, que por exemplo inclui *PTENP1*, um pseudogene do supressor de tumor *PTEN* e *PCA3*, proposto como um biomarcador útil na detecção de CaP (FILELLA *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2014a).

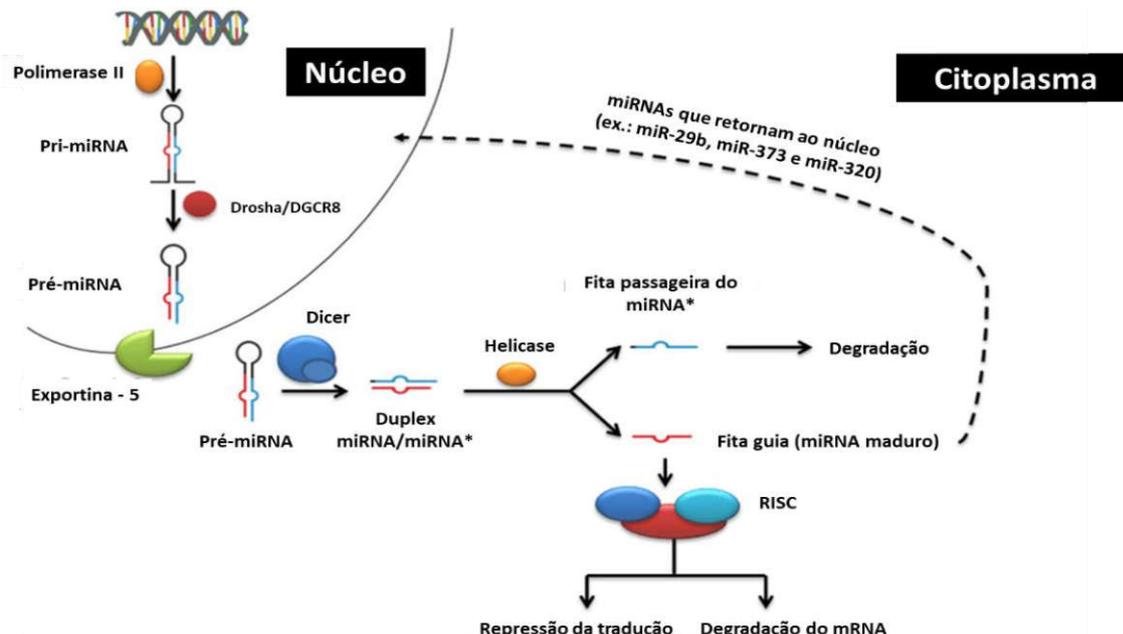
Os miRNAs são pequenos RNAs (18–24 nucleotídeos) de fita simples não codificadores, que regulam negativamente a expressão do gene através da ligação aos seus alvos de mRNA correspondentes. O primeiro miRNA descrito foi lin-4, identificado em 1993 por Lee e colaboradores no nematoide *Caenorhabditis elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Atualmente, de acordo com o banco de dados do miRbase (miRbase, versão 22.1: março de 2020), 38.589 miRNAs já foram identificados em diferentes espécies, dos quais 4.690 miRNAs maduros foram encontrados nos seres humanos (MIRBASE, 2020).

A biogênese dos miRNAs é um processo complexo que começa no núcleo celular, local onde ocorre a transcrição dos genes codificadores de miRNAs, mediada pela ação RNA polimerase II, resultando na formação de um transcrito primário de fita dupla denominado pri-miRNA. Este miRNA primário possui 5'CAP e cauda poli-A, sendo formado por algumas centenas a milhares de nucleotídeos. Em seguida, os pri-

miRNAs são clivados por um microprocessador que contém a enzima *Drosha* RNase III e a proteína DGCR8, permitindo a formação de um precursor de aproximadamente 70 nucleotídeos chamado de pré-miRNA. Depois disso, o pré-miRNA é transferido para o citoplasma pela exportina-5 e pelo cofator Ran GTP, onde o pré-miRNA é clivado pela enzima *Dicer* RNase, formando um RNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos, que contém duas cadeias de miRNA: uma torna-se o miRNA maduro e a outra o miRNA “passageiro” ou miRNA 5p, que normalmente é degradado. O miRNA maduro se liga à proteína Argonauta (AGO) e forma o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Após serem incorporados ao complexo RISC, os miRNAs podem exercer a função de silenciamento gênico em seus correspondentes alvos de mRNA (Figura 2) (FILELLA; FOJ, 2017a).

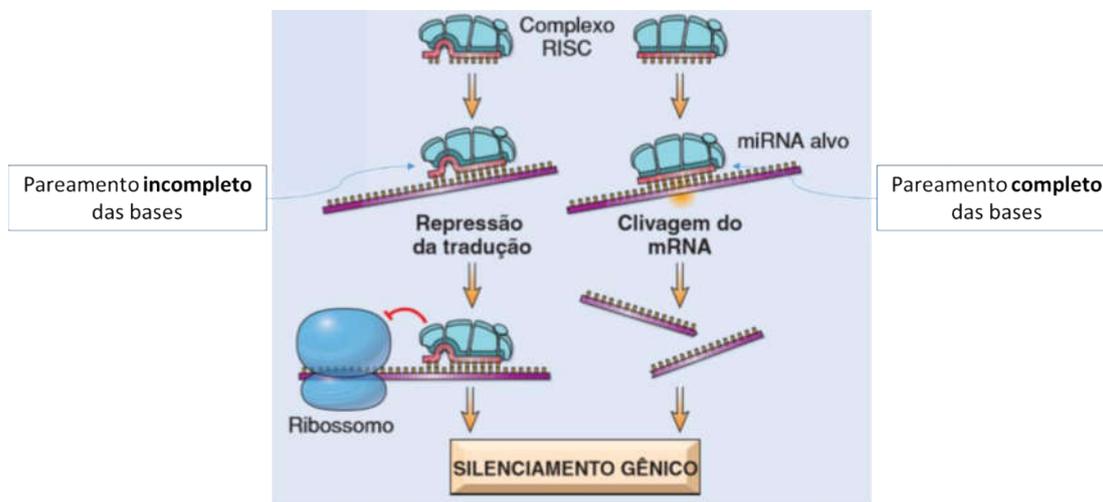
O silenciamento gênico promovido pelos miRNAs pode ocorrer por repressão da tradução, quando o miRNA faz um pareamento incompleto de bases nitrogenadas no mRNA, interrompendo a passagem do ribossomo, ou quando o pareamento de bases é completo, fazendo com que o complexo RISC clive a sequência do mRNA (Figura 3) (FILELLA; FOJ, 2017a). Nos seres humanos e animais, o mecanismo mais comum de silenciamento de genes mediado pelos miRNAs ocorre pelo pareamento incompleto de bases na região 3'UTR do mRNA. Além disso, estudos tem revelado que um único miRNA é capaz de regular até 200 mRNAs diferentes, o que potencialmente significa que os miRNAs podem controlar a expressão de cerca de um terço dos mRNAs humanos (ESQUELA-KERSCHER; SLACK, 2006; FILELLA; FOJ, 2017a).

Figura 2 – Representação esquemática da biossíntese dos miRNAs



Fonte: Samir (2016).

Figura 3 – Silenciamento do mRNA pelo Complexo RISC



Fonte: Faculdade de Medicina da UFC (2020).

Os miRNAs extracelulares são heterogêneos, incluindo os miRNAs embalados em micropartículas (exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos) e miRNAs ligados a proteínas de ligação a RNA (AGO-2, nucleofosmina-1) e lipoproteínas de alta densidade para evitar sua degradação. Os corpos apoptóticos são as maiores micropartículas (0,5–2 µm) e são produzidos a partir de células durante a apoptose.

As microvesículas são de tamanho heterogêneo (0,1–1 µm) e são liberadas de todos os tipos de células por diferentes mecanismos. Já os exossomos são pequenas vesículas (50–100 nm) que se originam a partir do endossomo. Os resultados são confusos sobre a proporção entre miRNAs exossômicos e não exossômicos. Arroyo e colaboradores, usando centrifugação diferencial e cromatografia de exclusão por tamanho para caracterizar complexos de miRNA circulantes no plasma e soro humano, concluíram que os miRNAs associados às vesículas representam a minoria, enquanto cerca de 90% dos miRNAs na circulação estão presentes numa forma não ligada à membrana (ARROYO *et al.*, 2011). Além disso, Dijkstra *et al.* compararam os níveis de expressão de PCA3 e TMPRSS2-ERG em sedimentos e exossomos urinários e concluíram que nos exossomos esses biomarcadores tinham menor sensibilidade analítica, embora os exossomos pareçam ser uma fonte mais robusta de biomarcador urinário (DIJKSTRA *et al.*, 2014). Por outro lado, de acordo com Gallo *et al.*, o isolamento do exossomo melhora a sensibilidade do miRNA de fluidos biológicos humanos, incluindo soro e saliva (GALLO *et al.*, 2012). Além disso, Cheng *et al.* mostraram que na urina a maior proporção de miRNA foi extraída dos exossomos em comparação com o sedimento celular e o sobrenadante livre de células (CHENG *et al.*, 2013).

Avanços na tecnologia laboratorial associados com a característica de estabilidade dos miRNAs em diferentes tipos de amostras (WEBER *et al.*, 2010) permitiram identificar o papel dos miRNAs em várias doenças (LAN *et al.*, 2015). Perfis específicos de miRNAs de diferentes tipos de câncer podem ser identificados usando tecnologia de *microarrays* (microarranjos). A reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) tem sido geralmente usada para validar os miRNAs selecionados por microarranjos. O desenvolvimento da PCR digital melhorou o desempenho da RT-qPCR, sem o uso de controles endógenos ou exógenos para normalizar os resultados. Por outro lado, a PCR digital é um método direto para quantificar ácidos nucleicos, particularmente útil para amostras com miRNAs abundantes e com alto grau de sensibilidade e precisão em comparação ao RT-qPCR (MA *et al.*, 2013; WHALE *et al.*, 2012). Ademais, as plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS), como as da Solexa/Illumina e 454 Life Sciences/Roche, foram desenvolvidas para encontrar novos miRNAs, gerando um perfil de expressão completo, distinguindo miRNAs sequencialmente semelhantes e identificando mutações pontuais.

1.2.2 miRNAs e câncer

Em 2002, Calin *et al.* demonstraram que um cluster de miRNAs era frequentemente excluído ou desregulado em leucemia linfocítica crônica de células B (CALIN *et al.*, 2002). Posteriormente, vários estudos funcionais e de expressão de miRNAs mostraram que os miRNAs podem estar associados ao início e progressão do câncer. A expressão anormal de miRNAs no câncer está relacionada a diferentes mecanismos, incluindo mutações genômicas, alterações epigenéticas, anormalidades cromossômicas e alterações na biogênese do miRNA, ou seja, a expressão alterada da endoribonuclease *Dicer* no processamento do miRNA (FLETCHER; DART; BEVAN, 2014).

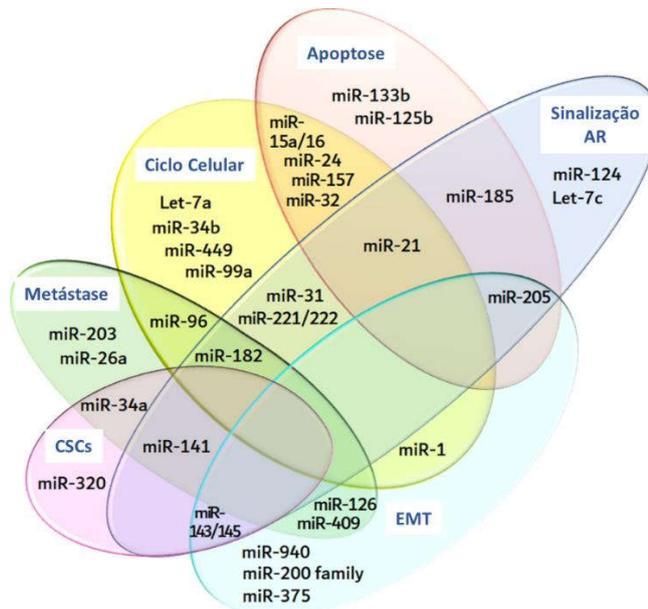
Atualmente, diferentes miRNAs estão envolvidos na carcinogênese humana agindo como "oncomirs" ou "miRNAs supressores de tumores", inibindo genes tumorais supressores ou ativando oncogenes, respectivamente (LAN *et al.*, 2015). O estudo dos perfis de expressão aberrante do miRNA no câncer é, de fato, uma maneira inovadora de identificar novos biomarcadores para detecção e prognóstico do câncer. Um crescimento exponencial de estudos foi publicado desde que o primeiro perfil de miRNA circulante foi relatado por Lawrie *et al.* em 2008 como uma ferramenta diagnóstica em oncologia (LAWRIE *et al.*, 2008). A descoberta de miRNAs em outros fluidos corporais, incluindo urina, saliva e lavagem brônquica, intensificou as investigações sobre o uso de miRNAs como biomarcadores não invasivos em pacientes com câncer (WEBER *et al.*, 2010).

Curiosamente, de acordo com os resultados disponíveis, as assinaturas de miRNAs são capazes de classificar a origem do câncer humano (LU *et al.*, 2005). A origem altamente específica de miRNAs nos tecidos leva a uma identificação eficiente de cânceres metastáticos de origem primária desconhecida. Søkilde *et al.* relataram em uma série de 208 tumores, representando 15 histologias diferentes incluindo CaP, que a expressão do miRNA em tecido parafinado pode prever com eficiência a origem primária do tumor (SØKILDE *et al.*, 2014). Os autores desenvolveram um novo algoritmo de classificação de miRNAs, obtendo uma precisão em torno de 85% (IC: 79% a 89%). Quando o algoritmo foi aplicado para testar um conjunto de 48 metástases teciduais de forma independente, o local primário foi corretamente identificado em 42 casos (88% de precisão; IC, 75%–94%). Estudos adicionais são necessários para confirmar estes achados.

1.2.3 Função dos miRNAs no câncer de próstata

A expressão alterada dos miRNAs no CaP já foi relatada por diferentes autores, mostrando sua desregulação em vários processos, incluindo proliferação celular, diferenciação e progressão (FANG; GAO, 2014; PANG; YOUNG; YUAN, 2010). Os principais miRNAs envolvidos na patogênese do CaP e suas vias de sinalização são mostrados na Figura 4. A desregulação do ciclo celular leva à proliferação celular aberrante que caracteriza o câncer. Geralmente, os miRNAs interagem com as proteínas do ciclo celular, conferindo, assim, o potencial de regular a divisão celular e a progressão do ciclo celular. Por exemplo, Lewis *et al.* relataram que o miR-888 inibe o alvo semelhante ao retinoblastoma 1, que bloqueia a primeira fase *gap* para a progressão do ciclo celular da fase sintética, ligando e inibindo os fatores de transcrição E2F (LEWIS *et al.*, 2014).

Figura 4 – Funções dos miRNAs na patogênese do CaP



CSCs (células tronco tumorais), **EMT** (transição epitélio-mesenquimal), **AR** (receptor androgênico).
Fonte: Cozar (2019).

As células tronco tumorais, ou *cancer stem cells* (CSC) são um conjunto de subpopulações de células cancerígenas na massa tumoral que desempenham um papel importante na progressão e metástase do tumor em vários tipos de câncer, incluindo CaP. As células tronco do CaP mantêm as propriedades de auto renovação e diferenciação e podem levar a mais células cancerígenas. Os miRNAs estão

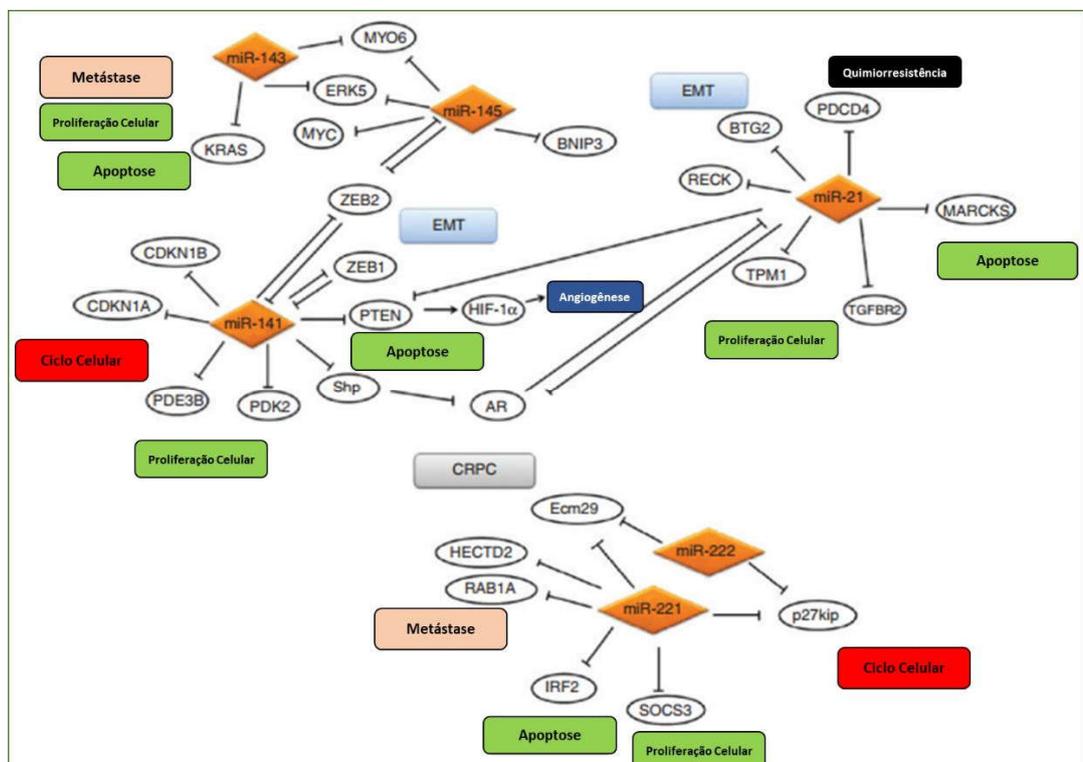
envolvidos na promoção ou inibição do desenvolvimento das CSCs. Os miRNAs excessivamente expressos podem causar a desregulação de vias de sinalização específicas associadas às funções das CSCs. Particularmente, a família miR-34 ou a família let-7 têm sido envolvidas na regulação das propriedades das CSCs no CaP (KONG *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2011).

Os miRNAs também foram relacionados na resistência à apoptose no CaP através de diferentes mecanismos. O miR-21 é geralmente aumentado no CaP e tem como alvo direto o gene *PTEN*, cuja regulação negativa resulta em apoptose significativamente reduzida no CaP. O miR-21 também regula a proteína miristoilada rica em alanina (MARCKS), conferindo resistência à apoptose e levando a uma proliferação aberrante (Figura 5) (FOLINI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2009). Outro mecanismo de regulação da apoptose dá-se através dos genes da família *Bcl-2* (encontrada principalmente no linfoma de células B), mas também no CaP. Neste caso, alguns membros da família miR-34, bem como o supressor de tumor miR-205, se dirigem diretamente aos genes *Bcl-2* no CaP regulando o processo apoptótico (KOJIMA *et al.*, 2010; VERDOODT *et al.*, 2013).

A transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*) é um processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada se submeta a múltiplas alterações bioquímicas para assumir um fenótipo de célula mesenquimal, que confere capacidade migratória aprimorada, invasividade e propriedades de células tronco (KALLURI; WEINBERG, 2009). As células cancerígenas, inclusive no CaP, são submetidas a EMT, depois invadem os tecidos circundantes e colonizam vários tecidos por via sanguínea ou linfática para gerar metástases. As células metastáticas podem então reverter através da transição mesenquimal-epitelial (MET), processo inverso à EMT, na qual recuperam as características epiteliais semelhantes às células do tumor primário. Alguns miRNAs são reguladores de eventos EMT e MET através da regulação da expressão das principais proteínas desses processos. Os membros da família miRNA-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 e miR-429) desempenham um papel crítico na regulação do processo EMT, visando e reprimindo marcadores mesenquimais como vimentina, e marcadores epiteliais de regulação positiva, como E-caderina, tendo como alvos *ZEB1* e *ZEB2*, que também são alvos diretos do miR-145 (GREGORY *et al.*, 2008; VANDEWALLE *et al.*, 2005) (Figura 5). Ren *et al.* relataram que o *ZEB2* também reprime a transcrição do miR-145, criando um loop de feedback negativo

duplo entre o *ZEB2* e o miR-145, que é uma chave no controle das propriedades EMT e das células-tronco durante as metástases ósseas do CaP (REN *et al.*, 2014). Além disso, a regulação positiva do miR-21 no CaP também desempenha um papel importante na EMT (Figura 5), diminuindo os níveis de *BTG2*, iniciando assim a aquisição de marcadores luminais e EMT (COPPOLA *et al.*, 2013). Outro gene relacionado à invasão regulado pelo miR-21 é o *RECK*, um inibidor da metaloproteinase da matriz. A neutralização do miR-21 reprime os níveis de metaloproteinase da matriz e reverte o fenótipo invasivo (REIS *et al.*, 2012). Recentemente, Wang *et al.* descobriram que a expressão do miR-573 era significativamente menor nos tecidos metastáticos do que o CaP primário correspondente. Eles demonstraram que o miR-573 modula EMT através do alvo direto do gene do receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos (*FGFR1*), promovendo a metástase das células CaP, e sugeriram o miR-573 como um potencial biomarcador e/ou alvo terapêutico no manejo clínico do CaP (WANG *et al.*, 2015).

Figura 5 – miR-21, miR-141, miR-143, miR-145, miR-221 e miR-222 na patogênese do CaP: resumo de suas funções e interações com o alvo



Fonte: Filella; Foj (2017b).

A sinalização androgênica através do receptor androgênico (AR) é uma importante via oncogênica para a progressão do CaP. Os pacientes eventualmente adquirem resistência e progridem para CaP resistente à castração (CRPC). Além disso, as interações de miRNAs com AR desempenham um papel determinante na progressão do CaP sensível à castração para um CRPC incurável (CHUNJIAO *et al.*, 2014). Vários miRNAs (miR-21, miR-31, miR-34 e miR-124) podem regular a expressão do AR e, simultaneamente, o AR pode regular a expressão de vários miRNAs (miR-21, miR-27a, miR-34, miR-125b, miR-221 e let-7) (AYUB; KAUL; AYUB, 2015). Goto *et al.* (GOTO *et al.*, 2015) recentemente demonstraram que o miR-221 e 222 foram significativamente reduzidos em amostras de CRPC, mesmo quando este *cluster* foi descrito anteriormente como sendo regulado em excesso (Figura 5) (SUN *et al.*, 2014b). Esse fato mostra o status dinâmico dos miRNAs no desenvolvimento de CaP, regulando os mesmos miRNAs diferentes alvos, dependendo do ponto da progressão do câncer. A perda do *cluster* miR-221/222, supressor de tumor, melhorou a migração e a invasão em células CaP direcionadas ao *Ecm29*, cujos mecanismos precisos nas células cancerígenas permanecem desconhecidos, mas está envolvido na invasão das células cancerígenas. Ottman *et al.*, comparando linhas celulares CaP resistentes e sensíveis ao andrógeno, identificaram 43 miRNAs que são significativamente alterados durante a progressão das células PCa para a resistência ao tratamento, sugerindo seu envolvimento no desenvolvimento de CRPC (OTTMAN *et al.*, 2014). Alterações específicas na expressão do miRNA em pacientes com CRPC podem ser usadas como uma nova ferramenta preditiva para monitorar a suscetibilidade do desenvolvimento de CRPC. Além disso, novas estratégias terapêuticas baseadas no uso de miRNA como drogas ou alvos de drogas pode ser explorado no futuro para o manejo de pacientes com CRPC.

1.2.4 Expressão de miRNAs no tecido com CaP

O primeiro estudo de expressão dos miRNAs no tecido CaP foi relatado por Volinia *et al.*, analisando 228 miRNAs em 56 tecidos de CaP e seis tecidos normais da próstata (VOLINIA *et al.*, 2006). Os autores relataram que 39 miRNAs foram regulados positivamente, enquanto seis foram regulados negativamente. Por outro

lado, Porkka *et al.*, comparando 319 miRNAs em nove tecidos de CaP e quatro HBP, mostraram que oito miRNAs estavam com regulação positiva e 22 com regulação negativa (PORKKA *et al.*, 2007). Carlsson *et al.*, avaliando 667 miRNAs, encontraram nove miRNAs que diferem consistentemente entre os tecidos malignos da próstata e os tecidos normais adjacentes de cada caso (CARLSSON *et al.*, 2011). Já o estudo de Srivastava *et al.* mostrou que miR-205, miR-214, miR-221 e miR-99b foram significativamente reduzidos nos tecidos com CaP em comparação ao tecido normal adjacente (SRIVASTAVA *et al.*, 2013).

Curiosamente, Hellwinkel *et al.* relataram sete miRNAs diferencialmente expressos em tecido prostático normal de pacientes com CaP em comparação com tecido prostático normal de pacientes com biópsia negativa (HELLWINKEL *et al.*, 2013). O conteúdo de quatro desses miRNAs (miR-185, miR-16, let-7a e let-7b) no tecido prostático normal permaneceu significativamente diferente na comparação de pacientes com CaP e pacientes com biópsia negativa e altos níveis de PSA. Os autores sugeriram que a identificação desses padrões de miRNA típicos do câncer em tecido prostático não-suspeito poderia levar à avaliação do risco de CaP pela avaliação de amostras de biópsia aparentemente livres de tumor. Já Schaefer *et al.* identificaram 15 miRNAs expressos de maneira diferente, comparando 470 miRNAs em tumores correspondentes e tecidos normais adjacentes obtidos após prostatectomia radical (SCHAEFER *et al.*, 2010). Em 2018, Paziewska *et al.* identificaram miR-183-5p, miR-32-5p e miR-141-5p regulados positivamente no CaP em comparação a amostras de tecido de pacientes com HBP, mas o miR-187-3p com expressão diminuída, a partir da análise por sequenciamento (triagem de miRNAs) e RT-qPCR (validação dos resultados) (PAZIEWSKA *et al.*, 2018). Mais recentemente, em maio de 2020, Ambrozkiwicz e colaboradores apontaram o miR-32-5p como potencial biomarcador de CaP, sendo capaz de diferenciar tecido canceroso, não-canceroso e com HBP (AMBROZKIEWICZ *et al.*, 2020). A Tabela 1 mostra alguns resultados referentes à expressão de miRNAs no tecido CaP.

Tabela 1 – Expressão de miRNAs no tecido prostático

Referência	miRNAs	miRNAs com expressão aumentada	miRNAs com expressão diminuída	Amostragem
Volinia <i>et al.</i> , 2006	228 miRNAs	let-7d, let-7i, miR-101-1, miR-106a, miR-124a-1, miR-135-2, miR-146, miR-148, miR-16-1, miR-17-5p, miR-181b-1, miR-184, -187, miR-191, -195, miR-196-1, miR-196-1, -197, -198, miR-199a-1, -199a-2, miR-203, miR-206, miR-20a, miR-21, miR-214, miR-223, miR-25, miR-26a-1, miR-27a, miR-29a, miR-29b-2, miR-30c, miR-32, miR-34a, miR-92-2, miR-93-1, miR-95	let-7a-2, miR-128a, miR-218-2, miR-29a, miR-149, miR-24-1	56 CaP e 06 controles
Porkka <i>et al.</i> , 2007	319 miRNAs	miR-202, miR-210, miR-296, miR-320, miR-370, miR-373, miR-498, miR-503	let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7g, miR-16, miR-23a, miR-23b, miR-26a, miR-92, miR-99a, miR-103, miR-125a, miR-125b, miR-143, miR-miR-145, miR-195, miR-199a, miR-199a, miR-221, miR-222, miR-497	09 CaP e 04 HBP
Schaefer <i>et al.</i> , 2010	470 miRNAs	miR-375, miR-182, miR-96, miR-183, miR-182	miR-16, miR-31, miR-149, miR-181b, miR-221, miR-222, miR-205, miR-125b, miR-145, miR-184	76 tumores combinados com tecido adjacente de pacientes pós-prostatectomia
Carlsson <i>et al.</i> , 2011	667 miRNAs	miR-622, miR-30d, miR-425, miR-342-3p	miR-126, miR-34a, miR-195, miR-26a, miR-29a	19 CaP e 19 controles
Hellwinkel <i>et al.</i> , 2013	154 miRNAs	-	miR-124a, miR-146a, miR-146b, miR-185, miR-16, let-7a, let-7b	31 tecidos normais de pacientes CaP, 17 tecidos normais de pacientes com biópsia negativa e PSA baixo e 14 tecidos com biópsia negativa e PSA de valor elevado
Srivastava <i>et al.</i> , 2013	32 miRNAs	miR-367, miR-758, miR-190	miR-221, miR-205, miR-212, miR-99b, miR-214, miR-203, miR-127-3p, miR-130a, miR-335, miR-376, miR-10a, miR-589, miR-422a, miR-10b, miR-25, miR-210, miR-99a, miR-429, miR-92a, miR-100, miR-222, miR-484, miR-125b, miR-574-3p, miR-328, miR-483-5p, miR-331-3p, miR-135a, let-7c	40 tecidos fixados em formalina e parafina, comparando tecidos com CaP e tecidos normais adjacentes
Paziewska <i>et al.</i> , 2018	123 miRNAs	miR-183-5p, miR-32-5p, miR-141-5p	miR-187-3p	34 CaP e 14 HBP (grupo de triagem); 58 CaP e 29 HBP (grupo de validação)
Ambroziewicz <i>et al.</i> , 2020	10 miRNAs	miR-32-5p	-	44 CaP e 24 HBP

Fonte: elaborada pelo autor.

1.2.5 *miRNAs circulantes no CaP*

O potencial marcador diagnóstico dos miRNAs para o CaP foi relatado pela primeira vez em 2008. Mitchell e colaboradores analisaram um perfil de miRNAs no soro de homens saudáveis e naqueles com CaP avançado (MITCHELL *et al.*, 2008). Os autores também demonstraram a presença de miRNAs circulantes derivados de tumor no sangue usando o modelo de rato com CaP. Este estudo foi o primeiro a relatar a presença de miRNAs no soro de pacientes com CaP. Posteriormente, outros estudos mostraram a utilidade dos miRNAs circulantes na detecção e prognóstico de CaP, demonstrando sua presença no soro e plasma, bem como nos exossomos e nas células mononucleares do sangue.

Os miRNAs circulantes, presentes no soro, plasma, urina e outros fluidos corporais podem ser potencialmente utilizados como biomarcadores não-invasivos para diversas doenças humanas, permanecendo estáveis em diversos tipos de amostras biológicas, bem como suportando ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento para fins de armazenamento laboratorial (CORTEZ *et al.*, 2011; MITCHELL *et al.*, 2008). Alguns miRNAs específicos de tecidos com câncer são capazes de ser liberados na circulação e esses miRNAs circulantes presentes no soro ou plasma podem ser usados como novos biomarcadores para diversos tipos de câncer. No entanto, um método para medir a quantidade absoluta de miRNA no sangue ainda não está bem estabelecido, devido à falta de controle endógeno de RNA estável neste tecido, especialmente sob condições de doença (CHENG *et al.*, 2010).

A notável estabilidade de miRNAs em amostras de plasma sanguíneo levantou questões importantes sobre o mecanismo pelo qual os miRNAs são protegidos da atividade de RNases endógenas. Resultados preliminares mostraram que miRNAs têm uma incomum alta estabilidade em tecidos fixados em formalina, plasma e soro. Esta estabilidade pode ser explicada pela associação de miRNAs a lipoproteínas de alta densidade (HDL), proteção por meio de outras moléculas (RNA-complexo de proteínas), modificações nos miRNAs que os tornam resistentes a atividade de RNases endógenas ou associação dos miRNAs a microvesículas, tais como exossomos (MITCHELL *et al.*, 2008).

Uma vez que os miRNAs têm sido mostrados associados a proteínas, tais como a família Argonauta 2 (AGO2) na formação do complexo de silenciamento induzido por RNA, é possível que os miRNAs circulantes também se liguem a algumas

proteínas desconhecidas, que por sua vez estabilizam os miRNAs em condições adversas, incluindo a digestão por RNase, temperaturas extremas e pH. Pesquisas voltadas para identificação de potenciais proteínas que se ligam aos miRNAs circulantes tem sido realizadas, no entanto, a natureza das proteínas ligantes a miRNAs circulantes permanece não identificada (ZEN; ZHANG, 2012).

A proteção dos miRNAs circulantes no plasma/soro contra as RNases endógenas também pode ser explicada pela associação destes miRNAs com microvesículas, por exemplo, os exossomos. Os exossomos, envolvidos no transporte dos miRNAs entre as células, são nanovesículas esféricas formadas por uma membrana bicamada de tamanho entre 50-90 nm (VAN NIEL *et al.*, 2006), abundante no plasma e bem conhecidos na participação da mediação do sistema imunitário por meio da apresentação de antígenos (CABY *et al.*, 2005). Elas são secretadas pela membrana endossomal de células hematopoéticas ou não-hematopoiéticas. Já foi relatada a presença de miRNAs e mRNAs em exossomos, mais especificamente nos exossomos derivados de mastócitos (LEE *et al.*, 2010).

Vários estudos identificaram assinaturas de miRNAs circulantes específicos para detecção e prognóstico de CaP, utilizando a tecnologia de *microarrays*. Estas assinaturas de miRNAs, propostas como painéis de miRNAs, apresentaram diferenças substanciais, sendo que apenas o miR-141, miR-375 e miR-21 aparecem repetidamente entre os estudos. Neste aspecto, os painéis desenvolvidos diferem significativamente entre si, provavelmente devido aos vários tipos de amostra e plataformas de detecção utilizadas, tamanho amostral e desenho do estudo, diferenças étnicas entre os indivíduos analisados e escore de malignidade do CaP. Essas diferenças também são encontradas nos miRNAs sugeridos como biomarcadores de CaP em estudos baseados na tecnologia de RT-qPCR.

Ademais, diversos autores demonstraram o papel dos biomarcadores urinários no manejo do CaP. Teoricamente, a urina é uma amostra biológica em potencial na obtenção de novos biomarcadores de CaP, devido à localização anatômica da próstata em relação à uretra, o que possibilita encontrar células cancerígenas esfoliadas ou produtos secretados através do sistema ductal prostático. De acordo com Weber *et al.*, a concentração e o número de miRNAs detectáveis na urina são mais baixos que no plasma, sugerindo que eles sejam eliminados nos rins ou destruídos em parte na urina (WEBER *et al.*, 2010). No entanto, o enriquecimento da urina com células prostáticas através da realização de uma massagem prostática

prévia à coleta urinária é uma maneira de aumentar a presença de biomarcadores da próstata, melhorando a precisão do teste (HESSELS *et al.*, 2003). Além disso, métodos para obter RNA com base no enriquecimento de RNAs curtos, bem como etapas de pré-amplificação antes de se realizar a RT-qPCR podem ser necessários para medir adequadamente os miRNAs na urina. Outra vantagem em utilizar urina como fonte de miRNAs, refere-se a seu baixo conteúdo de proteínas em relação ao soro e plasma, reduzindo interferências no isolamento dos miRNAs (MLCOCHOVA *et al.*, 2015).

A maioria dos estudos têm utilizado o *pellet* (sedimento pós-centrifugação) de urina para pesquisa dos miRNAs, mas a urina total e a fração livre de células também têm sido usadas, geralmente após o DRE. De acordo com Cheng *et al.*, miRNAs já foram significativamente enriquecidos e encontrados intactos nos exossomos derivados da urina em comparação com a fração de urina livre de células (CHENG *et al.*, 2014). De fato, os exossomos urinários têm sido investigados como uma fonte robusta de biomarcadores de urina, mostrando a presença de altos níveis de PCA3 e TMPRSS2-ERG após o DRE (DIJKSTRA *et al.*, 2014). A presença de exossomos na urina foi relatada pela primeira vez em 2004 por Pisitkun e colaboradores, tornando-se um campo promissor como novos biomarcadores (PISITKUN; SHEN; KNEPPER, 2004). Mais recentemente, alguns estudos apontaram os miR-21, miR-141-5p, miR-375 e miR-574-5p significativamente aumentados em pacientes com PCa (FOJ *et al.*, 2017; SAMSONOV *et al.*, 2016). Entretanto, ainda existem dificuldades de padronização do método de extração destas microvesículas a partir da urina, o que pode comprometer a validade dos resultados.

HIPÓTESES DO TRABALHO

Baseado na ausência de conhecimento do perfil de miRNAs circulantes na população de indivíduos com CaP no Sul do país e na necessidade de buscar um biomarcador molecular não invasivo para auxiliar no diagnóstico de CaP, a hipótese principal deste estudo foi:

O câncer de próstata resulta em alterações específicas na expressão diferencial de miRNAs, as quais podem ser detectadas no tecido prostático, sangue e urina, possibilitando o uso como biomarcadores de rastreamento de CaP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi identificar biomarcadores moleculares (microRNAs) diferentemente expressos em pacientes com câncer de próstata que posteriormente possam ser utilizados para o rastreamento não invasivo do carcinoma prostático.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar o perfil de miRNAs diferentemente expressos no CaP em amostras de tecido prostático, plasma sanguíneo e urina de pacientes atendidos em um hospital universitário do Sul do Brasil.
- Implementar e validar a tecnologia de quantificação de miRNAs baseada na reação de amplificação de ácidos nucleicos.
- Analisar os miRNAs identificados como potenciais biomarcadores de rastreamento de CaP.
- Contribuir para uma nova abordagem de rastreamento não invasivo de CaP baseada na identificação de miRNAs.

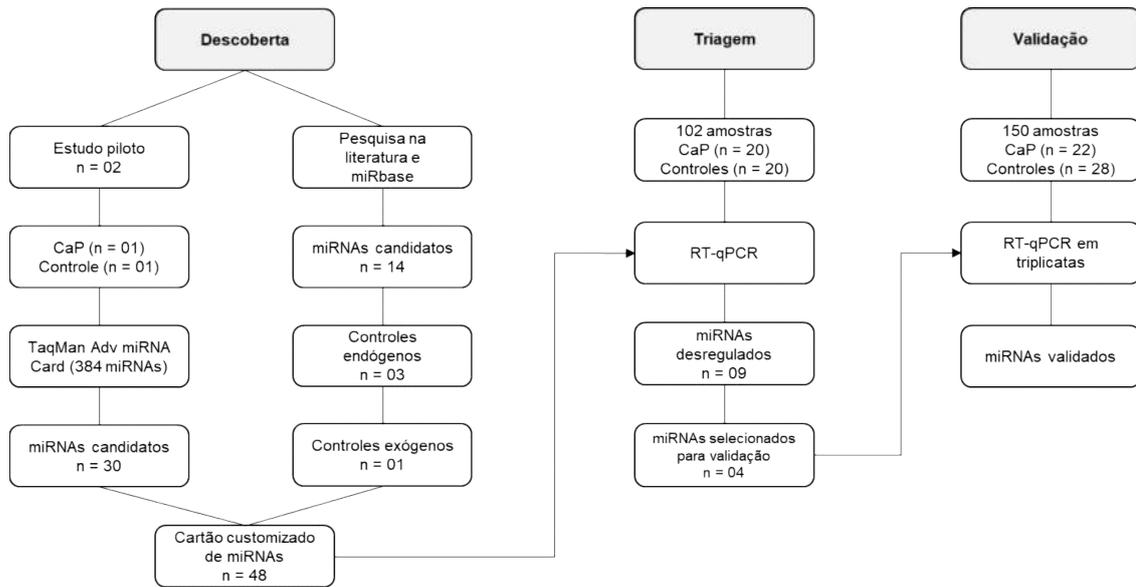
3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

3.1 População e desenho do estudo

O estudo foi do tipo caso-controle, desenvolvido ao longo de 48 meses, avaliando indivíduos adultos do sexo masculino atendidos no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com indicação de realizar exame de biópsia de próstata. Utilizou-se uma amostragem não probabilística, amostra por conveniência, na qual se define pela disponibilidade de amostras e de exequibilidade do estudo. Neste caso, foram coletadas amostras de tecido prostático, urina e sangue de 70 pacientes que foram atendidos no HCPA, no período de novembro de 2016 a junho de 2018, após aplicação do termo de consentimento informado nestes indivíduos.

Este estudo foi realizado com três conjuntos de amostras, divididos nas fases de *descoberta*, *triagem* e *validação* dos miRNAs. A fase de descoberta caracteriza-se pela execução de um ensaio molecular piloto, utilizando uma amostra de tecido prostático com CaP de escore de Gleason 7 e presença de 100% de células tumorais e uma amostra de tecido prostático não canceroso (0% de células tumorais), analisadas e classificadas por um especialista em histopatologia do HCPA. Ainda nesta fase foi realizada uma busca ativa na literatura científica por estudos de revisão publicados no PubMed no período de maio de 2016 a setembro de 2017 e em bases de dados de miRNAs (MIRBASE, 2017) para verificar quais os miRNAs mais associados ao diagnóstico de CaP. A fase de triagem compreendeu um total de 102 amostras (28 tecidos, 34 plasmas e 40 urinas) provenientes de 20 pacientes com CaP e 20 indivíduos controles, as quais foram testadas frente aos miRNAs selecionados na primeira fase. Já a fase de validação incluiu as 102 amostras anteriores adicionadas a 48 amostras de outros 10 indivíduos, totalizando 150 amostras de 22 pacientes com CaP e 28 amostras controles, das quais foram utilizadas para validar os miRNAs encontrados na segunda fase. Para todas as fases foram realizados ensaios moleculares de RT-qPCR para avaliação dos miRNAs, sendo posteriormente descrito nesta seção. A Figura 6 abaixo descreve resumidamente o desenho experimental desta pesquisa, sendo melhor especificado ao longo do texto.

Figura 6 – Fluxograma do desenho do estudo



Fonte: elaborada pelo autor.

3.2 Critérios de inclusão e exclusão

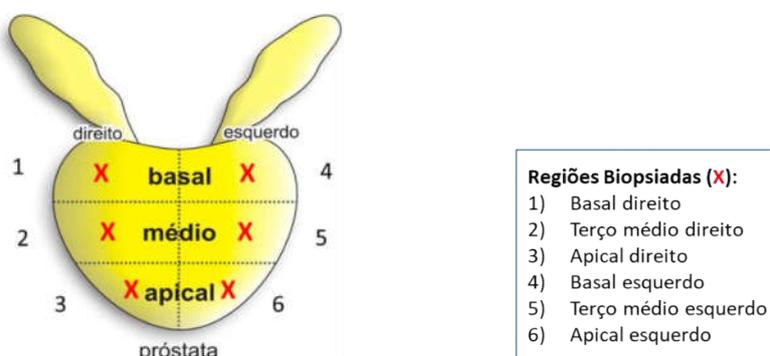
Foram incluídos no estudo os indivíduos do sexo masculino que tiveram indicação clínica de realizar biópsia prostática após apresentarem DRE ou exame laboratorial de PSA indicativos de anormalidade do funcionamento da próstata. Foram excluídos do estudo os indivíduos com diagnóstico de outros carcinomas.

3.3 Coleta do material biológico

A coleta do material biológico foi realizada em dois momentos. Primeiramente, os pacientes com agendamento para o exame de biópsia prostática, realizado no Centro Cirúrgico Ambulatorial do HCPA, foram entrevistados previamente ao exame e aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A). Com a concordância do paciente em participar do estudo foi realizado o preenchimento de um questionário estruturado (APÊNDICE B), objetivando a coleta de informações precisas para subsidiar esta pesquisa, tais como idade, resultado do último exame de PSA, história familiar de CaP e tabagismo. Após isso foi sinalizado ao médico

urologista responsável pelo exame de biópsia que o paciente fazia parte do estudo, estando apto para coleta das amostras. O procedimento médico incluiu a aplicação de uma massagem prostática no paciente para subsequente coleta de urina e posterior coleta dos fragmentos de tecido através da biópsia. O médico aplica uma pressão na próstata, da base em direção ao ápice, três vezes em cada lobo (esquerdo e direito). A massagem prostática libera as células epiteliais da próstata através do ducto prostático para o trato urinário. Após este procedimento foi solicitado para o paciente fazer a coleta de urina (aproximadamente 30 mL) em um recipiente estéril. Na sequência, o médico realiza o exame de biópsia, na qual secciona virtualmente a porção anterior da próstata (em frente ao reto) em seis quadrantes e, através da introdução de uma sonda de ultrassom acoplada a uma agulha, biopsia dois fragmentos de cada quadrante para o exame anatomopatológico, podendo retirar mais fragmentos, se necessário. Para este estudo foi solicitado um fragmento de biópsia extra de cada um dos seis quadrantes, totalizando em média, 18 fragmentos de tecido retirados durante o exame (12 para o exame assistencial e 06 para este estudo). Os seis tecidos biopsiados para o estudo foram colocados individualmente em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL contendo 300 μ L de RNA *later* (solução estabilizadora de RNA), todos devidamente identificados com nome do paciente e região do quadrante biopsiado (Figura 7). Os demais fragmentos de tecido compuseram o exame histopatológico de câncer do paciente, sendo enviados ao Serviço de Patologia do HCPA para análise.

Figura 7 – Desenho esquemático dos sextantes da próstata na biópsia guiada por ultrassom



Fonte: elaborada pelo autor.

Em um segundo momento, quando o paciente retorna ao HCPA para sua reconsulta no Serviço de Urologia (aproximadamente duas semanas após a realização do exame de biópsia), foram coletados à vácuo 4 mL de sangue total do paciente em um tubo contendo anticoagulante EDTA. A coleta sanguínea foi previamente agendada com o paciente, sendo realizada no Centro de Pesquisas Clínicas da mesma instituição. Todos os materiais biológicos coletados para este estudo (num primeiro momento urina e tecido biopsiado e, posteriormente, sangue) foram imediatamente enviados ao Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Diagnóstico Especializado do HCPA para serem prontamente processados e armazenados para análise posterior.

A partir dos resultados do exame anatomopatológico, este estudo dividiu os pacientes em dois grupos (casos e controles). Os pacientes com resultado de biópsia positiva para CaP foram classificados como casos (pacientes com CaP), e os pacientes com biópsia negativa considerados os controles (pacientes sem CaP). Interpreta-se o resultado de uma biópsia positiva para CaP, quando qualquer um dos fragmentos de tecido prostático enviados ao exame assistencial anatomopatológico é identificado pelo médico patologista com uma amostra contendo células cancerígenas, podendo necessitar exames complementares como o teste imunohistoquímico. Além disso, a análise histopatológica do material permite a classificação do grau de malignidade tecidual em 5 escores de Gleason, de acordo com o status de diferenciação das células presentes no fragmento analisado (EPSTEIN *et al.*, 2005). Ademais, de modo a evitar a inclusão equivocada de pacientes nos dois grupos, foram avaliados prospectivamente os prontuários de cada paciente para confirmação ou não da neoplasia até o início das análises quantitativas de miRNAs.

3.4 Processamento e armazenamento das amostras

Após a coleta de urina, as amostras foram concentradas por centrifugação refrigerada (10 min, 2000 rpm, 4°C) utilizando um tubo tipo Falcon de 50 mL para obtenção do sedimento urinário. Após a centrifugação, um *pellet* de células formou-se no fundo do tubo tipo Falcon. O líquido sobrenadante foi retirado, deixando cerca de 1 mL para ressuspensão do *pellet* para, em seguida, estocar em freezer a -20°C por 24h e, posteriormente, à -80°C na Unidade de Diagnóstico Especializado do HCPA

até o momento da extração do RNA. Já as amostras originadas da biópsia apresentaram um peso aproximado de 20-30 mg de tecido, sendo armazenadas em uma solução estabilizadora de RNA (RNA *later*, Ambion, EUA) imediatamente a 4°C, e 24 horas mais tarde estocadas em freezer a -80°C no mesmo laboratório até o momento de execução das extrações dos ácidos nucleicos.

As amostras de sangue total coletadas foram centrifugadas a 1.300g por 20 minutos a 10°C, seguido de uma nova centrifugação de 15.500g por 10 minutos a 10°C. Após este processo, o plasma foi separado, transferido para tubos de 1,5 mL do tipo *ependorf* e congelados a temperatura de -80°C até a etapa de extração de RNA total. Todas as etapas de processamento até a estocagem dos materiais foram realizadas no intervalo de 2 horas após a coleta, evitando assim, a degradação de RNA.

3.5 Extração de RNA

As amostras teciduais de próstata, urina e plasma foram extraídas para obtenção do RNA a partir de dois kits comerciais: *mirVana Paris RNA and Native Protein Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) e *MagMAX mirVana Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA), baseados nos métodos de extração por sílica e micropartículas magnéticas, respectivamente. O RNA total das amostras de tecido e plasma foi extraído utilizando o kit *mirVana Paris RNA and Native Protein Purification* (Thermo Fisher Scientific, USA), partindo de um fragmento de tecido homogeneizado em 450 µL de tampão de ruptura celular (fornecido pelo kit), sendo que para plasma também foi utilizado o volume inicial de 450 µL. Já o RNA total do sedimento urinário foi extraído utilizando o kit *MagMAX mirVana* (Thermo Fisher Scientific, USA) com um volume inicial 200 µL de amostra. O RNA proveniente das amostras de tecido e plasma foi eluído em 100 µL de tampão de eluição, sendo que as amostras de urina foram eluídas em 50 µL com o mesmo tampão, ambos fornecidos pelos kits. Todas as etapas de isolamento e purificação do RNA foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante do kit.

Considerando que foram coletados 6 fragmentos de tecido prostático por paciente para o estudo, foi estabelecido um critério para selecionar qual fragmento tecidual utilizar para etapa de extração de RNA e, conseqüentemente, toda a análise

dos miRNAs. Antes da extração de RNA foi selecionado o fragmento de tecido com maior percentual de células neoplásicas, baseado no laudo anatomopatológico, quando o paciente tinha diagnóstico positivo para CaP. Para as amostras dos pacientes do grupo controle foi utilizado o primeiro fragmento biopsiado no exame (fragmento do quadrante ápice direito).

Durante a etapa de extração de RNA, em todas as amostras clínicas descritas (plasma, urina e tecido da próstata) foi adicionada uma solução de RNA exógeno, *Caenorhabditis elegans* miR-39 (cel-miR-39), obtendo-se uma concentração final de 0,1 pM de cel-miR-39 em cada amostra a ser extraída. A finalidade deste procedimento foi utilizar este RNA sintético como controle interno do ensaio de RT-qPCR, verificar a eficiência do processo de extração, bem como ser um candidato a normalizador do ensaio molecular. Neste caso, um controle exógeno é um oligonucleotídeo de RNA sintético com uma sequência alvo de miRNA que não está presente na amostra humana a ser analisada.

Além disso, a concentração e a qualidade do RNA derivadas de todas as amostras foram avaliadas usando o espectrofotômetro *NanoDrop Lite* (Thermo Fisher Scientific, EUA). O RNA de qualidade comprovada foi imediatamente utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA) ou armazenado a -80°C até o uso.

3.6 Síntese de cDNA e pré-amplificação

O processo de síntese de cDNA chama-se transcrição de RNA, no qual o RNA total (incluindo a porção dos miRNAs) contido nas amostras extraídas é transcrito para cDNA através do uso da enzima transcriptase reversa. Entretanto, devido ao tamanho pequeno do miRNA, foram adicionados uma cauda poli (A) na posição 3' e um adaptador na posição 5' para aumentar o tamanho do miRNA para as próximas etapas, evitando sua degradação. A cauda poli (A) é uma sequência de adenosinas na qual posteriormente os *primers* universais de transcrição reversa ligam-se para a síntese do cDNA. Após a formação do cDNA foi realizada a reação de pré-amplificação utilizando *primers* direto e reverso com o objetivo de aumentar o número de moléculas cDNA na amostra. Estas etapas de síntese de cDNA e pré-amplificação foram realizadas com o kit *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis* (Thermo Fisher Scientific, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.7 PCR em tempo real para avaliação da expressão dos miRNAs

3.7.1 Fase de descoberta e customização do cartão de miRNAs

Devido ao grande número de miRNAs humanos já descritos na literatura científica (mais de 4 mil miRNAs), inicialmente, foi realizado um ensaio piloto para a seleção dos miRNAs mais relacionados ao CaP e com potencial diagnóstico, usando a plataforma *TaqMan Advanced miRNA Human A* (Cat. Nº A34714, *Applied Biosystems*, EUA). Esta plataforma foi desenvolvida para realização do ensaio de RT-qPCR, utilizando um cartão de 384 poços microfluídicos, contendo *primers* e sondas *TaqMan* desidratadas. O cartão A comercial, também denominado *array A*, contém os principais miRNAs já descritos na literatura científica, sendo capaz de detectar até 384 miRNAs humanos de uma única vez. A presença do alvo é detectada em tempo real através da clivagem da sonda *TaqMan* pela atividade exonuclease 5'-3' da polimerase. A expressão relativa dos 384 miRNAs foi avaliada em duas amostras de tecidos da próstata (uma amostra com CaP e outra controle) em dois cartões A de miRNAs (um para cada amostra) para verificar a expressão diferencial de miRNAs nos tecidos da próstata.

Para o ensaio piloto, 2 µL de RNA previamente extraído (10 ng do RNA total) foram transcritos de forma reversível em cDNA e pré-amplificados usando o kit de síntese de cDNA de *miRNA TaqMan Advanced* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. A reação de transcrição foi composta com ligação 3' poli (A) e ligação 5' de uma sequência adaptadora para estender os miRNAs maduros, para que essas sequências pudessem ser reconhecidas por iniciadores de transcrição reversa universal. Cinco microlitros de cDNA produzidos foram pré-amplificados com *miR-Amp Master Mix* e *primers* universais de miR-Amp (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) que reconhecem miRNAs nas extremidades 5' e 3' e depois diluídos dez vezes com tampão TE 0,1X (pH 8,0) antes da amplificação. Ao todo, 200 µL de cDNA pré-amplificado diluído foram amplificados em 800 µL de volume de reação qPCR usando o *TaqMan Fast Advanced Master Mix 2X* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) e pipetados nos 384 poços do cartão, de acordo com o protocolo do fabricante. Aproximadamente 1 µL de volume de reação permanece em cada um dos poços após selagem e centrifugação do cartão. As reações de RT-qPCR foram realizadas no termociclador *ViiA™ 7 Fast Real Time PCR System* (*Applied*

Biosystems, EUA), utilizando o bloco *TaqMan Low Density Array* (TLDA). As condições de ciclagem térmica foram de 92°C por 10 minutos, seguidas de 40 ciclos de 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos. Por fim, após a análise do perfil global dos miRNAs usando o software *ViiA 7* (*Applied Biosystems*, EUA), foram selecionados aqueles que apresentaram expressão alterada entre as amostras e com maior significância clínica para comporem um cartão customizado de miRNAs.

Além dos miRNAs selecionados no ensaio piloto, foi realizada uma busca ativa na literatura científica e base de dados de miRNAs para seleção dos miRNAs mais associados ao diagnóstico de CaP. Foram selecionados 269 artigos de revisão científica publicados no PubMed entre maio de 2016 e setembro de 2017, utilizando o descritor “*miRNA prostate cancer review*” com o objetivo de buscar os miRNAs diferentemente expressos mais relevantes no CaP. Neste mesmo período também foi consultado o banco de dados do miRbase v21.0 para complementar a pesquisa.

Com base nos miRNAs mais diferentemente expressos encontrados no ensaio piloto, bem como na literatura científica e base de dados miRbase, foram selecionados 44 miRNAs possíveis candidatos a biomarcadores moleculares para CaP. Além destes 44 alvos foram incluídos 03 miRNAs (miR-16-5p, miR-24-3p e miR-191-5p) como candidatos a controle endógeno do ensaio e o cel-miR-39 como controle exógeno, resultando na customização de um cartão comercial de 48 miRNAs a ser utilizado na fase de triagem (TABELA 2).

Tabela 2 – Cartão *TaqMan* customizado contendo as principais informações sobre os 48 miRNAs selecionados

Número do poço	Identificação do Ensaio ^a	Identificação do miRBase ^b	Sequência de RNA
1	478577_mir	hsa-let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
2	478214_mir	hsa-miR-9-5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
3	478491_mir	hsa-miR-204-5p	UCCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU
4	478551_mir	hsa-miR-18a-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG
5	478584_mir	hsa-miR-18b-5p	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUUAG
6	479228_mir	hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA
7	478264_mir	hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA
8	477975_mir	hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
9	477992_mir	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
10	478008_mir	hsa-miR-30c-5p	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC

11	477860_mir	hsa-miR-16-5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
12	478224_mir	hsa-miR-100-5p	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG
13	477865_mir	hsa-miR-105-5p	UCAAUUGCUCAGACUCCUGUGGU
14	478254_mir	hsa-miR-107	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA
15	477855_mir	hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
16	477879_mir	hsa-miR-124-3p	UAAGGCACGCGGUGAAUGCC
17	477896_mir	hsa-miR-129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
18	477906_mir	hsa-miR-139-3p	UGGAGACGCGGCCUGUUGGAGU
19	478501_mir	hsa-miR-141-3p	UACACUGUCUGGUAAGAUGG
20	477814_mir	hsa-miR-148a-3p	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
21	477938_mir	hsa-miR-184	UGGACGGAGAACUGAUAAAGGGU
22	477941_mir	hsa-miR-187-3p	UCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGG
23	478358_mir	hsa-miR-190a-5p	UGAUUGUUUGAUUAUUAGGU
24	477952_mir	hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG
25	477963_mir	hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA
26	477967_mir	hsa-miR-205-5p	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG
27	477974_mir	hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU
28	477976_mir	hsa-miR-216a-5p	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA
29	477981_mir	hsa-miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
30	478790_mir	hsa-miR-296-3p	GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC
31	478074_mir	hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
32	478561_mir	hsa-miR-449 ^a	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
33	478335_mir	hsa-miR-496	UGAGUAUUACAUGGCCAAUCUC
34	478960_mir	hsa-miR-507	UUUUGCACCUUUUGGAGUGAA
35	479485_mir	hsa-miR-517a-3p hsa-miR-517b-3p	AUCGUGCAUCCCUUAGAGUGU
36	478993_mir	hsa-miR-522-3p	AAAAUGGUUCCCUUAGAGUGU
37	480872_mir	hsa-miR-548am-5p hsa-miR-548c-5p hsa-miR-548o-5p	AAAAGUAAUUGCGUUUUUGCC
38	478160_mir	hsa-miR-561-3p	CAAAGUUUAAGAUCUUGAAGU
39	478163_mir	hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACCCACA
40	479059_mir	hsa-miR-579-3p	UUCAUUUGGUAAUAAACCGGAUU
41	479073_mir	hsa-miR-589-5p	UGAGAACCACGUCUGCUCUGAG
42	479108_mir	hsa-miR-624-3p	CACAAGGUAAUUGGUUUUACCU

43	479121_mir	hsa-miR-642a-5p	GUCCCUCUCCAAAUGUGUCUUG
44	478368_mir	hsa-miR-654-5p	UGGUGGGCCGCAGAACAUUGUC
45	478194_mir	hsa-miR-671-3p	UCCGGUUCUCAGGGCUCCACC
46	478207_mir	hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
47	479192_mir	hsa-miR-888-5p	UACUCAAAAAGCUGUCAGUCA
48	478293_mir	cel-miR-39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

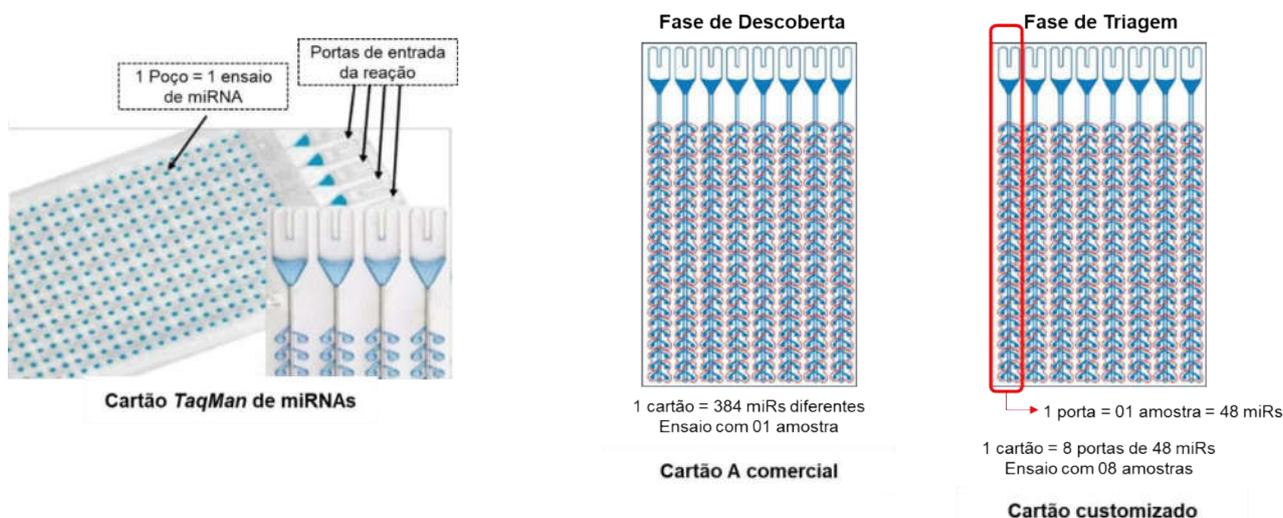
^a Número de referência do ensaio no catálogo de miRNAs da Thermo Fischer Scientific; ^b Identificação do miRNA no *miRBase* v21.0; hsa=homem sapiens; cel=*Caenorhabditis elegans*.

Fonte: elaborada pelo autor.

3.7.2 Fase de triagem

A fase de triagem ou *screening* se caracterizou pelo uso dos cartões customizados de 48 alvos em amostras de tecido prostático, urina e plasma com o objetivo de identificar e quantificar os miRNAs entre os pacientes com CaP e controles. Para os ensaios moleculares desta fase, foram utilizados os mesmos processos de transcrição de RNA, pré-amplificação e diluição do cDNA produzido, conforme a primeira fase. A única diferença foi que na primeira fase foram utilizados cartões comerciais de miRNAs, no qual em cada cartão foi testada uma única amostra. Já na fase de triagem, em um cartão de 384 poços foi possível testar até oito amostras diferentes, já que para cada porta de entrada foram customizados 48 miRNAs, conforme ilustração comparativa (Figura 8). Desta forma, em cada porta foram preparados 25 µL de cDNA pré-amplificado diluído, sendo amplificados em 100 µL de volume de reação qPCR usando o *TaqMan Fast Advanced Master Mix 2X* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. As demais etapas do ensaio, bem como as condições de ciclagem térmica foram as mesmas da primeira fase, utilizando o mesmo equipamento Viia 7.

Figura 8 – Desenho comparativo dos cartões A comercial (384 miRs) e customizado (48 miRs)



Fonte: elaborado pelo autor.

3.7.3 Fase de validação

Esta fase compreende a análise molecular dos miRNAs mais diferentemente expressos entre os casos e controles obtidos na fase de triagem, e que seus níveis de expressão precisam ser confirmados, ou seja, validados. Quatro miRNAs foram selecionados da segunda fase para fase de validação, na qual consiste a realização de ensaios de RT-qPCR em triplicatas, seguindo as diretrizes do MIAME e MIQE (BRAZMA *et al.*, 2001; BUSTIN *et al.*, 2009), bem como os miRNAs a serem utilizados como controles do ensaio (Tabela 3). Os critérios para a escolha desses miRNAs foram: (1) miRNAs mais diferencialmente expressos entre o grupo PCa e os controles; (2) aqueles miRNAs encontrados em mais um tipo de amostra da fase de triagem e (3) miRNAs não descritos na literatura de referência.

Tabela 3 – miRNAs alvos e genes de referência selecionados para fase de validação

Identificação do Ensaio ^a	Identificação do miRBase ^b	Sequência de RNA
477975_mir	hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
477992_mir	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
477963_mir	hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA
478074_mir	hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
480872_mir	hsa-miR-548a-5p hsa-miR-548c-5p hsa-miR-548o-5p	AAAAGUAAUUGCGGUUUUUGCC
478293_mir	cel-miR-39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

^a Número de referência do ensaio no catálogo de miRNAs da Thermo Fischer Scientific; ^b Identificação do miRNA no *miRBase* v21.0; hsa=homem sapiens; cel=*Caenorhabditis elegans*.

Fonte: elaborada pelo autor.

Os ensaios de RT-qPCR foram realizados em três etapas: primeiro, o RNA total foi transcrito reversamente em cDNA; segundo, o cDNA foi pré-amplificado e, terceiro, um cDNA diluído foi amplificado por RT-qPCR. As duas primeiras etapas usaram os mesmos protocolos executados nas duas fases anteriores. Na etapa de amplificação, os miRNAs selecionados foram testados em triplicatas, usando 0,5 µL dos ensaios de TaqMan miRNA 20X (*Thermo Fischer Scientific*, EUA), 5 µL de *TaqMan Fast Advanced Master Mix 2X* (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), 2,5 µL de cDNA diluído (1:10) e 2 µL de água livre de RNase, em um total de 10 µL de reação. Cada amostra foi testada com um gene de referência previamente selecionado na fase de triagem e um controle negativo foi incluído em cada experimento. O qPCR foi realizado no termociclador *ViiA™ 7 Fast Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*, EUA), utilizando as seguintes condições de amplificação: 95°C por 20 segundos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos. A quantificação relativa dos quatro miRNAs alvo foi avaliada usando o método do limiar do ciclo comparativo, descrito abaixo.

3.8 Análise dos resultados, normalização e análise estatística

Para análise dos dados de RT-qPCR, os valores de ciclo de quantificação (Cq) foram determinados usando o *software* v1.2.1 do equipamento *ViiA™ 7*, tendo como parâmetros o *baseline* (Cq 3-15) e *threshold* automáticos. As expressões relativas dos

miRNAs das amostras das fases de triagem e validação foram calculadas usando o método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008) e a expressão foi considerada detectada quando os valores de Cq fossem ≤ 35 . Todos os resultados foram mostrados como alterações n vezes em relação a uma amostra calibradora.

Neste estudo foram preparadas três amostras calibradoras (calibradores), uma para cada espécime clínico (tecido, plasma e urina), a partir de um *pool* de RNAs extraídos, tanto de amostras de pacientes com CaP, quanto amostras de indivíduos controles.

De acordo com o método proposto por Livak *et al.*, a expressão relativa dos miRNAs foi calculada com base nas etapas abaixo:

- a) Primeiro foi normalizado o Cq do miRNA alvo em relação ao miRNA normalizador (miR de referência), tanto para amostra teste quanto para o calibrador:

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

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

- b) Posteriormente, normalizou-se o ΔCq da amostra em relação ao ΔCq do calibrador:

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{(amostra)} - \Delta Cq_{(calibrador)}$$

- c) Finalmente, calculou-se a razão de expressão:

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

O resultado da razão de expressão obtida é dado em *fold change* (número de vezes) em que o miRNA alvo está aumentado ou diminuído na amostra em relação ao calibrador, sendo ambos normalizados pela expressão do miRNA de referência.

Na fase de descoberta dos miRNAs foi realizada a normalização global dos resultados, utilizando o *software* v1.2.1 do equipamento *ViiA™ 7*, já que nesta etapa piloto dos experimentos ainda não havia sido definido um miRNA normalizador. A normalização global faz uma média de todos os resultados de Cq para ser utilizada como um resultado a normalizar os resultados individuais de Cq (MESTDAGH *et al.*, 2009). Para normalização dos resultados obtidos nas fases de triagem e validação, os miRNAs candidatos a normalizadores (miR-16-5p, miR-24-3p, miR-191-5p ou cel-miR-39) com o menor índice de variação entre as amostras, conforme identificado

pelo software da *Applied Biosystem™ Analysis (Thermo Scientific, EUA)* nos cartões TLDA, foram escolhidos como controles endógenos. Os níveis de expressão dos miRNAs das amostras de tecido e plasma foram normalizados com miR-24-3p. Já o controle exógeno cel-miR-39 foi usado como gene de referência para amostras de urina.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o pacote estatístico SPSS (v.18.0) para Windows (SPSS, 2009). Os dados categóricos foram descritos em porcentagem. A distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis com distribuição assimétrica foram transformadas em \log_2 antes das análises e estão apresentadas como mediana (percentis 25-75). As diferenças nos níveis de miRNA entre os grupos de amostras foram avaliadas usando o teste *t* de *Student* ou o teste U de *Mann-Whitney*, conforme apropriado. Para investigar o poder discriminatório dos miRNAs desregulados entre as amostras de pacientes com CaP e os indivíduos controle, foram geradas curvas ROC (*receiver-operating characteristic*) e calculadas as áreas sob as curvas (*areas under the curves* – AUCs). Para combinação dos biomarcadores foi aplicada a análise de regressão logística. Diferenças estatisticamente significantes foram estabelecidas em $P < 0,05$.

3.9 Aspectos éticos e segurança no trabalho

O trabalho foi realizado em concordância com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que regulamenta a pesquisa em seres humanos. A autorização dos pacientes para a inclusão no estudo foi obtida pela assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

Procedimentos padronizados de biossegurança foram utilizados em todas as etapas experimentais e incluíram, fundamentalmente, uso de luva e avental. Materiais contaminados e/ou potencialmente tóxicos foram descartados conforme as regras do Serviço de Diagnóstico Laboratorial do HCPA, recomendadas para cada caso. Desse modo foi assegurada a segurança do pesquisador e do meio ambiente.

7 REFERÊNCIAS

AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS. **Cancer Facts and Figures**. EUA, 2020. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2020/cancer-facts-and-figures-2020.pdf>. Acesso em: 05 ago.2020.

AMBROZKIEWICZ, F. et al. Challenges in Cancer Biomarker Discovery Exemplified by the Identification of Diagnostic MicroRNAs in Prostate Tissues. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

ANDRIOLE JR, G. L. PSA screening and prostate cancer risk reduction. **Urologic Oncology**, v. 30, n. 6, p. 936–937, 2012.

ARISAN, E. D. et al. Upregulated Wnt-11 and miR-21 expression trigger epithelial mesenchymal transition in aggressive prostate cancer cells. **Biology**, v. 9, n. 3, 2020.

ARROYO, J. D. et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 108, n. 12, p. 5003–8, 2011.

AVISSAR, M. et al. A microRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 8, p. 2850–2855, 2009.

AYUB, S. G.; KAUL, D.; AYUB, T. Microdissecting the role of microRNAs in the pathogenesis of prostate cancer. **Cancer Genetics**, v. 208, n. 6, p. 289–302, 2015.

BABAIAN, R. J. et al. A comparative analysis of sextant and an extended 11-core multisite directed biopsy strategy. **The Journal of Urology**, v. 163, n. 1, p. 152–157, 2000.

BARBIERI, C. E. et al. The mutational landscape of prostate cancer. **European Urology**, v. 64, p. 567–576, 2013.

BARRY, M. J. Evaluation of symptoms and quality of life in men with benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 58, n. 01, p. 25–32, 2001.

BERGER, M. F. et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer.

Nature, v. 470, n. 7333, p. 214–220, 2011.

BERTOLI, G.; CAVA, C.; CASTIGLIONI, I. MicroRNAs as biomarkers for diagnosis, prognosis and theranostics in prostate cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 421, 2016.

BIDARRA, D. et al. Circulating microRNAs as biomarkers for prostate cancer detection and metastasis development prediction. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 2019.

BJARTELL, A. et al. Tumour markers in prostate cancer II: diagnostic and prognostic cellular biomarkers. **Acta Oncologica**, v. 50, p. 76–84, 2011.

BRACKEN, C. P. et al. Genome-wide identification of miR-200 targets reveals a regulatory network controlling cell invasion. **The EMBO Journal**, v. 33, n. 18, p. 2040–2056, 2014.

BRASE, J. C. et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 3, p. 608–616, 2011.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRAZMA, A. et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME) - toward standards for microarray data. **Nature Genetics**, v. 29, p. 365–371, 2001.

BRYANT, R. J. et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 4, p. 768–774, 2012.

BUDHU, A.; JI, J.; WANG, X. W. The clinical potential of microRNAs. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 3, 2010.

BURK, U. et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. **EMBO Reports**, v. 9, n. 6, p. 582–589, 2008.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–

622, 1 abr. 2009.

CABY, M. et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International Immunology**, v. 17, n. 7, p. 879–887, 2005.

CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15524–15529, 2002.

CARLSSON, J. et al. A miRNA expression signature that separates between normal and malignant prostate tissues. **Cancer Cell International**, v. 11, n. 1, 2011.

CARNEIRO, A. et al. The role of immunohistochemical analysis as a tool for the diagnosis, prognostic evaluation and treatment of prostate cancer: a systematic review of the literature. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 2018.

CHAN, J. A.; KRICHEVSKY, A. M.; KOSIK, K. S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 14, p. 6029–6033, 2005.

CHANG, C. et al. Correlation of microRNA-375 downregulation with unfavorable clinical outcome of patients with glioma. **Neuroscience Letters**, v. 531, p. 204–208, 2012.

CHAUX, A. et al. Loss of PTEN expression is associated with increased risk of recurrence after prostatectomy for clinically localized prostate cancer. **Modern Pathology**, v. 25, n. 11, p. 1543–1549, 2012.

CHENG, H. H. et al. Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer-associated hypoxia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e69239, 2013.

CHENG, L. et al. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. **Kidney International**, v. 86, n. 2, p. 433–444, 2014.

CHENG, Y. et al. A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. **Clinical Science**, v. 119, n. 2, p. 87–95, 2010.

CHUNJIAO, S. et al. Uncovering the roles of miRNAs and their relationship with androgen receptor in prostate cancer. **IUBMB life**, v. 66, n. 6, p. 379–386, 2014.

COPPOLA, V. et al. BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial – mesenchymal transition. **Oncogene**, v. 32, n. 14, p. 1843–1853, 2013.

CORTEZ, M. A. et al. MicroRNAs in body fluids - the mix of hormones and biomarkers. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 8, p. 467–477, 2011.

COZAR, J. M. et al. The role of miRNAs as biomarkers in prostate cancer. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 781, p. 165–174, 2019.

CRAWFORD, E. D. et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases. **The Journal of Urology**, v. 188, n. 5, p. 1726–1731, 2012.

DANIEL, R. et al. A panel of microRNAs as diagnostic biomarkers for the identification of prostate cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. E1281, 2017.

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

DE MARZO, A. M. et al. Pathological and molecular mechanisms of prostate carcinogenesis: implications for diagnosis, detection, prevention, and treatment. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 91, n. 3, p. 459–477, 2004.

DE SOUZA, M. F. et al. Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–16, 2017.

DHIR, R. et al. Early identification of individuals with prostate cancer in negative biopsies. **The Journal of Urology**, v. 171, n. 4, p. 1419–1423, 2004.

DIJKSTRA, S. et al. Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes. **Journal of Urology**, v. 191, n. 4, p. 1132–1138, 2014.

DILLHOFF, M. et al. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a

potential predictor of survival. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 12, n. 12, p. 2171–2176, 2008.

DING, L. et al. MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2. **Cell Research**, v. 20, n. 7, p. 784–793, 2010.

DURKAN, G. C. et al. Improving prostate cancer detection with an extended-core transrectal ultrasonography-guided prostate biopsy protocol. **BJU International**, v. 89, n. 1, p. 33–39, 2002.

EBERT, M. S.; SHARP, P. A. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. **Cell**, v. 149, n. 3, p. 515–524, 2012.

EFTHIMIOU, I.; SKREPETIS, K.; BOURNIA, E. Single foci prostate cancer: current diagnosis and management. **Current Urology**, v. 7, n. 1, p. 1–6, 2013.

EPSTEIN, J. I. et al. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 29, n. 9, p. 1228–1242, 2005.

EPSTEIN, J. I. 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. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 244–252, 2016.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. April, p. 259–269, 2006.

FANG, Y.-X.; GAO, W.-Q. Roles of microRNAs during prostatic tumorigenesis and tumor progression. **Oncogene**, v. 33, n. 2, p. 135–147, 2014.

FEBER, A. et al. MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 135, n. 2, p. 255–260, 2008.

FENG, Y.-H.; TSAO, C.-J. Emerging role of microRNA-21 in cancer (Review). **Biomedical Reports**, v. 5, n. 4, p. 395–402, 2016.

FILELLA, X. et al. PCA3 in the detection and management of early prostate cancer. **Tumor Biology**, v. 34, n. 3, p. 1337–47, 2013.

FILELLA, X.; FOJ, L. Emerging biomarkers in the detection and prognosis of prostate cancer. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 53, n. 7, p. 963–973, 2015.

FILELLA, X.; FOJ, L. Prostate cancer detection and prognosis: from prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. 1–22, 2016.

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

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

FLETCHER, C. E.; DART, D. A.; BEVAN, C. L. Interplay between steroid signalling and microRNAs: implications for hormone-dependent cancers. **Endocrine-related cancer**, v. 21, n. 5, p. R409–R429, 2014.

FOJ, L. et al. Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. **Prostate**, v. 77, n. 6, p. 573–583, 2017.

FOLINI, M. et al. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 12, 2010.

GALLO, A. et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e30679, 2012.

GETZENBERG, R. H. et al. Identification of nuclear matrix proteins in the cancer and normal rat prostate. **Cancer Research**, v. 51, n. 24, p. 6514–6520, 1991.

GHORBANMEHR, N. et al. miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine —promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. **Prostate**, v. 79, n. 1, p. 88–95, 2019.

GOTO, Y. et al. MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions as a tumour suppressor and disease progression marker. **British Journal of Cancer**, v. 113, n. 7, p. 1055–65, 2015.

GREGORY, P. A. et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 5, p. 593–601, 2008.

HALDRUP, C. et al. Profiling of circulating microRNAs for prostate cancer biomarker discovery. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 4, n. 1, p. 19–30, 2014.

HE, S. et al. The expression of miR-375 in prostate cancer: A study based on GEO, TCGA data and bioinformatics analysis. **Pathology Research and Practice**, v. 215, n. 6, p. 152375, 2019.

HE, X.-X. et al. MicroRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo. **Oncogene**, v. 31, p. 3357–3369, 2012.

HELLWINKEL, O. J. C. et al. A Cancer-indicative microRNA pattern in normal prostate tissue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 5239–5249, 2013.

HESSELS, D. et al. DD3 PCA3-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. **European Urology**, v. 44, p. 8–16, 2003.

HESSELS, D.; SCHALKEN, J. A. The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 6, n. 5, p. 255–261, 2009.

HODGE, K. K. et al. Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. **The Journal of Urology**, v. 142, n. 1, p. 71–74, 1989.

HUANG, S.-X. et al. Maspin inhibits MCF-7 cell invasion and proliferation by downregulating miR-21 and increasing the expression of its target genes. **Oncology Letters**, v. 19, p. 2621–2628, 2020.

HUANG, X. et al. Exosomal miR-1290 and miR-375 as prognostic markers in castration-resistant prostate cancer. **European Urology**, v. 67, n. 1, p. 33–41, 2015.

HÜBNER, N.; SHARIAT, S.; REMZI, M. Prostate biopsy : guidelines and evidence. **Current Opinion in Urology**, v. 28, n. 4, p. 354–359, 2018.

JACKSON, B. L.; GRABOWSKA, A.; RATAN, H. L. MicroRNA in prostate cancer: Functional importance and potential as circulating biomarkers. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 930, 2014.

JIANDANI, D. et al. The effect of bicycling on PSA levels: a systematic review and meta-analysis. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 18, p. 208–212, 2015.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Critical Investigation**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KATZ, B. et al. Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113700, 2014.

KELLY, B. D. et al. A review of expression profiling of circulating microRNAs in men with prostate cancer. **BJU International**, v. 111, n. 1, p. 17–21, 2013.

KOJIMA, K. et al. MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. **The Prostate**, v. 70, n. 14, p. 1501–1512, 2010.

KONG, D. et al. Loss of let-7 up-regulates EZH2 in prostate cancer consistent with the acquisition of cancer stem cell signatures that are attenuated by BR-DIM. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33729, 2012.

KUMAR-SINHA, C.; TOMLINS, S. A.; CHINNAIYAN, A. M. Recurrent gene fusions in prostate cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 7, p. 497–511, 2008.

LAN, H. et al. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

LAWRIE, C. H. et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. **British Journal of Haematology**, v. 141, n. 5, p. 672–675, 2008.

LEE, H. M. et al. A membranous form of ICAM-1 on exosomes efficiently blocks leukocyte adhesion to activated endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 2, p. 251–256, 2010.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LEWIS, H. et al. miR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration. **Cell Cycle**, v. 13, n. 2, p. 227–39, 2014.

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

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

LILJA, H.; ULMERT, D.; VICKERS, A. J. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 4, p. 268–278, 2008.

LITWIN, M. S.; TAN, H. J. The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 317, n. 24, p. 2532–2542, 2017.

LIU, C. et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. **Nature Medicine**, v. 17, n. 2, p. 211–215, 2011.

LIU, H. et al. Genome-wide microRNA profiles identify miR-378 as a serum biomarker for early detection of gastric cancer. **Cancer Letters**, v. 316, n. 2, p. 196–203, 2012.

LOEB, S. et al. Complications after prostate biopsy: data from SEER-Medicare. **Journal of Urology**, v. 186, n. 5, p. 1830–1834, 2011.

LOEB, S.; CATALONA, W. J. The prostate health index: a new test for the detection of prostate cancer. **Therapeutic Advances in Urology**, v. 6, n. 2, p. 74–77, 2014.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 834–8, 2005.

MA, J. et al. Quantification of plasma miRNAs by digital PCR for cancer diagnosis. **Biomarker Insights**, v. 8, p. 127–36, 2013.

MAGI-GALLUZZI, C. Prostate cancer: diagnostic criteria and role of immunohistochemistry. **Modern Pathology**, v. 31, n. S1, p. S12–S21, 2018.

MARCH, B.; KOUFOGIANNIS, G.; LOUIE-JOHSUN, M. Management and outcomes of Gleason six prostate cancer detected on needle biopsy: a single-surgeon experience over 6 years. **Prostate International**, v. 5, n. 4, p. 139–142, 2017.

MARKS, L. S.; BOSTWICK, D. G. Prostate cancer specificity of PCA3 gene testing: examples from clinical practice. **Reviews in urology**, v. 10, n. 3, p. 175–81, 2008.

MATHÉ, E. A. et al. MiRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus and associations with survival. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 19, p. 6192–6200, 2009.

MATIN, F. et al. A plasma biomarker panel of four microRNAs for the diagnosis of prostate cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 6653, 2018.

MCKILLOP, C. Interview with Jack Schalken. PCA3 and its use as a diagnostic test in prostate cancer. **European Urology**, v. 50, n. 1, p. 153–154, 2006.

MCNEAL, J. E. et al. Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 12, n. 12, p. 897–906, 1988.

MENG, F. et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 647–658, 2007.

MESTDAGH, P. et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. **Genome Biology**, v. 10, n. 6, 2009.

MITCHELL, P. S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 105, n. 30, p. 10513–8, 2008.

MLCOCHOVA, H. et al. Urinary microRNAs as a new class of noninvasive biomarkers in oncology, nephrology, and cardiology. **Methods in Molecular Biology**, v. 1218, p. 439–63, 2015.

MOHAMMED, A. A. Biomarkers in prostate cancer: new era and prospective. **Medical Oncology**, v. 31, n. 8, 2014.

MWAMUKONDA, K. et al. Quantitative expression of TMPRSS2 transcript in prostate tumor cells reflects TMPRSS2-ERG fusion status. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47–51, 2010.

NGUYEN, H. C. et al. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. **Prostate**, v. 73, n. 4, p. 346–354, 2013.

OTTMAN, R. et al. MicroRNA expressions associated with progression of prostate cancer cells to antiandrogen therapy resistance. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, 2014.

PAIVA, R. et al. Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review. **Clinical and Translational Oncology**, 2020.

PANG, Y.; YOUNG, C. Y. F.; YUAN, H. MicroRNAs and prostate cancer. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 42, n. 6, p. 363–369, 2010.

PARTIN, A. W. et al. Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Cancer Research**, v. 53, n. 4, p. 744–746, 1993.

PATEL, A. R.; JONES, J. S. Optimal biopsy strategies for the diagnosis and staging of prostate cancer. **Current Opinion in Urology**, v. 19, n. 3, p. 232–237, 2009.

PATEL, A. R.; KLEIN, E. A. Risk factors for prostate cancer. **Nature Clinical Practice. Urology**, v. 6, n. 2, p. 87–95, 2009.

PAZIEWSKA, A. et al. Candidate diagnostic miRNAs that can detect cancer in prostate biopsy. **Prostate**, v. 78, n. 3, p. 178–185, 2018.

PISITKUN, T.; SHEN, R.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**

United States of America, v. 101, n. 36, 2004.

POLASCIK, T. J.; OESTERLING, J. E.; PARTIN, A. W. Prostate specific antigen: a decade of discovery - what we have learned and where we are going. **The Journal of Urology**, v. 162, p. 293–306, 1999.

PORKKA, K. P. et al. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 13, p. 6130–6135, 2007.

PORZYCKI, P. et al. Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. **International Urology and Nephrology**, v. 50, n. 9, p. 1619–1626, 2018.

POY, M. N. et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 226–230, 2004.

PUHR, M. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. **The American Journal of Pathology**, v. 181, n. 6, p. 2188–2201, 2012.

QI, L. et al. Expression of miR-21 and its targets (PTEN, PDCD4, TM1) in flat epithelial atypia of the breast in relation to ductal carcinoma in situ and invasive carcinoma. **BMC Cancer**, v. 9, 2009.

REDDY, S. et al. Prostate cancer in black and white Americans. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 22, n. 1, p. 83–86, 2003.

REID, A. H. M. et al. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 4, p. 678–684, 2010.

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

REN, D. et al. Double-negative feedback loop between ZEB2 and miR-145 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties in prostate cancer cells. **Cell and Tissue Research**, v. 358, n. 3, p. 763–778, 2014.

RIBAS, J. et al. miR-21: an androgen receptor regulated microRNA which promotes

hormone dependent and independent prostate cancer growth. **Cancer Research**, v. 69, n. 18, p. 7165–7169, 2009.

SAMSONOV, R. et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: Application for prostate cancer diagnostic. **Prostate**, v. 76, n. 1, p. 68–79, 2016.

SAWADA, N. Risk and preventive factors for prostate cancer in Japan: The Japan Public Health Center-based prospective (JPHC) study. **Journal of Epidemiology**, v. 27, p. 2–7, 2017.

SAWYERS, C. L. The cancer biomarker problem. **Nature**, v. 452, 2008.

SCHAEFER, A. et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 1166–1176, 2010.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SCHÖLER, N. et al. Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. **Experimental Hematology**, v. 38, p. 1126–1130, 2010.

SCHRÖDER, F. H. et al. Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 23, p. 1817–1823, 1998.

SERALU, F. M. et al. MicroRNA-21 is overexpressed in human cholangiocarcinoma and regulates programmed cell death 4 and tissue inhibitor of metalloproteinase 3. **Hepatology**, v. 49, n. 5, p. 1595–1601, 2009.

SHAPPELL, S. B. Clinical utility of prostate carcinoma molecular diagnostic tests. **Reviews in Urology**, v. 10, n. 1, p. 44–69, 2008.

SHEN, M.; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & development**, v. 24, n. 18, p. 1967–2000, 2010.

SI, M.-L. et al. miR-21-mediated tumor growth. **Oncogene**, v. 26, p. 2799–2803, 2007.

SØKILDE, R. et al. Efficient identification of miRNAs for classification of tumor origin. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 16, n. 1, p. 106–15, 2014.

SRIVASTAVA, A. et al. MicroRNA Profiling in Prostate Cancer - The Diagnostic Potential of Urinary miR-205 and miR-214. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–11, 2013.

STAHLHUT, C.; SLACK, F. J. MicroRNAs and the cancer phenotype: profiling, signatures and clinical implications. **Genome Medicine**, v. 5, n. 12, 2013.

STEPHAN, C.; JUNG, K.; RALLA, B. Current biomarkers for diagnosing of prostate cancer. **Future Oncology**, v. 11, n. 20, p. 2743–2755, 2015.

STOCKS, T. et al. Metabolic risk score and cancer risk: pooled analysis of seven cohorts. **International Journal of Epidemiology**, v. 44, n. 4, p. 1353–1363, 2015.

SUN, T. et al. Emerging players in prostate cancer: long non-coding RNAs. **American Journal of Clinical and Experimental Urology**, v. 2, n. 4, p. 294–299, 2014a.

SUN, T. et al. MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A. **Oncogene**, v. 33, n. 21, p. 2790–800, 2014b.

TERRIS, M. K.; MCNEAL, J. E.; STAMEY, T. A. Detection of clinically significant prostate cancer by transrectal ultrasound-guided systematic biopsies. **The Journal of Urology**, v. 148, p. 829–832, 1992.

VAN NIEL, G. et al. Exosomes: a common pathway for a specialized function. **Journal of Biochemistry**, v. 140, n. 1, p. 13–21, 2006.

VANDEWALLE, C. et al. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. 6566–6578, 2005.

VELLA, V. et al. Recent views of heavy metals as possible risk factors and potential preventive and therapeutic agents in prostate cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 457, p. 57–72, 2017.

VERDOODT, B. et al. MicroRNA-205, a novel regulator of the anti-apoptotic protein

Bcl2, is downregulated in prostate cancer. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 1, p. 307–314, 2013.

VOLINIA, S. et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2257–61, 2006.

WANG, L. et al. miR-573 inhibits prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 6, n. 34, p. 35978–90, 2015.

WANG, M. C.; VALENZUELA, L. A.; MURPHY, G. P. Purification of a human prostate specific antigen. **The Journal of Urology**, v. 167, p. 960–964, 2002.

WANG, Z. et al. Reduction of miR-21 induces SK-N-SH cell apoptosis and inhibits proliferation via PTEN/PDCD4. **Oncology Letters**, v. 13, p. 4727–4733, 2017.

WEBER, J. A. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733–1741, 2010.

WEISCHENFELDT, J. et al. Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. **Cancer Cell**, v. 23, n. 2, p. 159–170, 2013.

WHALE, A. S. et al. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 11, p. e82, 2012.

YANG, Q.; ZHENG, Y.; ZHU, D. Diagnostic performance of microRNAs expression in prostate cancer. **Tumor Biology**, v. 35, n. 10, p. 10529–10538, 2014.

ZEN, K.; ZHANG, C.-Y. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 2, p. 326–348, 2012.

ZHANG, Z. et al. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. **Laboratory Investigation**, v. 88, n. 12, p. 1358–1366, 2008.

ZHANG, Z. et al. The tumor suppressive miR-200b subfamily is an ERG target gene in human prostate tumors. **Oncotarget**, v. 7, n. 25, p. 37993–38003, 2016.

ZHENG, Q. et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 expression levels in prostate adenocarcinoma for associated risk of recurrence after radical prostatectomy Qizhi. **The Prostate**, v. 74, n. 16, p. 1655–1662, 2014.

ZHU, S. et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. **Cell Research**, v. 18, n. 3, p. 350–359, 2008.

8 APÊNDICE

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 57282916.2.0000.5327

Título do Projeto: *"Avaliação de novos biomarcadores moleculares no câncer de próstata"*

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

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos na sua participação são os seguintes:

Será necessário coletar uma amostra adicional de sangue, urina e tecido prostático. A partir destas amostras coletadas, realizaremos testes que possam nos permitir identificar o câncer de próstata.

- Será realizada a coleta da amostra de sangue com a retirada de uma pequena quantidade de sangue, 4 mL (equivalente a 1 colher de chá), na veia do braço. Você será encaminhado para coletar o sangue no Centro de Pesquisa Clínica do HCPA após a sua consulta de rotina com a equipe assistencial.

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

- A coleta do tecido da próstata será realizada no CCA, no momento de realização da biópsia de próstata, que foi indicada pelo médico assistente. Serão coletados 18 fragmentos de tecido de aproximadamente 1mm (equivalente ao tamanho de uma cabeça de alfinete), sendo 06 fragmentos destinados à pesquisa. O restante do material da biópsia será utilizado para fins assistenciais.

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

- Durante a sua consulta de rotina o médico assistente preencherá uma ficha clínica com informações sobre o senhor, como idade, sexo e histórico médico e outras informações relevantes para a pesquisa.

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

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

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da sua participação na pesquisa são relacionados à coleta de sangue. Na coleta de sangue poderá haver alguma dor decorrente da punção da pele (picada com agulha), bem como a região onde foi feita a coleta ficar com leve hematoma, devido a algum rompimento de vaso sanguíneo. A coleta de urina não apresenta riscos, além de um desconforto eventual semelhante ao toque retal que você já realizaria antes da biópsia. Quanto à biópsia de tecido da próstata, serão retirados fragmentos adicionais de tecido da próstata durante o seu exame e isto não acarreta riscos adicionais relacionados ao exame em si, exceto o acréscimo de 5 minutos no tempo do exame.

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

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

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

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

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

As amostras coletadas serão armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica. Este material será armazenado de forma codificada. O material biológico coletado, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconseguir com o uso do material.

Aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Não aceito que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável, Prof^a. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, pelo telefone (51) 33083559 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

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

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 3 de 3

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO (FICHA CLÍNICA)**FICHA CLÍNICA**

Nome do Paciente: _____

Número: _____

Data: ___/___/___ Hora da coleta: _____

Idade: _____ anos Telefones de contato: () _____

Já foi diagnosticado com câncer? ___ Sim ___ Não

Se sim, qual tipo de câncer? _____

Presença de câncer na família? ___ Sim ___ Não

Se sim, qual tipo de câncer e qual grau de parentesco?

Tem alguma doença crônica? ___ Sim ___ Não

Se sim, qual? _____

Atualmente está em uso de algum medicamento? ___ Sim ___ Não

Se sim, qual (is)?

Utiliza finasterida? ___ Sim ___ Não

Fuma? ___ Sim ___ Sim, mas já parei. ___ Nunca

Se sim, quanto tempo e com que frequência?

Apresenta alterações urinárias: ___ Sim ___ Não

Se sim, qual (is)?

PSA livre: _____ ng/mL PSA Total: _____ ng/mL

PSA livre/PSA Total: _____ %

APÊNDICE C – ARTIGO I

Título: *Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review*

Autores: R. M. Paiva, D. A. G. Zauli, B. S. Neto, I. S. Brum

Revista: *Clinical and Translational Oncology*

Aceite em: 25 de março de 2020.

RESEARCH ARTICLE



Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review

R. M. Paiva¹ · D. A. G. Zauli² · B. S. Neto³ · I. S. Brum¹

Received: 12 January 2020 / Accepted: 25 March 2020
© Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO) 2020

Abstract

Purpose Circulating microRNAs (miRNAs) have been shown to have the potential as noninvasive diagnosis biomarkers in several types of cancers, including prostate cancer (PCa). Urine-based miRNA biomarkers have been researched as an alternative tool in PCa diagnosis. However, few studies have performed miRNA detection in urine samples from PCa patients, as well as low numbers of miRNAs have been assayed, and there is a lack of standard strategies for validation. In this context, we conducted an in-depth literature review focusing on miRNAs isolated from urine samples that may contribute to the diagnosis of PCa.

Methods A systematic review was performed searching the PubMed, Lilacs and Cochrane Library databases for articles focused on the value of significantly deregulated miRNAs as biomarkers in PCa patients.

Results Only 18 primary manuscripts were included in this review, according to the search criteria. Our results suggest that miR-21-5p, miR-141-3p, miR-375 and miR-574-3p should be considered as potential urinary biomarkers for the diagnosis of PCa.

Conclusion These results suggested that large-scale prospective studies are still needed to validate our findings, using standardized protocols for analysis.

Keywords microRNAs · Diagnosis · Urine · Biomarkers · Prostate cancer

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the second most common diagnosed cancer in men worldwide, with an estimated 1.3 million new cases in 2018 and the fifth leading cause of cancer death [1]. The PCa incidence increases with age, affecting mainly men over 50 years of age, resulting in major impacts on healthy systems. Early diagnosis is essential because the clinical behavior ranges from a well-differentiated tumor

(clinically insignificant) to an aggressive metastatic PCa that causes death. The primary biomarker for PCa diagnosis is the prostate-specific antigen (PSA), the first FDA-approved test, widely used in clinical [2]. However, the low specificity and sensibility of PSA have resulted in many unnecessary prostate biopsies and overtreatment of patients with indolent PCa. An increase in the PSA level can indicate the presence of tumor cells, but can also associated with benign prostatic hyperplasia (BPH), infection, or inflammation. Serum PSA testing for the detection of PCa has approximately 86% of sensitivity, but only around 33% of specificity [3, 4]. These issues have characterized the PSA test as a controversial screening tool, which must be used cautiously. In light of this, there are opportunities for discovering new biomarkers that could contribute to improve the PCa diagnosis specificity.

In cancer research, there is a growing trend towards exploring the use of biomarkers, minimally invasive, that may diagnose different types of cancerous, including PCa. In addition, to diagnosis of PCa in its early stages is the key factor in reducing high mortality. The discovery of

✉ I. S. Brum
ilma@ufrgs.br

¹ Laboratory of Molecular Endocrine and Tumoral Biology, Department of Physiology, Institute of Basic Sciences of Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

² Research and Development Division, Hermes Pardini Group, Vespasiano, MG, Brazil

³ Department of Urology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

microRNAs (miRNAs) in 1993 by Ambros and collaborators unleashed a series of researches associating these molecules to cancer development [5]. MiRNAs are an abundant class of small, noncoding RNAs (15–25 nucleotides) that are endogenously expressed both in animals and plants. These highly conserved RNAs can regulate gene expression by binding to 3'-untranslated region (UTR) of mRNA, resulting in the repression of mRNA translation or induction of mRNA cleavage [6, 7]. Evidences have shown that they played a fundamental role in the regulation of biological functions as cellular development, apoptosis, proliferation, differentiation, and tumorigenesis based on the sequence complementarity with their target mRNA. Various miRNAs have been reported to be implicated in cancer pathogenesis, acting as either oncogenes or tumor suppressors, according to the roles of their target genes [8–10]. Besides, miRNA expression profile significantly differs between cancerous and noncancerous tissues [11].

Recently, circulating miRNA have been isolated in different biological fluids including blood, urine, and saliva, indicating that can be used as noninvasive cancer biomarkers [12, 13]. In PCa, the majority of circulating miRNAs were evaluated in blood (plasma and serum). Few studies have been performed miRNA expression from urine samples of patients with PCa. Besides, these studies have arrived at varying results, probably due small sample size, low number of miRNAs assayed, and/or differences in study design, basic characteristics of patients and controls. Therefore, systematic review of information on urinary miRNAs may be valuable to further explore the clinical application of these molecules as possible diagnoses biomarkers in PCa.

Materials and methods

Literature search

We performed a systematic review of studies which urinary miRNAs have been involved in PCa diagnosis published until September 2019, using three electronic databases including PubMed, Lilacs and Cochrane Library. Potentially relevant studies were identified using the PubMed string search: (“urine”[Subheading] OR “urine”[Text Word] OR “urine”[MeSH Terms]) OR (“urinary tract”[MeSH Terms] OR “urinary tract”[Text Word]) AND (“micrornas”[MeSH Terms] OR “micrornas”[Text Word] OR “mirna”[Text Word]) AND (“prostatic neoplasms”[MeSH Terms] OR “prostate cancer”[Text Word]); and by combination of keywords and Medical Subject Headings (MeSH): (“urine” OR “urinary”) AND (“microRNAs” OR “miRNAs” OR “miR”) AND (“prostate cancer” OR “prostatic neoplasm”) in Lilacs and Cochrane Library databases.

Study eligibility criteria

One hundred fifty-three articles were retrieved, and 29 publications were included and reviewed in this systematic review (Fig. 1). Eligible studies had to comply with the following inclusion criteria: (1) research articles that presented the diagnostic potential of urinary miRNAs for PCa; (2) studies that used different sources to identify urinary miRNAs, such as cell-free urine fraction, urinary cell pellet, and extracellular vesicles (exosomes, microvesicles, and apoptotic bodies); (3) studies that showed data related to detection of miRNAs focused only in urine or in combination with tissue, serum, plasma, or cell line. Exclusion criteria were as follows: (1) case reports, letters, editorials, reviews, and articles without complete data; (2) selected papers written in other language than English, Spanish, or Portuguese; and (3) studies with the data published in others studies.

Data extraction

For included studies, collected information was as follows: (1) basic features of studies, including first authors' surname, publication year, original country, study design, sample size specifying number of cases and controls, detected miRNAs, type of specimens, digital rectal examination (DRE) performing; (2) method of detecting miRNAs, type of RNA extraction; and (3) the results of miRNAs deregulation.

Results

Summary of included studies

A total of 153 primary articles were searched in PubMed, Lilacs, and Cochrane Library. As presented in the selection process (Fig. 1), 86 studies were removed due to duplication. After abstracts and full texts were reviewed, only 18 literatures were included in this review, according to the search criteria. The characteristics of 18 included studies were summarized in Tables 1 and 2. The publication years of these records ranged from 2012 to 2018, and the country origin was diversity, including United States, China, Iran, Russia, Norway, and Italy. The majority of study designs were prospective, mainly case–control. Considering only urinary samples, the sample size ranged from 22 to 424 with a total of 2113 samples in all the studies. All literatures included were written in English.

Evidence synthesis

The development of noninvasive tests for cancer detection and monitoring can dramatically reduce global problems

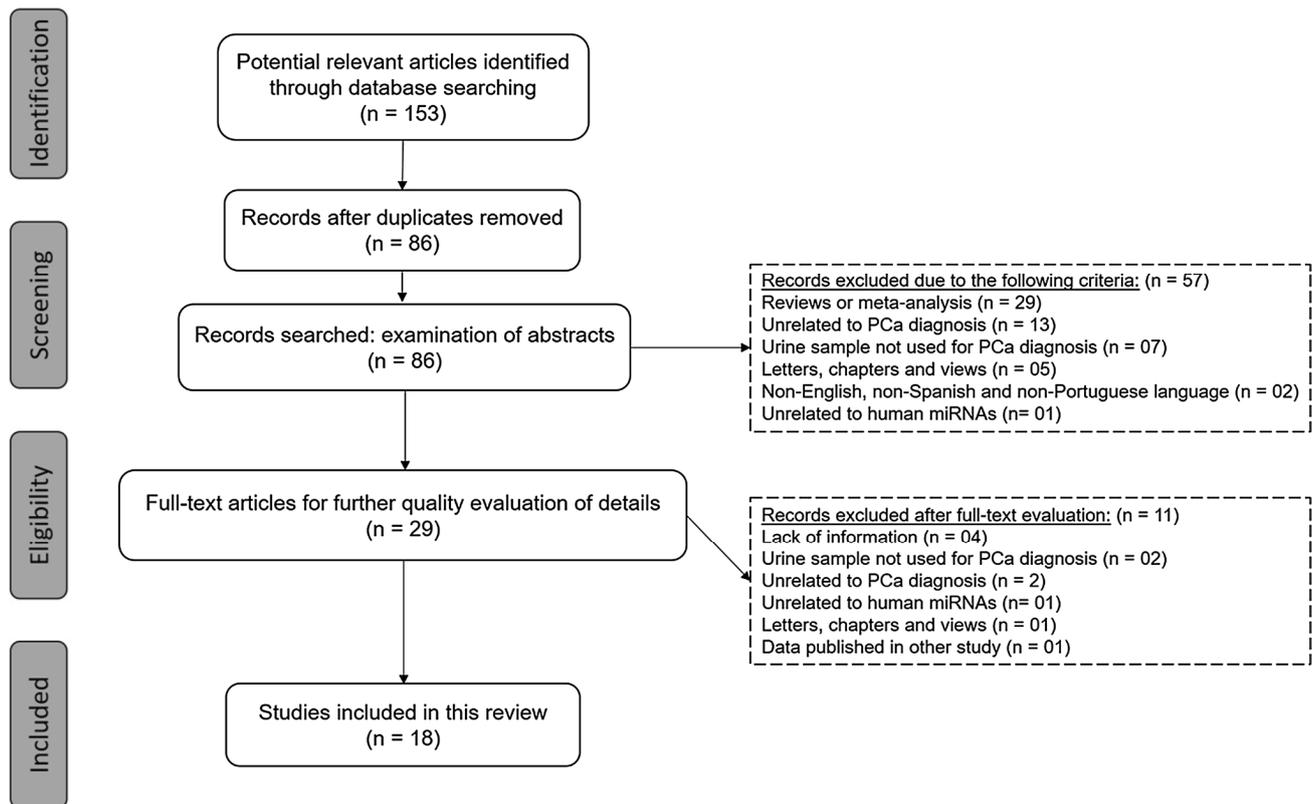


Fig. 1 Flowchart illustrating the search strategy used to identify association studies of miRNAs expression in PCa for inclusion in the systematic review

involving this type of disease. Although conventional strategies for the discovery of blood-based biomarkers have been promising, the development of clinically validated cancer detection and differentiation biomarkers remain a clinically challenge for many human cancers. Since their discovery, microRNAs have played an important role in the diagnosis and differentiation of various types of cancer. The patterns of expression, function, and regulation of microRNAs in normal and neoplastic cells are unknown, but their frequent location in fragile sites, breakpoints, or regions of amplification or loss of heterozygosity reveal that they have a significant role in human carcinogenesis [9, 14].

Due to anatomical and physiological reasons, urine may represent a valuable source of miRNAs as biomarkers for urological cancers, including prostate cancer. The advantages of using urine in clinical tests are that it is collected noninvasively, and can easily obtain large volumes for analysis. A variety of studies have investigated differentially expressed miRNAs as PCa diagnostic biomarkers, comparing samples from healthy individuals (normal controls or BPH) to that with cancer [15–17]. However, a miRNAs expression profile as a potential diagnostic tool is still missing. These could be caused by several factors as follows: (I) differences in study design; (II) different sample groups;

(III) small sample size; (IV) different methods of sample collection; (V) different detecting, and validation methods.

A recent study [18] revealed that miR-222-3p and miR-24-3p were significantly identified in low levels in urine sediment of PCa patients, and miR-30c-5p in high levels, as compared to BPH group. The authors validated their results in two different cohorts, using a three-miRNA ratio model to enhance biomarker performance. The three-miRNA model used distinguished PCa and BPH patients in cohort 1 with an area under the curve value (AUC) of 0.95, and it was successfully validated in cohort 2 (AUC 0.89). Although a significant number of urine samples were included in these two independent cohorts, a smaller number of controls were used (20 samples for each cohort), compromising the diagnostic value. Using tissue as a sample for screening of miRNAs, Stuoelyte et al. [19] have demonstrated that a combination of urinary miR-375 and miR-148a have high PCa diagnostic value in two independent cohorts (AUC 0.785 and 0.835), comparing with two different control groups (23 BPH and 62 healthy individuals), respectively. Moreover, a cohort study by Salido-Guadarrama and collaborators [20] identified miR-100 and miR-200b signature significantly upregulated in PCa patients. Using a multivariable logistic regression analysis, the researchers suggested a base model

Table 1 Methodological information of urine miRNAs assays

No.	Study (author, year)	Country	Study design	Urinary fraction, vol (mL) used for analysis	Post-DRE collection	RNA extraction method	miRNA assay method
1	Rodríguez et al. 2017 [57]	Norway	Cohort	Urinary exosomes, 50–150 mL	No	miRNeasy microRNA isolation kit (Qiagen)	Screening: NGS by NextSeq500 (Illumina) Validation: RT-qPCR with LightCycler 480 (Roche)
2	Fredsoe et al. 2017 [18]	Denmark	Cohort	Urinary exosomes, -mL ^a	No	miRCURY RNA isolation kit (Exiqon)	Screening: 742 miRs (human panel I and II, Exiqon) by RT-qPCR with LightCycler 480 (Roche) Validation: RT-qPCR with LightCycler 480 (Roche)
3	Foj et al. 2016 [58]	Spain	Case-control	Urine sediment and exosomes, 30–50 mL	Yes	miRNeasy kit (Qiagen)	RT-qPCR of 5 candidate miRs
4	Wani et al. 2017 [59]	India	Case-control	Urinary exosomes, -mL ^a	No	miRNeasy mini kit (Qiagen)	RT-qPCR of miR-2909 and miR-615-3p
5	Bryant et al. 2012 [21]	USA	Case-control	Urine sediment, 5 mL	Yes	mirVana kit (Ambion)	Screening: 742 miRs (human panel I and II, Exiqon) by RT-qPCR microarray with ABI 7900 Validation: RT-qPCR with Taqman assays (Life)
6	Stuopelyte et al. 2016 [19]	Lithuania	Cohort	Urine sediment, 30 mL	No	miRNeasy mini kit (Qiagen)	Screening: TLDA of 754 miRs (A+B TLDA ^c cards) by RT-qPCR with ViiA7 (ABI) Validation: Taqman assays by RT-qPCR with ViiA7 (ABI)
7	Koppers-Lalic et al. 2016 [37]	Netherlands	Cohort	Urinary extracellular vesicles, 20–90 mL	Yes	Total RNA isolated by Trizol LS	Screening: sequencing with HiSeq 2000 (Illumina) Validation: RT-qPCR with LightCycler (Roche)
8	Samsonov et al. 2016 [25]	Russia	Case-control	Urinary exosomes, 40 mL	No	RNA isolation kit (BioSilica)	RT-qPCR of 12 candidate miRs
9	Xu et al. 2017 [38]	China	Cohort	Urinary exosomes, -mL ^a	No	miRNA isolation kit (Tiangen)	RT-qPCR of 08 candidates miRs with LightCycler 480 (Roche)
10	Korzeniewski et al. 2015 [24]	Germany		Urine supernatant, 3 mL	No	QIAamp circulating nucleic acid kit (Qiagen)	Screening: hybridization on the miRCURYLNA microarray v15.0 (Exiqon) Validation: RT-qPCR
11	Bryzgunova et al. 2016 [27]	Russia	Case-control	Urinary exosomes and extracellular vesicles, -mL ^a	No	RNA isolation kit (BioSilica)	RT-qPCR of five candidates miRs
12	Ghorbanmehr et al. 2019 [46]	Iran	Case-control	Whole urine, -mL ^a	No	Total RNA isolated by Trizol LS (Invitrogen)	RT-qPCR Sybr Green (Exiqon) of 03 candidates miRs with ABI 7500
13	Stephan et al. 2015 [60]	Germany	Case-control	Urine sediment, 25 mL	Yes	miRNeasy mini kit (Qiagen)	RT-qPCR with Taqman assays of miR-183 and miR-205

Table 1 (continued)

No.	Study (author, year)	Country	Study design	Urinary fraction, vol (mL) used for analysis	Post-DRE collection	RNA extraction method	miRNA assay method
14	Salido-Guadarrana et al. 2016 [20]	Mexico	Cohort	Urine sediment, 30 mL	Yes	RNeasy mini kit (Qiagen)	Screening: TLDA ^c of 364 miRs (v2.1 card) by RT-qPCR with ABI 7900 Validation: Taqman assays of 12 miRs by RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific)
15	Casanova-Salas et al. 2014 [22]	Italy	Cohort	Urine sediment, ~mL ^a	Yes	mirVana miRNA isolation kit	Screening: GeneChip miRNA 2.0 microarray Validation: miRNA assays by RT-qPCR with ABI 7500
16	Srivastava et al. 2013 [23]	USA	Case-control	Whole urine, ~mL ^b	No	mirVana miRNA isolation kit	Screening: TLDA ^c of 377 miRs (A card v2.0) by RT-qPCR with ABI 7900 Validation: Taqman miRNA assays by RT-qPCR with ABI 7300
17	Haj-Ahmad et al. 2014 [61]	Egypt	Case-control	Whole urine, 50 mL	No	Urine total RNA purification Maxi kit (Norgen Biotek)	Screening: LC Science's µParaflo miRNA microarray of 894 miRs Validation: Sybr Green miRNA assays of 07 miRs by RT-qPCR (BioRad)
18	Guelfi et al. 2018 [62]	Italy	Case-control	Urine sediment, 30 mL	Yes	Urine exfoliated cell and bacteria RNA purification kit (Norgen Biotek)	Screening: Sequencing by HiSeq2500 System (Illumina) Validation: RT-qPCR Sybr Green of 8 miRs with iCycler (BioRad)

NGS next-generation sequencing, TLDA Taqman low-density arrays

^a-mL, urine volume not mentioned

Table 2 Mainly urinary miRNAs identified and validated as associated with PCa

No.	Study (author, year)	miRNAs profiling at screening step or method 1		miRNAs profiling after validation step or method 2		
		Samples (n)/screening and validation	Downregulated	Overexpressed	Downregulated	Overexpressed
1	Rodríguez et al. 2017 [57]	Screening: 20 PCa vs 09 CT Validation: 28 PCa vs 19 CT	miR-196a-5p, miR-34a-5p, miR-501-3p, miR-92a-1-5p, and miR-143-3p	–	miR-196a-5p, miR-501-3p	–
2	Fredsoe et al. 2017 [18]	Screening: 188 PCa vs 20 BPH Validation: 197 PCa vs 20 BPH	miR-222-3p and miR-24-3p	miR-30c-5p	miR-222-3p and miR-24-3p	miR-30c-5p
3	Foj et al. 2016 [58]	60 PCa vs 10 CT	miR-214 (in urinary sediment)	Urinary sediment: miR-21, miR-141, and miR-375 Exosomes: miR-21, miR-375, and let-7c miR-2909	–	–
4	Wani et al. 2017 [59]	Screening in cell lines: PC-3 Validation in urine: 90 PCa vs 10 BPH vs 50 CT	–	miR-107, miR-574-3p, miR-375, miR-200b, and miR-141	–	miR-2909 and miR-615-3p
5	Bryant et al. 2012 [21]	Screening in plasma (1): 78 PCa vs 28 CT Screening in serum (2): 47 recurrent metastatic PCa vs 72 nonrecurrent PCa Validation in urine: 118 PCa vs 17 CT	–	–	–	miR-107 and miR-574-3p
6	Stuopelyte et al. 2016 [19]	Screening in tissue: 56 PCa vs 16 CT Validation in urine (1): 143 PCa vs 23 BPH Validation in urine (2): 72 PCa vs 62 CT	miR-31	miR-148a, miR-183, miR-19a, miR-19b, miR-375, miR-17, miR-340, miR-93, miR-92a, miR-106b	miR-148a	miR-375
7	Koppers-Lalic et al. 2016 [37]	Screening: 09 PCa vs 04 CT Validation: 48 PCa vs 26 CT	miR-375, miR-21-5p, miR-141-3p, let-7c-5p, miR-26b-5p, miR-101-3p, and let-7b-5p	miR-10a-5p, miR-204-5p, and miR-30a-3p	isomiR-21 and isomiR-375	isomiR-204
8	Samsonov et al. 2016 [25]	Screening in cell lines (1): PC-3, DU-145, and HeLa Screening in urine (1): 10 PCa vs 10 CT Validation in urine (2): 25 PCa vs 25 CT	–	miR-574-3p, miR-141-5p, miR-21-5p	–	miR-574-3p, miR-141-5p, miR-21-5p
9	Xu et al. 2017 [38]	Screening in urine (1): 60 PCa vs 37 BPH vs 24 CT Validation in serum (2): 37 PCa vs 18 BPH vs 21 CT	–	miR-145-5p	–	miR-145-5p

Table 2 (continued)

No.	Study (author, year)	miRNAs profiling at screening step or method 1		miRNAs profiling after validation step or method 2		
		Samples (n)/screening and validation	Downregulated	Overexpressed	Downregulated	Overexpressed
10	Korzeniewski et al. 2015 [24]	Screening in cell lines: LNCaP Validation in urine: 71 PCa vs 18 CT	-	miR-1275, miR-1290, and miR-483-5p	-	miR-483-5p
11	Bryzgunova et al. 2016 [27]	Detection in exosomes (1): 14 PCa vs 20 CT Detection in extracellular vesicles (2): 14 PCa vs 20 CT	-	miR-19b	-	miR-19b
12	Ghorbanmehr et al. 2019 [46]	23 PCa vs 22 BPH vs 20 CT	-	miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p in relate to CT group	-	-
13	Stephan et al. 2015 [60]	38 PCa vs 38 CT	miR-205	miR-183	No change of expression	No change of expression
14	Salido-Guadarrama et al. 2016 [20]	Screening: 8 PCa vs 8 BPH Validation: 73 PCa vs 70 BPH	miR-27a, miR-328, miR-483, miR-125a, miR-146a, miR-195, miR-145 and miR-150	let-7b, let-7c, let-7d, miR-203, miR-193b, miR-100, miR-200b, miR-200c, miR-20a, miR-886 and miR-204	-	miR-100 and miR-200b
15	Casanova-Salas et al. 2014 [22]	Screening in tissue: 50 PCa vs 10 CT Validation in tissue (1): 273 PCa Validation in urine (2): 47 PCa vs 45 CT	miR-224, miR-34a, miR-221, miR-187, and miR-34c-3p	miR-182	miR-187	-
16	Srivastava et al. 2013 [23]	Screening in tissue: 10 PCa vs 10 CT Validation in tissue (1): 40 PCa Validation in urine (2): 36 PCa vs 12 CT	374 miRs were downregulated in PCa group	miR-190, miR-367 and miR-758	miR-205 and miR-214	-
17	Haj-Ahmad et al. 2014 [61]	Screening: pooled samples per group (8 PCa, 12 BPH, and 10 CT) Validation: 8 PCa vs 12 BPH vs 10 CT, considering individual samples per group	miR-1826, miR-1234, miR-1238, miR-191, miR-484, miR-451, miR-486-5p, miR-1913, miR-625, miR-1825, miR-92a, miR-92b, miR-940, miR-486-3p, and miR-563	miR-483-5p and miR-1826	miR-484 in relate to CT and BPH groups	miR-1825 in relate to BPH group
18	Guelfi et al. 2018 [62]	Screening: 62 miRs Validation: 11 PCa vs 11 CT	NI	NI	let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7d-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, and let-7i-5p	-

CT control (nontumor, healthy individuals), PC-3 human prostate cancer cell line, DU-145 prostate cancer-androgen insensitive cell line, HeLa cervix carcinoma cell line, LNCaP androgen-responsive prostate cancer cell line, NI not informed

including the clinical variables age, PSA, percentage of free PSA, DRE, and miR-100/200b to improve the discrimination between PCa and BPH patients. In this manner, it was possible to predict PCa patients from individuals with abnormal DRE results, in which AUC in combined model was 0.876 and AUC PSA was 0.590.

A few years ago, Bryant et al. [21] recorded a case–control and cohort study involving blood and urine samples. First, plasma from 78 PCa patients and 28 controls were screened in a 742 miRNAs panel by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) microarray technology, revealing 12 miRNAs associated with the presence of PCa. Based on this screening, five miRNAs most deregulated (miR-107, miR-574-3p, miR-375, miR-200b, and miR-141) were analyzed in 135 urine sediment samples (118 PCa and 17 controls) by Taqman miRNA assay. MiR-107 and miR-574-3p were quantified at significantly higher concentrations in the urine of men with PCa compared with controls. However, both miRNAs had a moderate capacity to identify the presence of PCa from urine samples because AUC ranged between 0.66 and 0.74. Besides, in a separate cohort, serum from 47 recurrent metastatic PCa and 72 nonrecurrent PCa confirm the association of miR-141 and miR-375 with metastatic PCa ($p < 0.0001$). In 2014, Casanova-Salas group [22] analyzed prostate cancer tissue biopsies associated with urine samples to elucidate the role of urinary miRNAs as PCa biomarkers. A microarray technology (GeneChip miRNA) screened miR-224, miR-34a, miR-34c-3p, miR-221, miR-182, and miR-187 from 333 tissue samples to further validation. Ninety-two urine sediments were sampled from an independent cohort of 92 men (47 PCa and 45 controls), in which miR-187 was downregulated detected in urine, providing an independent predictive value for positive biopsy. MiR-187 was included in a predictive model within PSA and PCA3 resulting in 88.6% of sensitivity and 50% of specificity (AUC 0.711%), showing better accuracy than PSA alone (AUC 0.615). Moreover, Srivastava et al. [23] found that miR-205 and miR-214 were downregulated in total urine samples from a cohort of 36 PCa samples compared with 12 healthy donors (AUC 0.708 and 0.743, respectively). They also used biopsy tissue samples for screening a TLDA panel of 377 miRNAs, primary.

A part of selected studies used a combination of cell culture with urinary samples to find out new PCa biomarkers. Korzeniewski et al. [24] compared the expression of cell-free miRNAs from supernatant of cultured PCa cells (LNCaP) with cellular miRNAs, using miRNA expression microarray methodology. The abundance of cellular miRNAs and cell-free miRNAs was compared with normal PrECs (normal human prostate epithelial cells). The authors identified miR-483-5p, miR-1275, and miR-1290 among the most abundant cell-free miRNAs. The three-miRNAs were validated using cell-free urine fraction from 71 PCa patients and 18 controls by

RT-qPCR, nevertheless only miR-483-5p was significantly associated with PCa (AUC 0.694). Compared with the miRNA data, the use of PSA level as a predictor of disease was more robust (AUC 0.81) in this study. Besides, miR-483-5p combined with the PSA level was almost as robust as PSA level alone (AUC 0.80). Samsonov et al. [25] found out highly deregulated expressions of miR-21-5p, miR-141-5p, and miR-574-3p in PC-3 cell lines in comparison of normal human prostate epithelial cells. These findings were validated using 50 urinary exosomes (25 PCa and 25 healthy donors), which miR-141-5p and miR-574-5p presented AUC 0.86 and 0.85, respectively, suggesting increased association to PCa diagnosis. MiR-21-5p had a moderate association as PCa biomarker (AUC 0.65).

Extracellular vesicles (EVs), such as exosomes have also been target from researches, since these cells contain miRNAs that could be new PCa diagnostic tools. Foj and collaborators [26] have tested five selected miRNAs in urinary pellets and exosomes from 60 PCa patients and 10 healthy subjects by RT-qPCR. They found that miR-21, miR-141, and miR-375 were significantly upregulated in pellets of PCa patients (AUC 0.817, 0.712, and 0.707, respectively), while miR-214 was significantly downregulated (AUC 0.716). A suggested miRNA panel combining miR-21 and miR-375 showed AUC of 0.872. The expression of the same miRNAs in the urinary exosomes revealed miR-21 and miR-375 significantly upregulated (AUC 0.713 and 0.799, respectively) in PCa patients. Bryzgunova et al. [27] performed a similar case–control study to compare the expression of miR-16, miR-19b, miR-25, miR-125b, and miR-205 in urinary EVs from PCa patients obtained by differential centrifugation. MiR-19b demonstrated overexpression in urinary vesicles isolated by two methods in PCa patients. However, the experiment did not confirm its results in large sample.

Discussion

In the last years, a growing number of publications have showed that the presence of circulating miRNAs could serve as accurate PCa biomarkers. However, the diagnostic accuracy of urinary miRNAs was inconsistent among the studies, a several factors need to be questioned. For example, there are no universal well-defined standards for preanalytical, analytical, and postanalytical stages of biomarker investigation, including protocols of the collection, processing and storage of biological samples, miRNA isolation procedures, biomarker quantification routines, and data analysis.

One of the challenges faced in combating PCa is its considerable heterogeneity. PCa usually begins as indolent form, without symptoms, which the majority of men are therapy responsive. However, in a subset of patients, the cancer reoccurs and advances, becoming an aggressive and

metastatic disease [28, 29]. Due to cancerous tissue heterogeneity, PCa patients included in reviewed studies provided prostate tumor biopsies with different histopathological characteristics (tumor stage, Gleason grade, low/high risk of metastasis, recurrence, etc.), impacting in miRNA detection [30]. Besides that miRNAs expression is associated with clinicopathological characteristics of patients, and even dysregulated in premalignant prostate lesions before progression to cancer [31]. In this manner, the choice of population to be investigated based on the clinical and histopathological characteristics is crucial. However, some records have failed at present completely on this information.

Simple procedures as prostate massage and DRE can increase the amount of tumor-specific nucleic acids in urine by increasing the number of prostatic cells in the specimen, enhancing the efficacy of PCa diagnostic. This method is generally employed when analyzing the urine sediment collected after centrifugation. Only seven studies used DRE or prostate massage before collecting urine, and none of these studies have mentioned some strategy to avoid hemolysis interference in urine samples by contamination with blood cells, which might have happened after DRE. Hemolysis causes the release of miRNAs that dramatically alter the miRNA profile of urinary samples [32]. In this regard, others studies have presented simple solutions to limit the hemolysis impact, based on the techniques, such as spectrophotometry [33], or through detection of erythrocyte-specific miRNAs as the use of ratio miR-451 and miR-23a-3p [32]. On the other hand, some authors pointed that the use of urine sediment as a source of PCa biomarkers increase the chances of contamination from bladder and kidney epithelial material.

Almost half of the studies described the use of EVs as a source of miRNAs. EVs are a family of cell-derived fragments or vesicles generated by cell membrane shedding or storage vesicle exocytosis [34]. The most interesting are exosomes, a subclass of extracellular vesicles of 30 to 150 nm in diameter, released by most cell types that contain proteins, lipids, and nucleic acids (e.g., miRNAs) [27]. The presence of exosomes in urine was first reported in 2004 by Pisitkun and collaborators becoming a promise in this field as new biomarkers are also remarkably stable in body fluids [35, 36]. Increasing number of EV researches, attempt to prove that exosomes are the important molecules that reflects the prostate condition after DRE or prostate massage [25, 37, 38]. Extracellular miRNAs found in biological fluids are considered as one class of perspective PCa markers [39]. Considering urinary exosome, there is no consensus about the way to extract these vesicles. Differences in EV isolation including different centrifugation protocols and filtration, as well as the use of different size measurement methodologies lead to the discrepancy in the results. Highlighting this,

Xu and collaborators have investigated whether hydrostatic filtration dialysis is suitable for urinary EVs isolation and if reported PCa-related miRNAs can be considered as PCa biomarkers [38]. They have suggested hydrostatic filtration dialysis as appropriated for EV isolation and miRNAs analysis when compared with conventional ultracentrifugation, presenting miR-145 up-regulated in both exosomal methods. Besides, others EVs particles also were characterized, including microvesicles, and apoptotic bodies, playing an essential part in intercellular communication by transferring genetic information within exosomes. However, it is not clearly established what particles are enriched in protein or nucleic acids, and if there are morphological differences in EVs in health and disease, including PCa.

As for EVs, different urinary fractions have been used in miRNA analyses. Seven from eighteen reviewed studies investigated the cellular sediment (pellet), resulted from centrifugation, two studies used the cell-free supernatant, three studies used the whole urine, nine studies isolated the EVs from urine, and three studies compared two urinary fractions. The sample type impacts the amount and nature of RNA recovery, and consequently miRNA isolation.

Another important issue related to sample collection is the amount of biological fluid collected, and the RNA isolation procedure used to recover miRNAs. The volume of urine analyzed ranges considerably from 3 to 150 mL (Table 1). Eight reviewed studies did not present the volume of collected urine from subjects. Regarding RNA isolation, there was a variety of extraction methods used, mostly commercial kits, which could vary in performance (RNA yield and purity), as already reported [40, 41]. This analytical variation associated with the sample type used could contribute to heterogeneity of results observed among these reviewed studies.

Different analytical platforms, including RT-qPCR, next-generation sequencing, and microarray were used as miRNA assay analysis. The methods used to detect, quantify, and select urinary miRNAs are based and those used for tissue and plasma because miRNA urinary detection still lacks standard protocol. A comparison of these different platforms have pointed the advantages and disadvantages, considering accuracy and sensibility variations [42, 43]. There is an overall tendency to apply RT-qPCR panels containing hundreds of miRs for screening, and a second methodology to validate the mainly deregulated targets in the first step. This approach comes as a result of elevated number of described miRNAs in the last years listed in mirBase and mirWalk platforms, as well as due to the recommendations of Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) or Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments (MIQE) guidelines [44, 45]. In this review, we selected studies in a screening/validation model and records

that were used only one or the combination of analytical methods because of adequate study design to include more miR candidates. For instance, Ghorbanmehr and collaborators found elevated expression of miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p in PCa patients versus control group, and no significant difference between PCa and BPH patients. The assay had not a validation step as a second methodology, but was performed in duplicate, using selected miRNAs in potential, according to others studies [46].

The majority of studies (11 records) performed screening and validation steps in two different subject groups, and 7 studies worked with miRs preselected by literature (not from screening model), further using one or two detection methodologies. In this manner, we can see a lack of standard strategies for detection and validation across the studies, which could contribute to the variability of results. Therefore, data interpretation can enhance the lack of concordance among studies. Some records established a maximum quantification cycle (Cq) for miRNA detection (Cq = 35, 38 or 40), and others even did not mention it. Establishment of Cq in low levels could exclude potential miR candidates, although the use of Cq in high levels could select an elevated number of miRNAs with low deregulation probability. In this context, there is also a lack of standard method for data normalization for analyzing miRNAs in urine as a whole sample and their fractions. Selected reporters in this review used different miRNAs as normalizers (data not shown). However, a normalizer based on spiked-in synthetic RNA (*Caenorhabditis elegans* spiked-in control miRNAs—cel-miR-39) used during extraction step seems to be the most stable reference genes in the urine PCa although reviewed studies used different endogenous/exogenous genes (miR-191-5p, miR-16, RNU44, RNU48) [19, 21, 47, 48].

Among 5 miRNAs that were analyzed in more than one study, 4 (miR-21-5p, miR-141-3p, miR-375, and miR-574-3p) were overexpressed in PCa patients in comparison to the controls, and only one miRNA (miR-205) showed up and downregulation (Table 3). The ROC curve analysis used to evaluate the sensitivity and specificity of the expression level showed miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-574-3p with AUC > 0.80, separately. The most significantly upregulated single miRNA in urine samples based on AUC values was miR-21-5p (AUC 0.88). Therefore, AUC values were elevated using a combination of miR-375/miR21-5p, and miR-375/miR-148a, corresponding to AUC 0.872 and 0.835, respectively. These numbers indicate that the miRs 21-5p, 141-3p, 375, and 574-3p could discriminate PCa patients of controls strongly. Although miR-205 had presented AUC > 0.70, it showed contradictory expression in PCa between two studies. Besides, miR-205 should be interpreted with caution because it was also related to bladder cancers [46].

Three microRNAs miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-375 repeatedly appears in some studies characterized as being playing important role in the tumor growth process [49–51]. miR-21-5p is known by targeting various genes that are tumor suppressors as FBXO11 (a member of the F-box subfamily lacking a distinct unifying domain), which acts as an inducer of apoptosis in prostate cancer [52]. Collectively, it can be stated that miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-375 act as oncogenic miRNAs promoting proliferation of PCa cells, by regulations of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), KLF9 (kruppel-like-factor-9), and CBX7 (chromobox homolg 7) genes [53–55]. Therefore, several groups have demonstrated that miR-375 is elevated in prostate cancer and this could be explained by its regulation in YAP-1

Table 3 In miRNAs differently expressed in urine related to PCa analyzed in at least two studies

miRNA ID	First author	Urinary fraction	Change of expression ^a
miR-21-5p	Foj et al. [58]	Sediment and exosomes	↑
	Samsonov et al. [25]	Exosomes	↑
	Ghorbanmehr et al. [46]	Whole urine	↑
miR-141-3p	Foj et al. [58]	Sediment and exosomes	↑
	Samsonov et al. [25]	Exosomes	↑
	Ghorbanmehr et al. [46]	Whole urine	↑
miR-205	Srivastava et al. [23]	Whole urine	↓
	Ghorbanmehr et al. [46]	Whole urine	↑
miR-375	Foj et al. [58]	Sediment and exosomes	↑
	Stuopelyte et al. [19]	Sediment	↑
miR-574-3p	Bryant et al. [21]	Sediment	↑
	Samsonov et al. [25]	Exosomes	↑

^aChange of expression in PCa individuals comparing to control subjects; ↑—upregulation; ↓—downregulation

(yes-associated protein 1) gene, which in prostate cancer cells leads to downregulation of mesenchymal phenotypes that plays a major role in the metastasis of tumors of epithelial origin as PCa [56]. However, the specific biological functions of these urinary miRNAs presented are not yet well established because some reporters have associated with other mechanisms and pathways, such as inflammation, invasion, and migration.

Conclusion

The major challenge for PCa clinical management is to identify new and reliable biomarkers that are capable of distinguishing between healthy and prostate cancer individuals. Considering their high stability in biological fluids and specificity to characterize tumor phenotypes, miRNAs have become a new class of noninvasive PCa biomarker candidates. Besides, the potential use of miRNAs as diagnosis for PCa was based on a growing quantity of investigations in the last years.

However, there is a range of unsolved research challenges concerning miRNA investigation in biological fluids, including urine. By evaluating the published data in these reviewed, a high level of heterogeneity and inconsistency among reports were identified, regarding sample type (whole urine, pellet, supernatant, and EVs), as well as detection of miRNA platform. The same lack of consistency was also observed for the sample size, use of DRE for urine collection, and study design.

According our systematic review, 4 miRNAs (miR-21-5p, miR-141-3p, miR-375, and miR-574-3p) should be considered as potential diagnostic tools in PCa as a noninvasive urine test. However, further studies in large sample sizes are needed to verify the validity of miRNAs. Besides, miRNA investigation involving paired samples of the same individual (urine, plasma, and tissue) could be an excellent strategy to increase the study power. Also, the guidelines on study design and sample collection still need to be further improved, and detecting platforms should be clearly defined. Despite these existing problems, urine is still considered a promising source of PCa biomarkers, due to the noninvasiveness of sample collection and confirmed presence of PCa-specific molecules.

Acknowledgements This study was supported partially by Hermes Pardini Group and Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) (Grant No. 160539).

Author contributions All authors contributed for the article: RMP performed the literature search and data analysis, DAGZ and ISB drafted the manuscript and critically revised the work. BSN critically revised the work.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval (research involving human participants and/or animals) This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent Not applicable.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394–424.
2. Payne H, Cornford P. Prostate-specific antigen: an evolving role in diagnosis, monitoring, and treatment evaluation in prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig*. 2011;29:593–601.
3. Woolf SH. The accuracy and effectiveness of routine population screening with mammography, prostate-specific antigen, and prenatal ultrasound: a review of published scientific evidence. *Int J Technol Assess Health Care*. 2001;17:275–304.
4. Hoffman RM, Gilliland FD, Adams-Cameron M, Hunt WC, Key CR. Prostate-specific antigen testing accuracy in community practice. *BMC Fam Pract*. 2002;3:19.
5. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–54.
6. Meltzer PS. Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature*. 2005;435:745–6.
7. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803:1231–43.
8. Wang YL, Wu S, Jiang B, Yin FF, Zheng SS, Hou SC. Role of MicroRNAs in prostate cancer pathogenesis. *Clin Genitourin Cancer*. 2015;13:261–70.
9. Esquela-kerscher A, Slack FJ. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:259–69.
10. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2999–3004.
11. Balacescu O, Dumitrescu RG, Marian C. MicroRNAs role in prostate cancer. *Methods Mol Biol*. 2018;1856:103–17.
12. Di Meo A, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM. Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer*. 2017;16:80.
13. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8:467–77.
14. Rothschild SI. MicroRNA therapies in cancer. *Mol Cell Ther*. 2014;2:7.
15. Yin C, Fang C, Weng H, Yuan C, Wang F. Circulating microRNAs as novel biomarkers in the diagnosis of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol*. 2016;48:1087–95.
16. McDonald AC, Vira M, Shen J, Sanda M, Raman JD, Liao J, et al. Circulating microRNAs in plasma as potential biomarkers for the early detection of prostate cancer. *Prostate*. 2018;78:411–8.

17. Souza MF, Kuasne H, Barros-Filho MC, Cilião HL, Marchi FA, Fuganti PE, et al. Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *PLoS ONE*. 2017;12:e0184094.
18. Fredsøe J, Rasmussen AKI, Thomsen AR, Mouritzen P, Høyer S, Borre M, et al. Diagnostic and prognostic microRNA biomarkers for prostate cancer in cell-free urine. *Eur Urol Focus*. 2018;4:825–33.
19. Stuopeyte K, Daniunaite K, Bakavicius A, Lazutka JR, Jankavicius F, Jarmalaite S. The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *Br J Cancer*. 2016;115:707–15.
20. Salido-Guadarrama AI, Morales-Montor JG, Rangel-Escareño C, Langley E, Peralta-Zaragoza O, Cruz Colin JL, et al. Urinary microRNA-based signature improves accuracy of detection of clinically relevant prostate cancer within the prostate-specific antigen grey zone. *Mol Med Rep*. 2016;13:4549–60.
21. Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JWF, Marsden G, Vessella RL, Rhee B, et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer*. 2012;106:768–74.
22. Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, Calatrava A, Mancarella C, Masía E, Casanova J, et al. Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *J Urol*. 2014;192:252–9.
23. Srivastava A, Goldberger H, Dimtchev A, Ramalinga M, Chijioko J, Marian C, et al. MicroRNA profiling in prostate cancer - the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. *PLoS One*. 2013;8:e76994.
24. Korzeniewski N, Tosev G, Pahernik S, Hadaschik B, Hohenfellner M, Duensing S. Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer. *Urol Oncol*. 2015;33:16.e17–e22.
25. Samsonov R, Shtam T, Burdakov V, Glotov A, Tsyrlina E, Berstein L, et al. Lectin-induced agglutination method of urinary exosomes isolation followed by mi-RNA analysis: application for prostate cancer diagnostic. *Prostate*. 2016;76:68–79.
26. Foj L, Ferrer F, Serra M, Arévalo A, Gavagnach M, Giménez N, et al. Exosomal and non-exosomal urinary miRNAs in prostate cancer detection and prognosis. *Prostate*. 2017;77:573–83.
27. Bryzgunova OE, Zaripov MM, Skvortsova TE, Lekchnov EA, Grigoreva AE, Zaporozhchenko IA, et al. Comparative study of extracellular vesicles from the urine of healthy individuals and prostate cancer patients. *PLoS ONE*. 2016;11:e0157566.
28. Nouri M, Ratther E, Stylianou N, Nelson CC, Hollier BG, Williams ED. Androgen-targeted therapy-induced epithelial mesenchymal plasticity and neuroendocrine transdifferentiation in prostate cancer: an opportunity for intervention. *Front Oncol*. 2014;4:370.
29. Karatas OF, Guzel E, Suer I, Ekici ID, Caskurlu T, Creighton CJ, et al. MiR-1 and miR-133b are differentially expressed in patients with recurrent prostate cancer. *PLoS ONE*. 2014;9:e98675.
30. Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol*. 2011;59:61–71.
31. Mekhail SM, Yousef PG, Jackinsky SW, Pasic M, Yousef GM. MiRNA in prostate cancer: new prospects for old challenges. *EJIFCC*. 2014;25:79–98.
32. Shah JS, Soon PS, Marsh DJ. Comparison of methodologies to detect low levels of hemolysis in serum for accurate assessment of serum microRNAs. *PLoS ONE*. 2016;11:e0153200.
33. Tiberio P, Callari M, Angeloni V, Daidone MG, Appierto V. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *Biomed Res Int*. 2015;2015:731479.
34. Brett SI, Kim Y, Biggs CN, Chin JL, Leong HS. Extracellular vesicles such as prostate cancer cell fragments as a fluid biopsy for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2015;18:213–20.
35. Ge Q, Zhou Y, Lu J, Bai Y, Xie X, Lu Z. MiRNA in plasma exosome is stable under different storage conditions. *Molecules*. 2014;19:1568–75.
36. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:13368–73.
37. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, de Menezes R, Misovic B, Wachalska M, Geldof A, et al. Non-invasive prostate cancer detection by measuring miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. *Oncotarget*. 2016;7:22566–78.
38. Xu Y, Qin S, An T, Tang Y, Huang Y, Zheng L. MiR-145 detection in urinary extracellular vesicles increase diagnostic efficiency of prostate cancer based on hydrostatic filtration dialysis method. *Prostate*. 2017;77:1167–75.
39. Lekchnov EA, Amelina EV, Bryzgunova OE, Zaporozhchenko IA, Konoshenko MY, Yarmoschuk SV, et al. Searching for the novel specific predictors of prostate cancer in urine: the analysis of 84 miRNA expression. *Int J Mol Sci*. 2018;19:E4088.
40. El-Khoury V, Pierson S, Kaoma T, Bernardin F, Berchem G. Assessing cellular and circulating miRNA recovery: the impact of the RNA isolation method and the quantity of input material. *Sci Rep*. 2016;6:19529.
41. Brunet-Vega A, Pericay C, Quílez ME, Ramírez-Lázaro MJ, Calvet X, Lario S. Variability in microRNA recovery from plasma: comparison of five commercial kits. *Anal Biochem*. 2015;488:28–35.
42. Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, et al. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA*. 2010;16:991–1006.
43. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13:358–69.
44. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nat Genet*. 2001;29:365–71.
45. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55:611–22.
46. Ghorbanmehr N, Gharbi S, Korsching E, Tavallaei M, Einollahi B, Mowla SJ. MiR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in urine—promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *Prostate*. 2019;79:88–95.
47. Balacescu O, Petrut B, Tudoran O, Feflea D, Balacescu L, Anghel A, et al. Urinary microRNAs for prostate cancer diagnosis, prognosis, and treatment response: are we there yet? *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2017;8:e1438.
48. Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clin Chem*. 2015;61:1333–422.
49. Agaoglu FY, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdendrieder S, Dalay N, et al. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumor Biol*. 2011;32:583–8.
50. Filella X, Foj L. MiRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55:715–36.
51. Medina-Villaamil V, Martínez-Breijo S, Portela-Pereira P, Quindós-Varela M, Santamarina-Caínzoz I, Antón-Aparicio LM, et al. MicroARN circulantes en sangre de pacientes con cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*. 2014;38:633–9.

52. Sharma N, Baruah MM. The microRNA signatures: aberrantly expressed miRNAs in prostate cancer. *Clin Transl Oncol*. 2019;21:126–44.
53. Yang Y, Guo JX, Shao ZQ. MiR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion: an experimental study. *Asian Pac J Trop Med*. 2017;10:87–91.
54. Li JZ, Li J, Wang HQ, Li X, Wen B, Wang YJ. MiR-141-3p promotes prostate cancer cell proliferation through inhibiting kruppel-like factor-9 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482:1381–6.
55. Pickl JMA, Tichy D, Kuryshev VY, Tolstov Y, Falkenstein M, Schüler J, et al. Ago-RIP-Seq identifies polycomb repressive complex I member CBX7 as a major target of miR-375 in prostate cancer progression. *Oncotarget*. 2016;7:59589–603.
56. Selth LA, Das R, Townley SL, Coutinho I, Hanson AR, Centenera MM, et al. A ZEB1-miR-375-YAP1 pathway regulates epithelial plasticity in prostate cancer. *Oncogene*. 2017;36:24–34.
57. Rodríguez M, Bajo-Santos C, Hessvik NP, Lorenz S, Fromm B, Berge V, et al. Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. *Mol Cancer*. 2017;16:156.
58. Filella X, Foj L. Prostate cancer detection and prognosis: from prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2016;17:E1784.
59. Wani S, Kaul D, Mavuduru RS, Kakkar N, Bhatia A. Urinary-exosomal miR-2909: a novel pathognomonic trait of prostate cancer severity. *J Biotechnol*. 2017;259:135–9.
60. Stephan C, Jung M, Rabenhorst S, Kilic E, Jung K. Urinary miR-183 and miR-205 do not surpass PCA3 in urine as predictive markers for prostate biopsy outcome despite their highly dysregulated expression in prostate cancer tissue. *Clin Chem Lab Med*. 2015;53:1109–18.
61. Haj-Ahmad TA, Abdalla MAK, Haj-Ahmad Y. Potential urinary miRNA biomarker candidates for the accurate detection of prostate cancer among benign prostatic hyperplasia patients. *J Cancer*. 2014;5:182–91.
62. Guelfi G, Cochetti G, Stefanetti V, Zampini D, Diverio S, Boni A, et al. Next generation sequencing of urine exfoliated cells: an approach of prostate cancer microRNAs research. *Sci Rep*. 2018;8:7111.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

APÊNDICE D – ARTIGO II

Título: *miR-375 as prostate cancer biomarker: a microRNA investigation in plasma, urine and biopsy tissue*

Autores: R. M. Paiva, D. A. G. Zauli, B. S. Neto, I. S. Brum

Revista: *Endocrine-Related Cancer*

Submetido em novembro de 2020.