

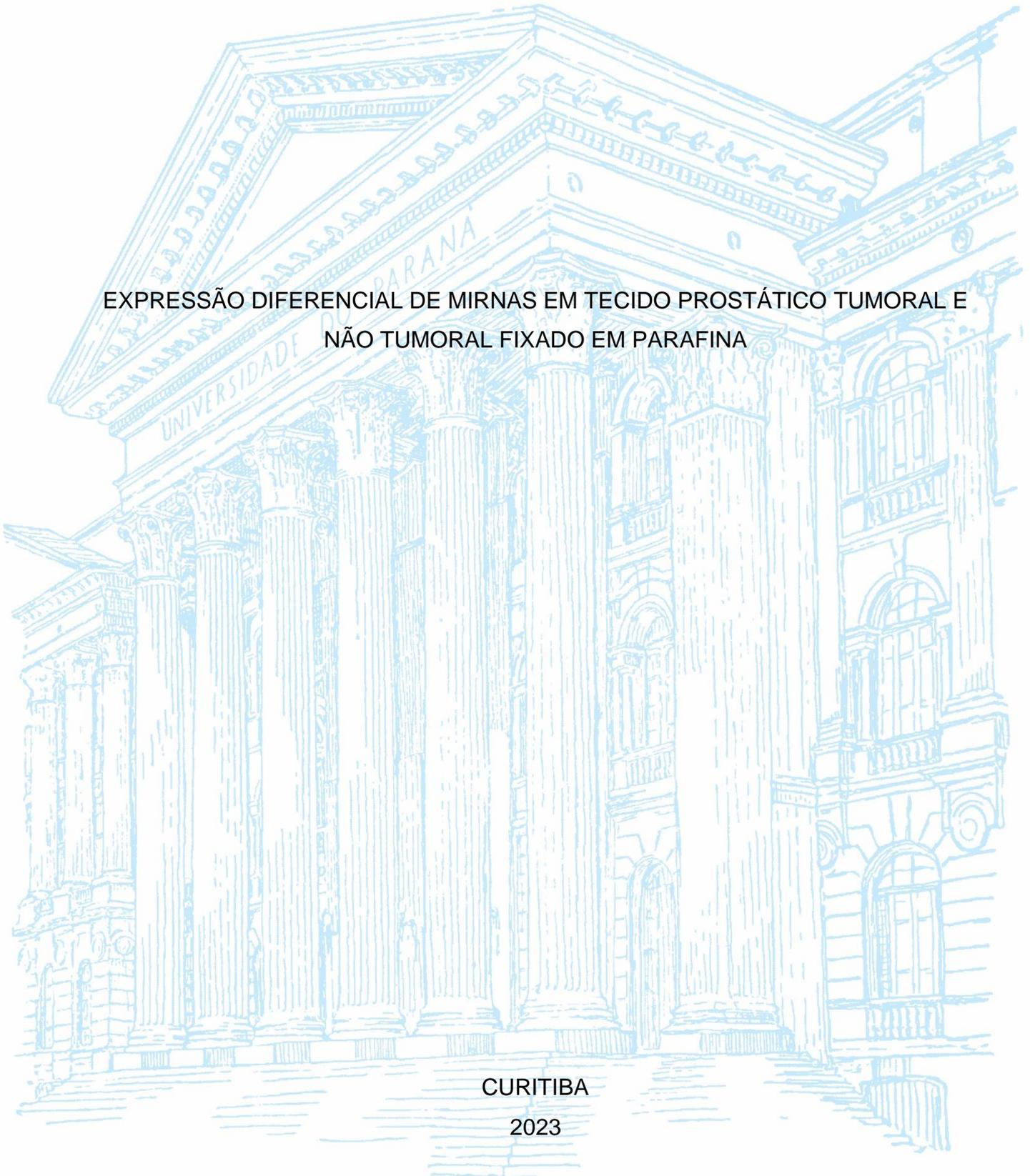
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA BARROSO LITAIFF

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MIRNAS EM TECIDO PROSTÁTICO TUMORAL E
NÃO TUMORAL FIXADO EM PARAFINA

CURITIBA

2023



PAULA BARROSO LITAIFF

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MIRNAS EM TECIDO TUMORAL PROSTÁTICO
FIXADO EM PARAFINA

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Bonatto

Coorientadora: Dra. Dalila Luciola Zanette

CURITIBA

2023

AGRADECIMENTOS

À Fiocruz Paraná e ao Instituto Carlos Chagas pela oportunidade de iniciação científica e a possibilidade de desenvolvimento pessoal e profissional.

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

À minhas orientadoras Profa. Dra. Ana Claudia Bonatto e Dra. Dalila Luciola Zanette por toda a orientação e ajuda durante todo o período de desenvolvimento da pesquisa.

À toda a equipe do Laboratório de Ciências e Tecnologias Aplicadas em Saúde pela amizade, incentivo e ensinamentos.

À minha família e aos meus amigos pelo incentivo e apoio.

Agradeço também a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

“Por acaso existe algo
mais valioso que os seus sonhos?”

Monkey D. Luffy

RESUMO

O câncer de próstata se desenvolve na glândula prostática, que faz parte do sistema reprodutor masculino. No Brasil, o câncer de próstata é o tipo mais comum de câncer entre os homens e representa um dos principais problemas de saúde pública. A mortalidade por câncer em geral é maior nos homens e tem aumentado nas últimas décadas. Na fase inicial, o câncer de próstata pode não apresentar sintomas, ou, quando apresenta, são mais comuns a dificuldade de urinar, presença de sangue na urina, diminuição do jato urinário e maior frequência urinária. Caso sejam detectados esses sinais são realizados dois exames para investigar a existência de câncer de próstata, que são o exame de toque retal e o exame de Antígeno Prostático Específico (PSA). O diagnóstico por esses métodos nem sempre é eficaz, podendo levar a um tratamento errôneo para os pacientes, por isso a necessidade da busca de biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico dessa doença. Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos não-codificantes que agem como reguladores pós-transcricionais e estão envolvidos no desenvolvimento de câncer. Os miRNAs são excelentes candidatos a biomarcadores moleculares porque podem ser isolados de vários tipos de amostras biológicas e geralmente são estáveis e resistentes a diferentes condições de armazenamento. Além disso, podem ser facilmente detectados e quantificados por meio de técnicas como RTq-PCR e sequenciamento de nova geração. Neste estudo, foram coletadas 36 amostras de tecido fixado em parafina, obtido de 11 pacientes submetidos à prostatectomia. Nessas peças foram selecionadas regiões tumorais e não tumorais pelo patologista, para análise da expressão dos seguintes miRNAs: miR-221,5p, miR-205-5p, miR-25-3p, miR-155-5p, miR-39-3p. Os miRNAs com diferença significativa de expressão entre o material parafinado tumoral e margem normal, também foram analisados em 20 amostras de plasma de pacientes com câncer de próstata e 20 controles saudáveis. Os resultados indicaram que a expressão dos miRNAs varia entre as regiões tumorais e não tumorais em pacientes com câncer de próstata. Os miRNAs 205-5p e 221-5p apresentaram uma expressão significativamente maior nas regiões não tumorais em comparação com as regiões tumorais, e o miRNA 205-5p teve a expressão significativamente maior no plasma de pacientes com câncer em comparação ao plasma dos controles saudáveis. O estudo contribui para o avanço do conhecimento na área de biologia molecular do câncer de próstata, destacando a importância da análise desses pequenos RNAs na compreensão da biologia tumoral e o potencial desses miRNAs em serem utilizados como biomarcadores para o câncer de próstata.

Palavras-chave: Câncer de próstata. Expressão de miRNAs. Prostatectomia.

ABSTRACT

Prostate cancer develops in the prostate gland, which is part of the male reproductive system. In Brazil, prostate cancer is the most common type of cancer among men and represents one of the main public health problems. Overall cancer mortality is higher in men and has been increasing in recent decades. In the early stages, prostate cancer may not present symptoms, or when present, common symptoms include difficulty urinating, presence of blood in the urine, decreased urine flow, and increased frequency of urination. If these signs are detected, two tests are performed to investigate the presence of prostate cancer: the digital rectal exam and the Prostate-Specific Antigen (PSA) test. Diagnosis through these methods is not always effective and can lead to incorrect treatment for patients, hence the need to search for biomarkers for the diagnosis and prognosis of this disease. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding endogenous RNAs that act as post-transcriptional regulators and are involved in cancer development. miRNAs are excellent candidates as molecular biomarkers because they can be isolated from various types of biological samples and are generally stable and resistant to different storage conditions. Furthermore, they can be easily detected and quantified using techniques such as RT-qPCR and next-generation sequencing. In this study, 36 paraffin-embedded tissue samples were collected from 11 patients who underwent prostatectomy. Tumor and non-tumor regions were selected by the pathologist for analysis of the expression of the following miRNAs: miR-221-5p, miR-205-5p, miR-25-3p, miR-155-5p, and miR-39-3p. miRNAs that showed significant differences in expression between tumor and normal margin paraffin-embedded material were also analyzed in 20 plasma samples from prostate cancer patients and 20 healthy controls. The results indicated that miRNA expression varies between tumor and non-tumor regions in prostate cancer patients. miR-205-5p and miR-221-5p showed significantly higher expression in non-tumor regions compared to tumor regions, and miR-205-5p had significantly higher expression in the plasma of cancer patients compared to healthy controls. The study contributes to the advancement of knowledge in the field of molecular biology of prostate cancer, highlighting the importance of analyzing these small RNAs in understanding tumor biology and the potential of these miRNAs to be used as biomarkers for prostate cancer.

Keywords: Prostate cancer. MiRNAs expression. Prostatectomy

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ETAPAS DA METODOLOGIA DA PESQUISA.....	18
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – EXPRESSÃO DOS MIRNAS NO MATERIAL PROSTÁTICO FIXADO EM PARAFINA.....	234
GRÁFICO 2 – EXPRESSÃO DOS MIRNAS NO PLASMA	26

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PROTOCOLO DE USO DO MASTER MIX	22
---	----

Lista de abreviaturas OU siglas

CaP	- Câncer de próstata
miRNA	- MicroRNA
HEG	- Hospital Erasto Gaertner

LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

™ - marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA	16
1.2 OBJETIVOS	16
1.2.1 Objetivo geral	16
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
1.3 METODOLOGIA.....	17
1.3.1 Classificação do tipo de pesquisa e desenho do estudo	18
1.3.2 População e amostra.....	18
1.3.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	19
1.3.4 Plano de recrutamento e processo de aplicação do TCLE.....	19
1.3.5 Análise macroscópica e microscópica dos espécimes cirúrgicos para escolha das regiões de interesse	19
1.3.6 Levantamento de amostras	20
2 MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 Extração de RNA do material parafinado.....	20
2.2 Extração de RNA das amostras de plasma.....	21
2.3 Síntese de DNA complementar.....	22
2.4 PCR quantitativa.....	22
2.5 Seleção dos miRNAs.....	23
2.6 Análises estatísticas.....	23
3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	23
3.1 Expressão de miRNAs no material prostático fixado em parafina.....	23
3.2 Expressão de miRNAs no plasma.....	25
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
4.1 Perspectivas para trabalhos futuros.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

Segundo a *American Cancer Society* (ACS) a próstata é uma glândula que faz parte do sistema reprodutivo masculino encontrada abaixo da bexiga envolvendo a uretra. Essa glândula é importante para a ejaculação porque ela produz um líquido adicionado ao espermatozoide que contém nutrientes e substâncias necessárias para os espermatozoides, logo, ela é de extrema relevância para a fertilidade masculina. O crescimento anormal e descontrolado das células da próstata desencadeia o câncer de próstata (CaP). Normalmente, no estágio inicial o CaP não causa sintomas, mas em casos mais avançados da doença os sintomas mais comuns são: dificuldade para urinar, fluxo urinário fraco ou interrompido, necessidade frequente de urinar, sangue na urina ou no sêmen, disfunção erétil, dor nos quadris, costas ou tórax e fraqueza ou dormência nas pernas ou pés.

O perfil de mortalidade no Brasil tem sofrido modificações ao longo dos anos e com o aumento da expectativa de vida, um cenário de doenças crônicas e degenerativas é cada vez mais frequente. Entre as doenças crônicas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta o câncer como um enorme problema devido à sua alta taxa de incidência e de mortalidade. Sabe-se que a mortalidade por câncer é maior nos homens, e essa mortalidade tem aumentado nas últimas décadas (FRIESTINO et al., 2013).

Entre os tumores que afetam os homens, o câncer de próstata é o tipo mais comum, representando um dos principais problemas da saúde pública no Brasil (RHODEN et al., 2010). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) a previsão para 2023 é que sejam relatados quase 72.000 novos casos desse tipo de tumor no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2023). As regiões Sul e Sudeste apresentam o maior número de casos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016). Homens com 50 anos são acometidos, sendo que homens com idade entre 60 e 69 anos representam quase 39% dos casos (DE PAULA FARIA et al., 2020).

A incidência do câncer de próstata se comporta de maneira distinta em indivíduos com diferentes componentes de ancestralidade. Isso ocorre provavelmente devido à fatores genéticos, estilo de vida, dieta e meio ambiente. Negros são mais suscetíveis a desenvolverem esse tipo de câncer em comparação com brancos, latinos e asiáticos (SARRIS et al., 2018).

A taxa de mortalidade por câncer de próstata tende a ser baixa por existir um bom prognóstico. A sobrevida média estimada varia dentre os países, sendo maior em países desenvolvidos e relativamente menor em países em desenvolvimento (GOMES et al., 2008).

Na fase inicial, o câncer de próstata (CaP) pode não apresentar sintomas, ou, quando apresenta, são mais comuns a dificuldade de urinar, presença de sangue na urina, diminuição do jato urinário e necessidade de urinar mais vezes. São realizados dois exames para investigar a existência de CaP e fazer o rastreio da doença, que são o exame de toque retal e o exame de Antígeno Prostático Específico (PSA). Se houver suspeita, é feita uma biópsia para confirmar o diagnóstico. A biópsia é realizada em laboratório e analisa pequenos pedaços da próstata, e o tratamento deve ser guiado a partir do resultado. As opções terapêuticas mais comuns são a prostatectomia, que é uma cirurgia para remover a próstata, ou a radioterapia. Em alguns pacientes é indicada a terapia hormonal (COOPERBERG et al., 2013).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos não-codificantes que agem como reguladores pós-transcricionais, principalmente por meio da repressão da tradução de RNAs mensageiros em proteínas. Evidências sugerem que desequilíbrios na expressão de miRNAs estão envolvidos no desenvolvimento de câncer. A expressão diferencial de miRNAs já foi relatada em vários tipos de tumores, o que demonstra que diferentes conjuntos de miRNAs normalmente estão desregulados em diferentes tipos de câncer (PORKKA et al., 2007). Os miRNAs são excelentes candidatos para serem usados como biomarcadores moleculares porque podem ser isolados de vários tipos de amostras biológicas e geralmente são estáveis e resistentes a diferentes condições de armazenamento. E ainda, podem ser facilmente detectados e quantificados por meio de técnicas como RT-qPCR, que converte o RNA em DNA complementar por transcrição reversa (RT) e faz a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), e sequenciamento (NGS) de RNAs pequenos.

Além de serem encontrados no plasma e no soro, os miRNAs também já foram identificados em outros fluidos biológicos, como urina e sêmen, o que os torna ótimos candidatos a biomarcadores não-invasivos no CaP (FABRIS et al., 2016). Este estudo consistiu na análise da expressão de miRNAs isolados a partir de tecido prostático fixado em parafina, obtido após prostatectomia de pacientes com CaP, e

de amostras de plasma de pacientes com CaP e controles saudáveis. Com isso, espera-se que este projeto colabore na identificação de um ou mais miRNAs que tenham potencial de uso como biomarcadores de estratificação de risco em CaP.

1.1 JUSTIFICATIVA

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais comum a acometer homens e é a sexta causa de morte de homens no mundo todo. Em países desenvolvidos esse câncer é mais facilmente identificado quando comparado a países em desenvolvimento (JEMAL et al. 2011). A incidência e a mortalidade do CaP tendem a ser mais altas em homens de maior idade, e variam em indivíduos com diferentes componentes de ancestralidade devido a fatores genéticos, sociais e ambientais (LITWIN et al. 2017).

Esse câncer é extremamente heterogêneo e pouco se sabe sobre a heterogeneidade em nível molecular. Pode-se dizer que essa heterogeneidade é clínica, espacial e morfológica, fazendo com que o nível de complexidade da doença seja alto e de difícil abordagem para ambientes clínicos e para estudos e pesquisas (TOLKACH & KRISTIANSEN 2018).

Segundo o *National Cancer Institute* (NIH), existe uma certa controvérsia a respeito do diagnóstico do CaP. Os exames mais comuns realizados são o exame de toque retal e o exame da PSA, mas algumas organizações médicas são contra a realização desses exames em homens que não apresentam sintomas comuns ao CaP porque os resultados desses exames podem trazer malefícios aos pacientes como por exemplo um tratamento mais agressivo do que o necessário em casos que poderiam apenas ser acompanhados (vigilância ativa).

Por ser um problema de saúde complexo com grande prevalência e incidência no mundo todo (GANDHI et al. 2017), faz-se necessário o aprofundamento de estudos e pesquisas com foco no aspecto genético e molecular da doença para alcançar melhoras no diagnóstico e no tratamento. Uma alternativa promissora é justamente a investigação dos miRNAs como biomarcadores para detecção, prognóstico e acompanhamento do CaP.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo geral da pesquisa consistiu em analisar e comparar o padrão de expressão dos miRNAs 221-5p, 205-5p, 25-3p, 214-5p e 155-5p em diferentes regiões de material parafinado obtido de prostatectomia e no plasma de pacientes com CaP e de controles saudáveis, e investigar o potencial desses miRNAs para serem usados como biomarcadores para diagnóstico, prognóstico e acompanhamento do CaP.

1.2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos da pesquisa estão listados a seguir:

- Seleção e remoção de *punches* de 2 ou mais blocos de parafina de cada paciente submetido à prostatectomia, nos quais existiam pelo menos uma região tumoral e uma região sem característica tumoral de forma bem delimitada (de acordo com análise microscópica realizada pelos patologistas responsáveis);
- Extração de RNA dos *punches*;
- Selecionar alguns miRNAs associados com CaP a partir de análise de literatura e de dados públicos de expressão de miRNAs e transcriptoma (análise de alvos dos miRNAs);
- Identificar e comparar o padrão de expressão desses miRNAs selecionados, em diferentes regiões de material parafinado obtido de prostatectomias;
- A partir dos resultados dos miRNAs encontrados com expressão diferencial no material parafinado, avaliar a expressão dos mesmos miRNAs no plasma dos pacientes com CaP e de indivíduos saudáveis;
- Associar a expressão dos miRNAs com dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes.

1.3 METODOLOGIA

Pacientes com câncer de próstata primário atendidos no Hospital Erasto Gaertner (HEG) e submetidos à prostatectomia foram selecionados para o estudo.

Após a prostatectomia, a avaliação histopatológica dos cortes foi feita por médicos patologistas, que selecionaram regiões enriquecidas em células tumorais e regiões enriquecidas em células não-tumorais. Pequenos *punches* dessas regiões foram submetidos à extração de RNA e posteriormente passaram pela transformação em cDNA para a realização da qPCR, com o objetivo de avaliar diferenças na expressão de miRNAs relacionados com alterações do microambiente tumoral em CaP. Também foram coletadas amostras de plasma de alguns dos pacientes que passaram por prostatectomia e de outros pacientes com câncer. Além disso, foram coletados os dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos para testar possíveis correlações com a expressão dos miRNAs. A figura (1) a seguir representa as principais etapas seguidas na metodologia do trabalho.

FIGURA 1 – ETAPAS DA METODOLOGIA DA PESQUISA



FONTE: A autora (2023).

1.3.1 Classificação do tipo de pesquisa e desenho do estudo

A pesquisa é classificada como observacional, e o desenho do estudo é prospectivo, transversal e multicêntrico.

1.3.2 População e amostra

Embora a quantidade de amostras seja reduzida, espera-se que seja possível obter um indicativo da tendência nas diferenças observadas. À medida que mais pacientes forem submetidos à prostatectomia, será possível obter uma quantidade maior de amostras. Os resultados gerados foram analisados e comparados a banco de dados como o TCGA (*The Cancer Genome Atlas Program*). Foram utilizadas 36 amostras de 11 pacientes, sendo que algumas amostras são do mesmo paciente, mas foram extraídas de diferentes blocos de parafina. Foram utilizadas 20 amostras de plasma de pacientes com câncer de próstata, sendo alguns os mesmos pacientes dos quais foram obtidos os blocos de parafina, e 20 amostras de plasma de controles saudáveis.

1.3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com tumores primários de próstata ao diagnóstico. Destes, foram selecionados aqueles que tiveram indicação de prostatectomia radical, pois é deles que são obtidos os blocos de parafina. Foram excluídos pacientes que já tenham sido submetidos a algum tratamento específico, como radioterapia e quimioterapia e pacientes com doenças infecciosas crônicas.

1.3.4 Plano de recrutamento e processo de aplicação do TCLE

Os pacientes foram abordados durante sua consulta nos ambulatórios de Urologia do Hospital Erasto Gaertner. O convite para participação e a aplicação do TCLE foi realizado pela pesquisadora Dalila L. Zanette, pela estudante Maria Eduarda Alencar Migliorini e pelos médicos colaboradores, Dr. Jonatas Pereira, Dr. Nathan Khol e Dr. Murilo de Almeida Luz.

1.3.5 Análise macroscópica e microscópica dos espécimes cirúrgicos para escolha das regiões de interesse

Os espécimes cirúrgicos de tecido prostático foram submetidos a exame macroscópico para determinação de tamanho e peso. Os tecidos foram fixados em formol 10% e cortes de 4-5 mm de espessura foram obtidos para inclusão em blocos de parafina. Os cortes de 4 μ M de espessura foram obtidos usando um micrótomo

American Optical 820 e transferidos para lâminas de microscópio *Dako Flex* IHC. A desparafinização foi realizada a 50°C por 30 min, seguida de reidratação e coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram montadas com capas de vidro e examinadas com microscópio óptico para confirmar a hipótese clínica de acordo com os achados histopatológicos, determinar o escore de Gleason e o estadiamento. O escore de Gleason é uma escala que é usada para avaliar o grau de agressividade do câncer de próstata. Foi desenvolvido pelo patologista Donald Gleason na década de 1960 e é amplamente utilizado como um sistema de classificação histológica para o câncer de próstata (CAMBRUZZI et al. 2010).

A identificação das regiões de interesse do material cirúrgico fixado em parafina obtido a partir das prostatectomias foi avaliada pelos médicos patologistas do HEG, com base na morfologia celular das lâminas analisadas. Para cada espécime cirúrgico, foram selecionados blocos classificados com o maior escore de Gleason. Dos blocos selecionados pelos patologistas, foram colhidos *punches* de 2 regiões: 1) com predominância de células tumorais; 2) com predominância de células não-tumorais.

1.3.6 Levantamento de amostras

Nesse projeto foram avaliadas amostras tumorais e não tumorais de pacientes com câncer de próstata. As amostras são pequenos blocos de parafina com tecidos tumorais e não tumorais dos pacientes, sendo assim amostras classificadas como “T” são tumorais e “NT” não tumorais. Em alguns casos foram selecionados mais de um bloco de um mesmo paciente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração de RNA do material parafinado

Para a extração do RNA dos punches dos blocos de parafina, foram utilizadas como base as instruções do protocolo do kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation* (*Thermo Scientific*). Seguindo o protocolo do kit, são realizadas 4

etapas. A etapa 1 consiste na desparafinização utilizando xilol, incubação a 50°C, etanol e centrifugações. A etapa 2 consiste na digestão com protease utilizando *buffer* específico contido no kit, homogeneização e incubação a 50°C. A etapa 3 consiste no isolamento do RNA com *Wash 1* e *Wash 2* também contidos no kit. A última etapa consiste na purificação do RNA com os reagentes do kit, a solução de eluição, incubação e centrifugação. Após a realização de todo o protocolo as amostras estão prontas para uso e devem ser armazenadas em freezer a -20°C.

2.2 Extração de RNA das amostras de plasma

Para as extrações de RNA do plasma foram utilizadas como base as instruções do protocolo do kit *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation (Thermo Fisher Scientific)*. O protocolo apresenta 6 etapas. A etapa 1 consiste na preparação da solução TURBO DNase™ utilizando tampão e TURBO DNase provenientes do kit que são misturadas e armazenadas no gelo até o momento do uso. A etapa 2 consiste na digestão das amostras com Proteinase K, que é adicionada diretamente nas amostras que são agitadas e incubadas por 65°C em bloco térmico. A etapa 3 consiste na lise das amostras e ligação às RNA *binding beads* utilizando o mix de lise e as esferas de ligação de RNA, seguido de agitação e adição de isopropanol. A etapa 4 consiste na lavagem do RNA nas RNA *binding beads* utilizando o suporte magnético e eliminação do sobrenadante, além de lavagem com as soluções *Wash 1* e *Wash 2* contidas no kit. A etapa 5 consiste no tratamento com a TURBO DNase™ e religação do RNA às RNA *binding beads*. A solução preparada na etapa 1 é adicionada aos tubos seguida da adição do *buffer* de religação e isopropanol em cada amostra, e após agitação as amostras são colocadas novamente no suporte magnético para que a solução fique límpida e o sobrenadante seja descartado. A última etapa consiste na eluição do RNA, que é feita através da secagem das esferas no bloco térmico. É adicionado o tampão de eluição e as amostras são agitadas e incubadas a 65°C, em seguida são agitadas novamente e colocadas no suporte até que a solução esteja límpida. O sobrenadante é transferido para tubos novos e as amostras estão purificadas e prontas para uso imediato. Como alternativa, são armazenadas em freezer -20°C para uso a longo prazo.

2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA extraído foi quantificado em *Nanodrop* e diluído a 5ng/uL. Em seguida o RNA é usado para síntese de cDNA (DNA complementar) dos miRNAs com o kit *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis (Thermo Scientific)*. O protocolo de síntese de cDNA se baseia em 4 etapas que são todas realizadas em Termociclador Proflex (*Applied Biosystems*): (1) Adição de cauda poli A; (2) Ligação do adaptador; (3) Transcrição reversa; (4) Reação Mir-Amp (pré-amplificação dos microRNAs). O kit usado para a síntese dos cDNAs realiza uma síntese universal dos cDNAs dos miRNAs, sendo assim, todos os miRNAs presentes nas amostras tem seu DNA complementar sintetizado.

2.4 PCR quantitativa

A partir dos cDNAs dos miRNAs que foram sintetizados pelo kit, a RT-qPCR é feita utilizando ensaios específicos para cada miRNA, que são compostos por *primers Forward* e *Reverse* e sondas marcadas com fluorescência. Estes ensaios são usados em reações em cadeia polimerase em tempo real quantitativas (qPCR). Para esta reação são utilizados além dos ensaios específicos para cada miRNA, água *RNase-free*, cDNA e um *Master Mix (Taqman™ Fast Advanced Master Mix)*. A reação foi padronizada seguindo os protocolos de uso do kit de síntese de cDNA e o protocolo de uso do Master Mix, sendo realizada da seguinte maneira (TABELA 1): o cDNA deve ser diluído em proporção 1:10 para a reação e a corrida de qPCR deve ser realizada em “*Fast mode*” no termociclador *QuantStudio™5 (Applied Biosystems)*.

TABELA 1 – PROTOCOLO DE USO DO MASTER MIX

Reação	1X	Ciclagem		
Master Mix 2X	5uL	95°C	20 seg	1X
Ensaio 20X	0,5uL	95°C	1 seg	40X
cDNA diluído 1:10	2,5uL	60°C	20 seg	

Água RNase-free	2,0uL	4°C	infinito	1X
-----------------	-------	-----	----------	----

FONTE: A autora (2023).

2.5 Seleção dos miRNAs

Os miRNAs escolhidos para serem analisados nas amostras foram: miR-221,5p, miR-205-5p, miR-25-3p, miR-155-5p, miR-39-3p. Foram escolhidos com base na análise de dados de expressão gênica diferencial, descrita no artigo de SRIVASTAVA e colaboradores e nos dados públicos de expressão GSE48430 do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

2.6 Análises estatísticas

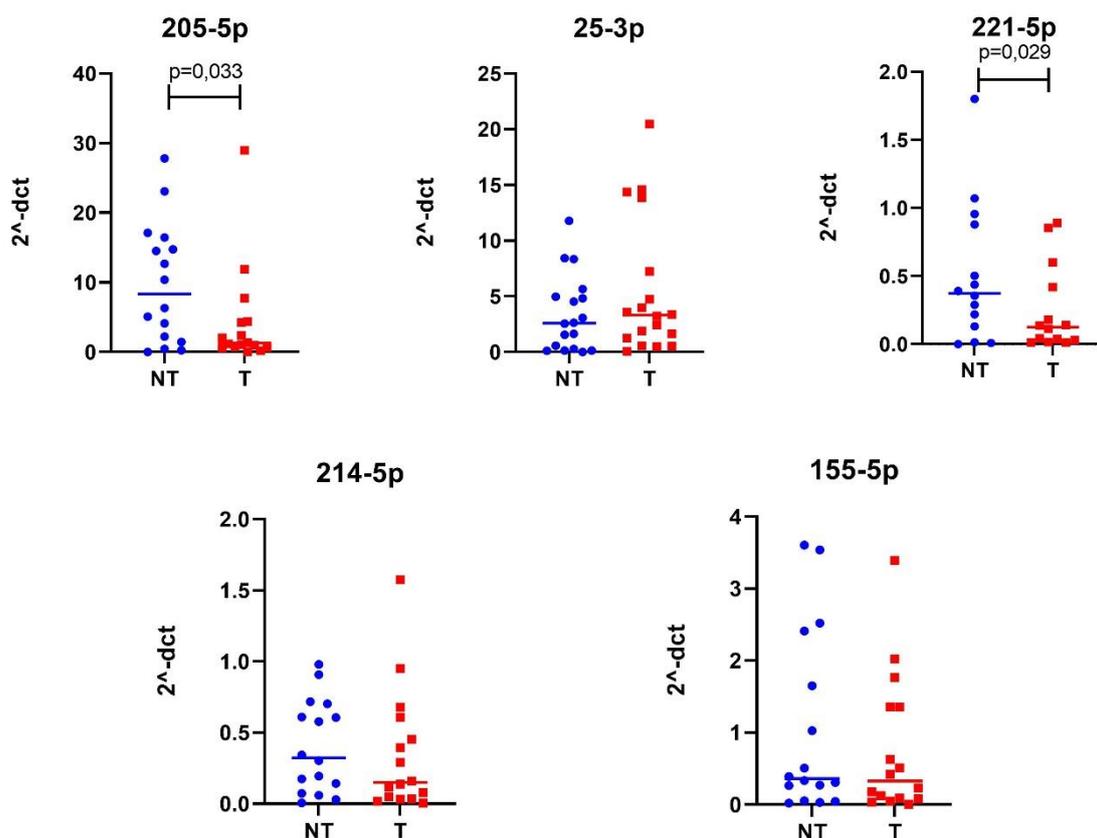
As análises estatísticas foram feitas utilizando testes T pareados de *Student* para comparar a expressão dos miRNAs entre o grupo com regiões tumorais e o grupo com regiões não tumorais, através do software GraphPad Prism. O programa permite a realização de diversas análises estatísticas e criação de gráficos a partir dos dados experimentais fornecidos. O cel-miR-39-3p foi utilizado como controle exógeno e como normalizador para as análises estatísticas.

3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

3.1 Expressão de miRNAs no material prostático fixado em parafina

Os gráficos a seguir (GRÁFICO 1) demonstram a diferença na expressão de cada um dos miRNAs analisados, comparando sua expressão nas regiões não tumorais (NT) com as regiões tumorais (T) de todos os pacientes.

GRÁFICO 1 – EXPRESSÃO DOS MIRNAS NO MATERIAL PROSTÁTICO FIXADO EM PARAFINA



FONTE: A autora (2023).

Os resultados obtidos demonstram uma variabilidade grande na expressão dos miRNAs nos diferentes blocos de parafina. Houve expressão significativamente maior de miR-205-5p e miR-221-5p nas regiões não tumorais em comparação com regiões tumorais dos blocos de parafina (com os respectivos valores de $p = 0,033$ e $p = 0,029$). Para os demais miRNAs não houve diferenças significativas de expressão.

Devido ao fato de o CaP ser um tipo de câncer muito heterogêneo (TOLKACH & KRISTIANSEN 2018), é possível perceber diferenças na expressão dentro do mesmo grupo de amostras. Algumas amostras são dos mesmos pacientes, mas provém de diferentes blocos de parafina, reforçando o perfil heterogêneo desse tipo de câncer.

Para o miR-205-5p, nossos achados são concordantes com a literatura. O miR-205-5p normalmente é encontrado hipoexpresso no câncer de próstata em relação às células normais (SRIVASTAVA et al. 2013). A baixa expressão do miR-

miR-205-5p é um marcador prognóstico de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (CHILDS et al. 2009). A expressão do miRNA 205-5p é reprimida em linhagem celular de câncer de próstata (PCA3) submetida à estimulação de fibroblastos associados ao câncer (CAFs, *cancer associated fibroblasts*). A expressão do miR-205-5p encontra-se ainda mais reduzida nos pacientes com câncer de próstata metastático e os subgrupos de pacientes com tumores primários com níveis de miR-205 semelhantes aos dos pacientes metastáticos, foram aqueles que apresentaram recidiva bioquímica em 5 anos (GANDELLINI et al. 2014). Em muitos estudos o miR-205-5p é encontrado com a expressão significativamente reduzida em tecidos tumorais quando comparada com a sua expressão em tecidos não tumorais (YAMADA et al. 2018), corroborando com o resultado encontrado nesse estudo.

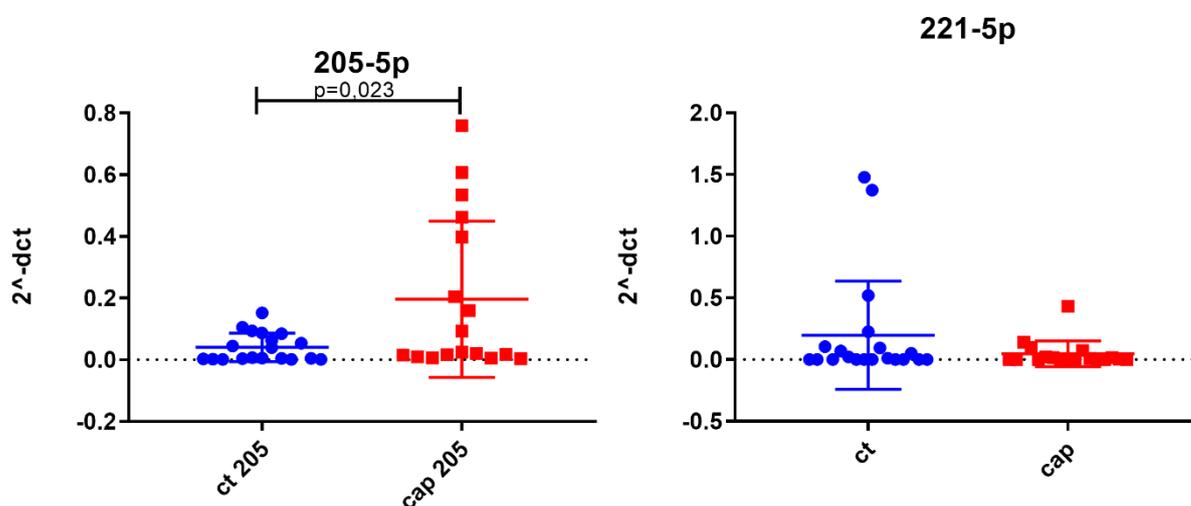
Para o miRNA 221-5p, os dados que constam na literatura são escassos e um pouco discrepantes entre trabalhos. A baixa expressão em tecido tumoral comparado com normal que observamos aqui não concorda com os dados de SHAO e colaboradores, que descrevem maior expressão do miR-221-5p no tecido tumoral em relação ao normal (SHAO et al. 2018). Por outro lado, o miR-221-5p foi descrito com menor expressão em linhagens celulares de câncer de próstata com caráter mesenquimal (PC3 e DU145) em relação a linhagens com características epiteliais (LNCap) (BARUAH & SHARMA 2021).

Para os miRNAs 25-5p, 214-5p e 155-5p, o resultado não foi significativo sendo que para os miRNAs 214-4p e 155-5p a expressão foi levemente maior nas regiões não tumorais (NT) em comparação com as regiões tumorais (T), e para o miRNA 25-3p a expressão foi levemente maior nas regiões tumorais (T) do que nas regiões não tumorais (NT).

3.2 Expressão de miRNAs no plasma

O gráfico a seguir (GRÁFICO 2) demonstra a diferença na expressão dos miRNAs 205-5p e 221-5p nas amostras de plasma, comparando a expressão entre amostras dos pacientes com câncer de próstata (CaP) com as amostras dos controles saudáveis (Ct). Os dados apresentados aqui são preliminares, pois o número de pacientes e controles será aumentado para 100 indivíduos em cada grupo.

GRÁFICO 2 – EXPRESSÃO DOS MIRNAS NO PLASMA



FONTE: A autora (2023).

Os resultados obtidos demonstram grande variabilidade na expressão dos miRNAs 205-5p e 221-5p nas amostras de plasma. Apesar da grande variação houve expressão significativamente maior de miR-205-5p nas amostras dos pacientes com câncer de próstata ($p = 0,023$) em relação aos indivíduos saudáveis. Para o miR-221-5p não houve diferença significativa de expressão entre os pacientes e controles saudáveis, mas a expressão foi um pouco mais alta nos controles. Os resultados são preliminares, mas indicam que o miR-205-5p pode ser um biomarcador importante do CaP. O próximo passo é aumentar o número de pacientes e controles e identificar se a variação nos níveis de expressão do miR-205-5p se correlaciona com parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes, tais como escore de Gleason, níveis de PSA e recorrência bioquímica.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foram coletadas amostras de pacientes submetidos à prostatectomia, das quais foram selecionadas regiões tumorais e não tumorais e fixadas em diferentes blocos de parafina.

Com base nos resultados das análises, pode-se concluir que alguns miRNAs estão diferencialmente expressos entre as regiões tumorais e não tumorais de

pacientes com câncer de próstata, mas há grande variabilidade nessa análise. Os miRNAs 205-5p e 221-5p apresentaram uma expressão significativamente maior nas regiões não tumorais em comparação com as regiões tumorais. Os achados relativos ao miR-205-5p são concordantes com a literatura, enquanto para o miR-221-5p não houve concordância. Já os miRNAs 25-3p, 214-4p e 155-5p não apresentaram diferenças significativas na expressão entre as regiões tumorais e não tumorais. No plasma, os resultados das análises demonstraram diferença significativa de expressão para o miR-205-5p, sendo a expressão maior no plasma de pacientes com CaP em comparação ao plasma de controles saudáveis.

É importante destacar que o câncer de próstata é uma doença altamente heterogênea, e isso foi evidenciado pela variação na expressão dos miRNAs até mesmo entre as amostras coletadas do mesmo paciente, em blocos diferentes.

Portanto, este estudo contribui para o avanço do conhecimento na área de biologia molecular do câncer de próstata, fornecendo informações sobre a expressão de miRNAs em regiões tumorais e não tumorais e destacando a importância da análise desses pequenos RNAs na compreensão da biologia tumoral e o potencial desses miRNAs em serem utilizados como biomarcadores para o câncer de próstata.

4.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Espera-se aumentar o número amostral de pacientes com câncer de próstata e controles saudáveis, chegando a 100 amostras de plasma de cada um dos grupos para realizar mais testes e avaliar se a variação na expressão do miR-205-5p se mantém maior no grupo de pacientes com câncer e correlacionar essa variação na expressão com parâmetros clínicos e laboratoriais dos pacientes. Se mais pacientes do Hospital Erasto Gaertner forem submetidos à prostatectomia, o número amostral de material fixado em parafina será aumentado e novas análises serão realizadas. É possível também aumentar o número de miRNAs a serem analisados com base em mais estudos em análise de dados de expressão gênica diferencial e busca na literatura por novos miRNAs que sejam identificados como relevantes para o câncer de próstata.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. **About Prostate Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about.html>>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- BARUAH, M. M.; SHARMA, N. miR-221 regulates proliferation, invasion, apoptosis and progression of prostate cancer cells by modulating E-cadherin/Wnt/ β catenin axis. **Advances in Cancer Biology-Metastasis**, v. 2, p. 100005, 2021.
- CHILDS, G. et al. A multiplexed marker-based algorithm for diagnosis of carcinoma of unknown primary using circulating miR-205. **Cancer Research**, v. 69, n. 13, p. 5601-5607, 2009.
- COOPERBERG, M. R. et al. Neoplasms of the Prostate Gland. In: McANINCH, J. W.; LUE, T. F. **Smith e Tanagho's General Urology**. 18. ed. Nova Iorque: Mc Graw Hill, 2013. p. 350-379.
- DE PAULA FARIA, L. S. et al. Perfil epidemiológico do câncer de próstata no Brasil: retrato de uma década. **Uningá Journal**, v. 57, n. 4, p. 76-84, 2020.
- CAMBRUZZI, Eduardo et al. Relação entre escore de Gleason e fatores prognósticos no adenocarcinoma acinar de próstata. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 61-68, 2010.
- FABRIS, L. et al. The potential of microRNAs as prostate cancer biomarkers. **European urology**, v. 70, n. 2, p. 312-322, 2016.
- FRIESTINO, J. K. O.; REZENDE, R.; LORENTZ, L. H.; SILVA, O. M. P. Mortalidade por Câncer de Próstata no Brasil: contexto histórico e perspectivas futuras. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 37, n. 3, p. 688-701, jul./set. 2013.
- GANDELLINI, P., et al. "miR-205 Exerts tumor-suppressive functions in human prostate through down-regulation of protein kinase Cepsilon." **Cancer Research**, vol. 74, no. 15, p. 5290-5302, 2014.

GANDHI, Jason et al. The molecular biology of prostate cancer: current understanding and clinical implications. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 21, n. 1, p. 22-36, 2018.

GOMES, Francisco da Costa et al. Prostate cancer incidence and mortality rates in different countries worldwide: An overview. **International journal of clinical practice**, v. 62, n. 2, p. 307-316, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 12 abr. 2023.

JEMAL, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2010). Global cancer statistics. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, 61(2), 69-90.

LITWIN, Mark S.; TAN, Hung-Jui. The diagnosis and treatment of prostate cancer: a review. **Jama**, v. 317, n. 24, p. 2532-2542, 2017.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. Prostate Cancer Screening (PDQ®) - **Health Professional Version**. 2022. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/prostate/hp/prostate-screening-pdq>> Acesso em: 29 mar. 2023.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Geo Series**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE48430>>. Acesso em: 10 abr. 2022.

PORKKA, K. P. et al. MicroRNA Expression Profiling in Prostate Cancer. **Cancer Res**, v. 67, n. 13, p. 6130-6135, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0533>>. Acesso em: 12 abr. 2023.

RHODEN, E. L.; AVERBECK, M. A. Câncer de próstata localizado. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 54, n. 1, p. 92-99, 2010.

SARRIS, Andrey Biff et al. Câncer de próstata: uma breve revisão atualizada. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 1, p. 101-109, 2018.

SHAO, N.; MA, G.; ZHANG, J.; ZHU, W. miR-221-5p enhances cell proliferation and metastasis through post-transcriptional regulation of SOCS1 in human prostate cancer. **BMC Urol.**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 14, mar. 2018. DOI: 10.1186/s12894-018-0325-8. PMID: 29506516; PMCID: PMC5836432.

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, e76994, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0076994.

TOLKACH, Y.; KRISTIANSEN, G. The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. **Pathobiology**, v. 85, n. 1-2, p. 108-116, 2018. doi: 10.1159/000477852.

YAMADA, Y. et al. Regulation of HMGB3 by antitumor miR-205-5p inhibits cancer cell aggressiveness and is involved in prostate cancer pathogenesis. **J Hum Genet**, v. 63, n. 2, p. 195-205, 2018. doi: 10.1038/s10038-017-0371-1.