

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

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
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
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
2.1	Objetivo geral.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
<b>3</b>	<b>ABORDAGEM METODOLÓGICA.....</b>	<b>42</b>
3.1	População e desenho do estudo.....	42
3.2	Critérios 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
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
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
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>67</b>
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
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>99</b>
	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  $\alpha$ -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)*

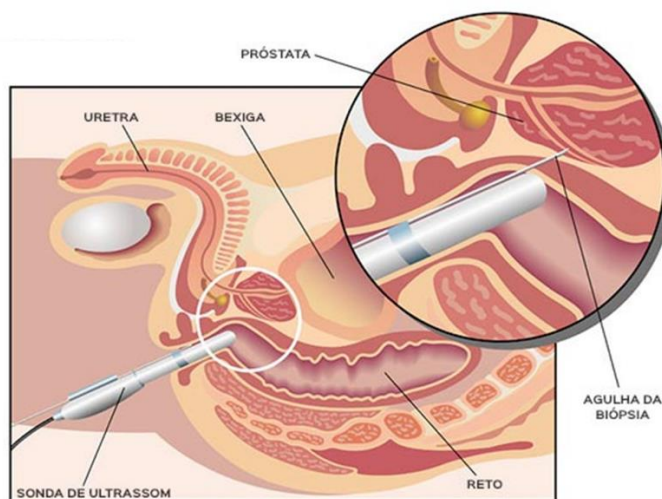
O gene *PTEN* é um gene supressor de tumor com quatro proteínas que geralmente estão alteradas no CaP. O gene produz uma proteína que desliga a via de sinalização PI3 K/AKT/mTOR, responsável pelo crescimento, metástase e sobrevivência celular. Evidências mostram que a mutação *PTEN* tem um escore de 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 predizer 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).

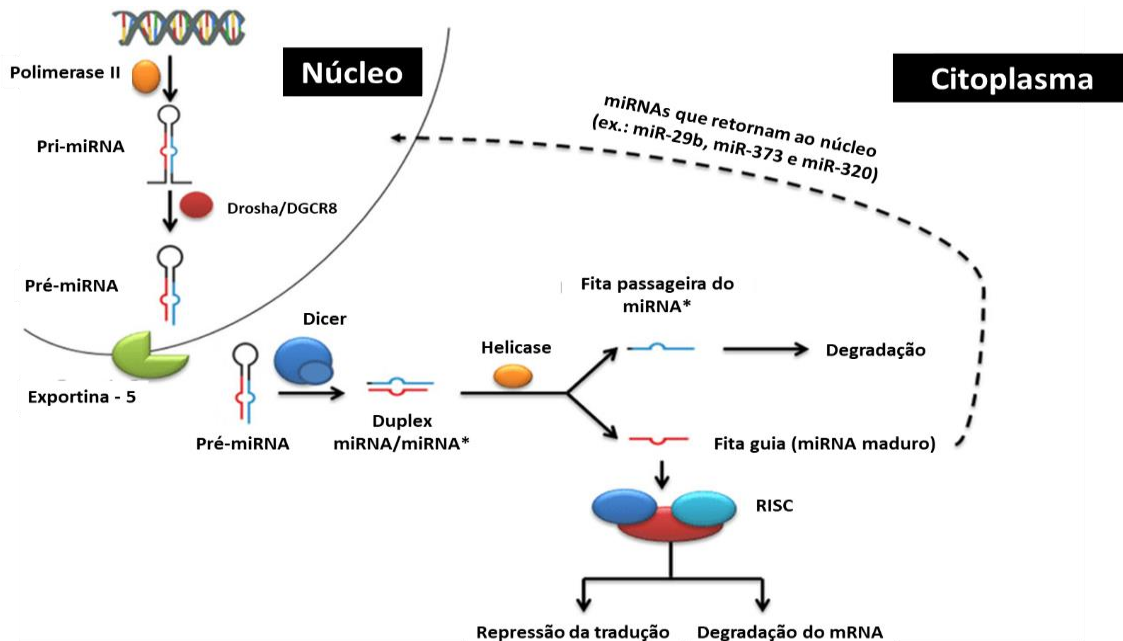
Os miRNAs são pequenos RNAs (18–24 nucleotídeos) de fita simples não codificadores, que regulam negativamente a expressão do gene através da ligação aos seus alvos de mRNA correspondentes. O primeiro miRNA descrito foi lin-4, identificado em 1993 por Lee e colaboradores no nematoide *Caenorhabditis elegans* (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).

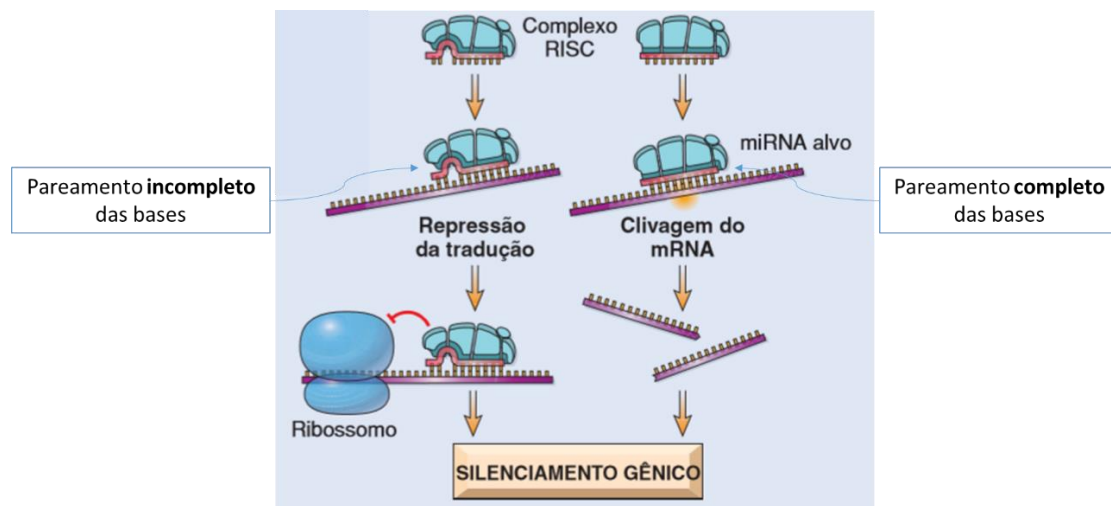
O silenciamento gênico promovido pelos miRNAs pode ocorrer por repressão da tradução, quando o miRNA faz um pareamento incompleto de bases nitrogenadas no mRNA, interrompendo a passagem do ribossomo, ou quando o pareamento de bases é completo, fazendo com que o complexo RISC clive a sequência do mRNA (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  $\mu\text{m}$ ) 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).

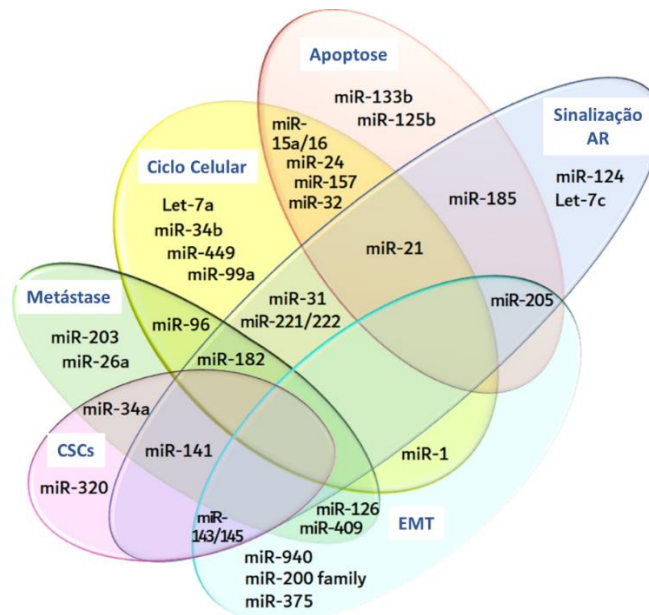
Atualmente, diferentes miRNAs estão envolvidos na carcinogênese humana agindo como "oncomirs" ou "miRNAs supressores de tumores", inibindo genes tumorais supressores ou ativando oncogenes, respectivamente (LAN *et al.*, 2015). O estudo dos perfis de expressão aberrante do miRNA no câncer é, de fato, 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



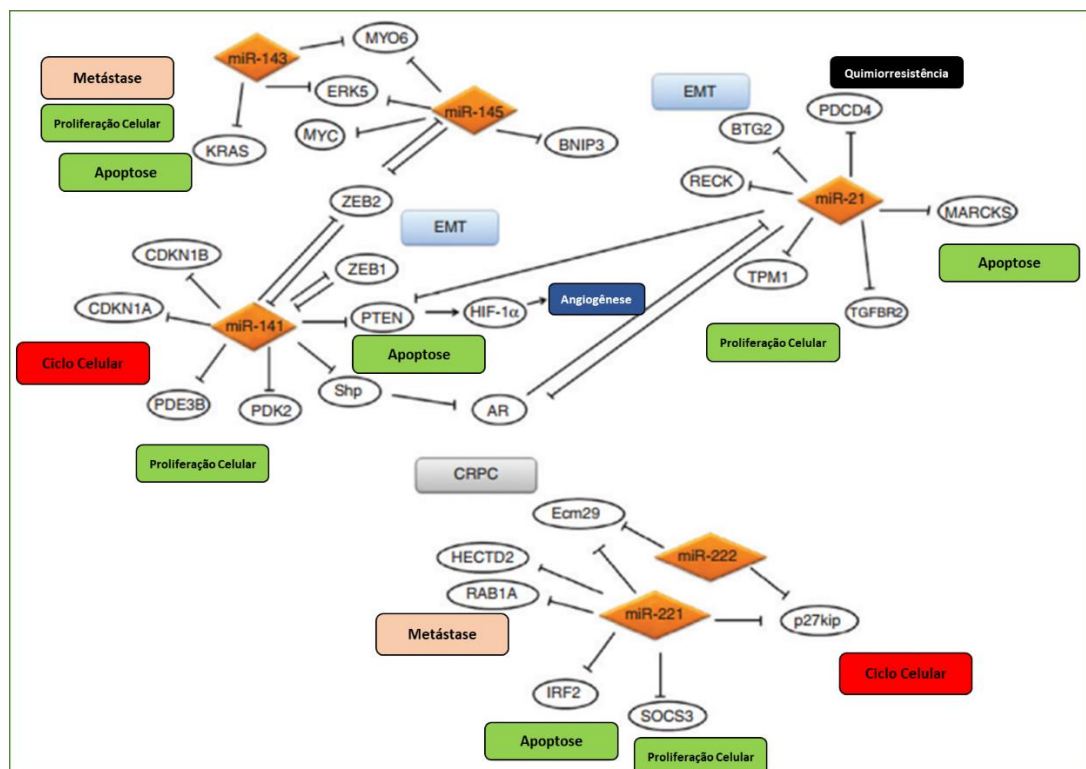
envolvidos na promoção ou inibição do desenvolvimento das CSCs. Os miRNAs excessivamente expressos podem causar a desregulação de vias de sinalização específicas associadas às funções das CSCs. Particularmente, a família miR-34 ou a família let-7 têm sido envolvidas na regulação das propriedades das 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 luminiais 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.

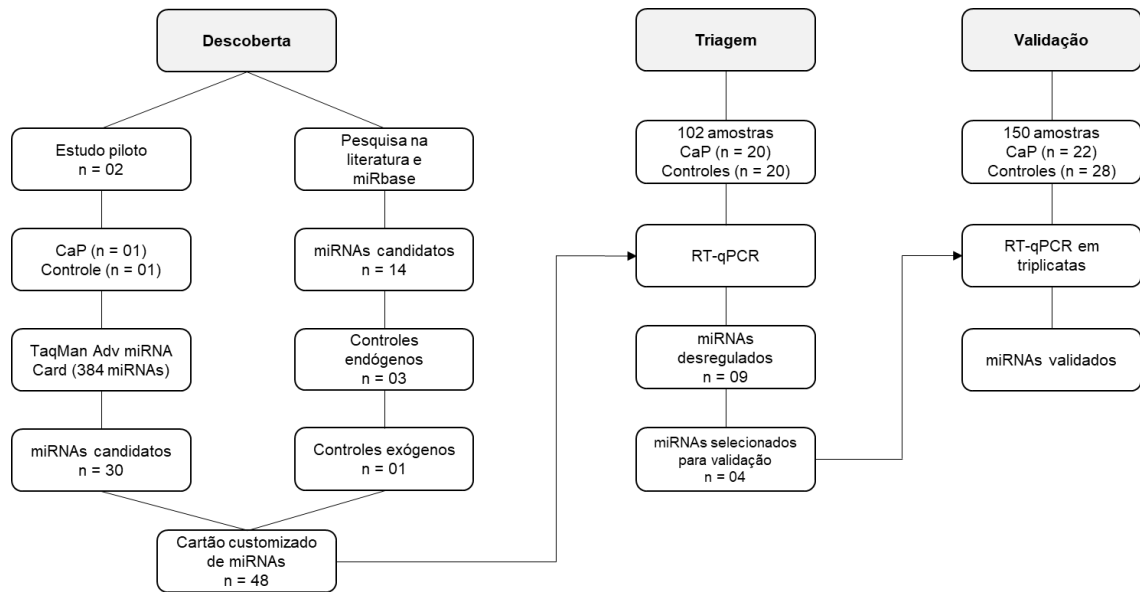
### 3 ABORDAGEM METODOLÓGICA

#### 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

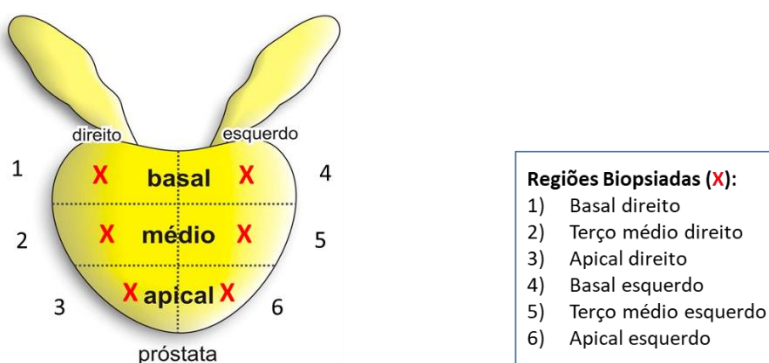
Foram incluídos no estudo os indivíduos do sexo masculino que tiveram indicação clínica de realizar biópsia prostática após apresentarem DRE ou exame laboratorial de PSA indicativos de anormalidade do funcionamento da próstata. Foram excluídos do estudo os indivíduos com diagnóstico de outros carcinomas.

### 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 µL 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 <sup>a</sup>	Identificação do miRBase <sup>b</sup>	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	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU
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	UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG
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	UGAUUUGUUUGAUUAUUAGGU
24	477952_mir	hsa-miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG
25	477963_mir	hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA
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 <sup>a</sup>	UGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGU
33	478335_mir	hsa-miR-496	UGAGUAUJACAUGGCCAAUCUC
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	AAAUGGUUCCCUUAGAGUGU
37	480872_mir	hsa-miR-548am-5p hsa-miR-548c-5p hsa-miR-548o-5p	AAAAGUAAUUGCGGUUUUGCC
38	478160_mir	hsa-miR-561-3p	CAAAGUUUAAGAUCUUGAAGU
39	478163_mir	hsa-miR-574-3p	CACGCUCAUGCACACCCACA
40	479059_mir	hsa-miR-579-3p	UUCAUUUGGUUAAACCGCGAUU
41	479073_mir	hsa-miR-589-5p	UGAGAACCACGUCUGCUCUGAG
42	479108_mir	hsa-miR-624-3p	CACAAGGUAAUUGGUAAUACCU

43	479121_mir	hsa-miR-642a-5p	GUCCCUCUCCAAAUGUGUCUUG
44	478368_mir	hsa-miR-654-5p	UGGUGGGCCGCAGAACAUGUGC
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

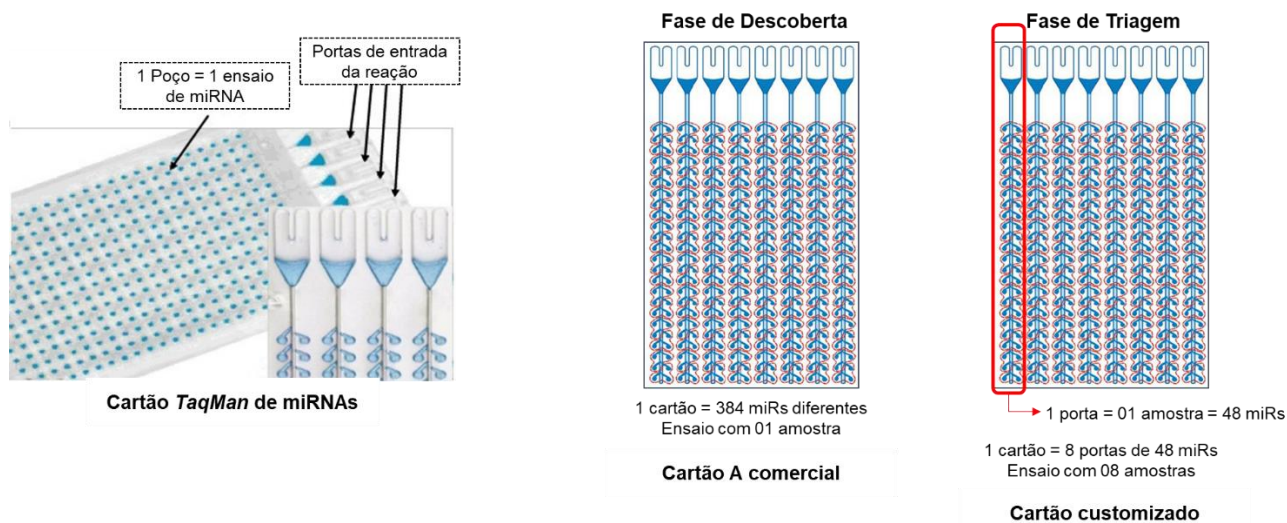
<sup>a</sup> Número de referência do ensaio no catálogo de miRNAs da Thermo Fischer Scientific; <sup>b</sup> Identificação do miRNA no *miRBase* v21.0; hsa=homem sapiens; cel=*Caenorhabditis elegans*.

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 Viiia 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 <sup>a</sup>	Identificação do miRBase <sup>b</sup>	Sequência de RNA
477975_mir	hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
477992_mir	hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
477963_mir	hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAUAUGAUGA
478074_mir	hsa-miR-375	UUUGUUCGUUCGGCUCGCGUGA
480872_mir	hsa-miR-548am-5p hsa-miR-548c-5p hsa-miR-548o-5p	AAAAGUAAUUGCGGUUUUUGCC
478293_mir	cel-miR-39	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

<sup>a</sup> Número de referência do ensaio no catálogo de miRNAs da Thermo Fischer Scientific; <sup>b</sup> 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  $\leq 35$ . 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  $\Delta Cq$  da amostra em relação ao  $\Delta Cq$  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.



## 4 RESULTADOS

No período de novembro de 2016 a junho de 2018 foram recrutados 70 pacientes para o estudo, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Destes, 50 pacientes foram escolhidos para realização dos ensaios moleculares, uma vez que somente nestes pacientes foi obtida a coleta dos três espécimes clínicos necessários (tecido prostático, sangue e urina). Os 50 indivíduos foram divididos em dois grupos de estudo, no qual o grupo dos casos representaram 22 pacientes com CaP e o grupo dos controles 28 pacientes sem câncer, baseado no resultado do exame histopatológico.

### 4.1 Resultados das características clínicas e laboratoriais dos pacientes

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes analisados no estudo foram listadas na Tabela 4. A partir dos resultados apresentados é possível verificar que não houve diferenças significativas entre os casos e controles de ambas as amostras em relação à idade, exame de PSA, histórico familiar de CaP e tabagismo ( $P > 0,05$ ). Nota-se que as distribuições de características clínicas e laboratoriais foram comparadas entre todos os indivíduos incluídos nas fases de *descoberta*, *triagem* e *validação*.

**Tabela 4 – Características clínicas e laboratoriais de todos os pacientes analisados no estudo**

	Grupo CaP	Grupo Controle	Valor P
<b>Pacientes (n)</b>	22	28	
<b>Idade média ± DP, anos</b>	65,05 ± 7,6	65,0 ± 6,2	0,981
<b>PSA, n (%)</b>			
<10 ng/mL	10 (45,5)	17 (60,7)	0,092
10-20 ng/mL	4 (18,2)	8 (28,6)	
>20 ng/mL	8 (36,4)	3 (10,7)	
<b>Escore Gleason, n(%)</b>			
≤6	9 (40,9)	-	-
7	6 (27,3)	-	
≥8	7 (31,8)	-	
<b>Histórico familiar de CaP, n (%)</b>			
Sim	5 (22,7)	6 (21,4)	1,000
Não	17 (77,3)	22 (78,6)	
<b>Tabagismo, n (%)</b>			
Sim	8 (36,4)	12 (42,9)	0,773
Não	14 (63,6)	16 (57,1)	

Variáveis calculadas na forma de média ± desvio padrão (DP) ou em percentual (%), quando apropriado. Valores de P foram calculados utilizando o teste t de Student.

Fonte: elaborado pelo autor.

## 4.2 Resultados da fase de descoberta de miRNAs

Através de dois ensaios de RT-qPCR foram analisados 384 miRNAs humanos em duas amostras de tecido da próstata (uma amostra de paciente com CaP e outra de indivíduo controle), utilizando um cartão A comercial *TaqMan Advanced miRNA* para cada amostra. De acordo com o exame histopatológico, o fragmento de tecido prostático selecionado como controle positivo para CaP apresentava 100% de células neoplásicas de seu volume total e escore de Gleason grau 7 (3+4). Já os resultados do exame de PSA dos pacientes com CaP e controle testados foram 21,5 e 7,6 ng/mL, respectivamente.

Devido ao baixo número de amostras nessa fase, uma normalização global dos dados foi realizada para avaliar os resultados de expressão relativa entre os dois ensaios. Comparando os dois ensaios, 304 miRNAs apresentaram uma ampla variação de expressão ( $\Delta Cq$  1 a 13) entre o tecido com CaP e tecido não cancerígeno. Como a maioria dos miRNAs testados apresentaram diferença de expressão, para selecionar os alvos mais diferencialmente expressos, foi estabelecido um  $\Delta Cq \geq 5$  como um limiar entre os resultados do caso e controle. A partir deste critério, foram selecionados 30 miRNAs mais diferencialmente expressos neste ensaio piloto.

Além dos 30 miRNAs selecionados no ensaio piloto, 21 miRNAs potencialmente associados ao CaP também foram selecionados a partir da literatura científica disponível e base de dados do miRbase v21.0. Entre os 51 miRNAs selecionados haviam 07 miRs encontrados em ambas fontes de seleção, o que resultou num total de 44 miRNAs selecionados nesta etapa (QUADRO 1).

**Quadro 1 – MiRNAs selecionados no ensaio piloto, literatura científica e miRbase**

Fonte de seleção	miRNAs selecionados
Ensaio piloto (n=30)	miR-9-5p, <b>miR-18a-5p</b> , <b>miR-18b-5p</b> , <b>miR-19b-3p</b> , miR-105-5p, miR-122-5p, miR-124-3p, miR-129-5p, miR-139-3p, <b>miR-141-3p</b> , <b>miR-184</b> , miR-190a-5p, miR-204-5p, miR-216a-5p, miR-296-3p, miR-449a, miR-496, miR-507, miR-517a-3p, miR-522-3p, miR-548am-5p, miR-561-3p, miR-579-3p, miR-589-5p, miR-624-3p, miR-642a-5p, miR-654-5p, <b>miR-671-3p</b> , miR-885-5p, <b>miR-888-5p</b>
Literatura científica e miRbase (n=21)	let-7c-5p, <b>miR-18a-5p</b> , <b>miR-18b-5p</b> , miR-19a-3p, <b>miR-19b-3p</b> , miR-21-5p, miR-30c-5p, miR-100-5p, miR-107, <b>miR-141-3p</b> , miR-148a-3p, <b>miR-184</b> , miR-187-3p, miR-200b-3p, miR-205-5p, miR-214-3p, miR-221-3p, miR-375, miR-574-3p, <b>miR-671-3p</b> , <b>miR-888-5p</b>

Os miRNAs destacados em vermelho foram selecionados em ambas fontes de seleção.

Fonte: elaborado pelo autor.

Juntamente aos 44 miRNAs alvos foram selecionados 04 controles de referência, totalizando 48 miRNAs customizados em um cartão do tipo *TaqMan*, previamente descritos na Tabela 2.

### 4.3 Resultados da fase de triagem de miRNAs

As expressões dos 44 miRNAs alvos selecionados na fase de *descoberta* foram avaliadas em tecido prostático, plasma e urina de pacientes com CaP e controles em 28, 34 e 40 amostras de cada espécime clínico, respectivamente. Desses 44 miRNAs pesquisados, 36 (81,8%) apresentaram expressão detectável no tecido da próstata em mais de 30% das amostras. Seis desses 36 miRNAs (miR-148a-3p, miR-18a-5p, miR-200b-3p, miR-205-5p, miR-21-5p e miR-375) foram diferentemente expressos entre casos e controles (Tabela 5).

**Tabela 5 – Expressão relativa dos miRNAs no tecido prostático na fase de triagem utilizando cartão customizado de 48 miRNAs**

<i>miRNA</i>	<i>Grupo Controle (n = 14)</i>	<i>Grupo CaP (n = 14)</i>	<b>Valor de <i>P</i>*</b>
let-7c-5p	2,75 (2,01–7,98)	1,83 (0,68–6,00)	0,174
hsa-miR-100-5p	1,75 (1,25–2,96)	1,51 (0,71–16,75)	0,613
hsa-miR-107	0,15 (0,02–0,59)	0,06 (0,03–0,49)	0,753
hsa-miR-124-3p	0,20 (0,08–1,00)	0,21 (0,04–0,94)	0,908
hsa-miR-129-5p	0,24 (0,03–0,30)	0,15 (0,09–0,40)	0,643
hsa-miR-139-3p	0,35 (0,01–2,36)	ND	–
hsa-miR-141-3p	0,34 (0,12–0,69)	0,54 (0,35–1,69)	0,351
<b>hsa-miR-148a-3p</b>	<b>0,60 (0,21–0,76)</b>	<b>1,18 (0,84–2,65)</b>	<b>0,020</b>
hsa-miR-184	0,53 (0,28–7,16)	0,53 (0,07–6,40)	0,825
hsa-miR-187-3p	0,23 (0,13–0,72)	0,14 (0,03–0,45)	0,141
<b>hsa-miR-18a-5p</b>	<b>1,76 (0,07–5,30)</b>	<b>8,56 (1,74–56,75)</b>	<b>0,024</b>
hsa-miR-18b-5p	0,40 (0,13–0,80)	1,89 (0,45–22,56)	0,086
hsa-miR-190a-5p	0,18 (0,09–7,86)	0,20 (0,10–31,46)	0,783
hsa-miR-19a-3p	1,32 (0,36–9,37)	4,64 (1,25–54,79)	0,130
hsa-miR-19b-3p	0,24 (0,13–1,16)	0,60 (0,26–1,20)	0,408
<b>hsa-miR-200b-3p</b>	<b>1,50 (0,67–2,54)</b>	<b>3,84 (1,76–6,25)</b>	<b>0,031</b>
hsa-miR-204-5p	0,88 (0,55–1,16)	0,98 (0,37–2,41)	0,394
<b>hsa-miR-205-5p</b>	<b>0,97 (0,57–1,65)</b>	<b>0,39 (0,03–0,88)</b>	<b>0,042</b>
<b>hsa-miR-21-5p</b>	<b>0,63 (0,46–0,78)</b>	<b>1,56 (0,71–2,20)</b>	<b>0,002</b>
hsa-miR-214-3p	0,51 (0,34–0,70)	0,58 (0,43–0,72)	0,257
hsa-miR-216a-5p	0,009 (0,002–0,04)	0,02 (0,009–0,56)	0,268
hsa-miR-221-3p	0,59 (0,40–0,72)	0,52 (0,28–0,64)	0,455
hsa-miR-30c-5p	0,38 (0,26–0,56)	0,50 (0,34–0,96)	0,084
<b>hsa-miR-375</b>	<b>0,36 (0,22–0,97)</b>	<b>1,81 (1,11–4,49)</b>	<b>0,006</b>
hsa-miR-449a	0,58 (0,13–2,32)	1,63 (0,17–8,63)	0,140
hsa-miR-496	0,24 (0,14–1,40)	0,37 (0,28–0,76)	0,848
hsa-miR-507	0,50 (0,13–1,49)	0,78 (0,04–4,09)	0,890
hsa-miR-517a-3p	0,44 (0,11–1,39)	0,56 (0,25–1,81)	0,680
hsa-miR-548am-5p	1,80 (0,27–5,64)	0,88 (0,44–4,66)	0,783
hsa-miR-574-3p	0,70 (0,51–1,01)	0,81 (0,59–1,29)	0,667
hsa-miR-589-5p	0,06 (0,05–1,19)	0,23 (0,05–11,03)	0,177
hsa-miR-624-3p	3,67 (0,20–14,66)	3,64 (0,52–6,00)	0,685
hsa-miR-654-5p	0,10 (0,04–2,30)	0,50 (0,08–2,91)	0,390

hsa-miR-671-3p	0,08 (0,04–0,37)	0,15 (0,10–0,45)	0,473
hsa-miR-885-5p	0,35 (0,08–0,67)	0,29 (0,18–0,50)	0,874
hsa-miR-9-5p	0,33 (0,07–0,54)	0,66 (0,11–2,26)	0,383

Dados apresentados em medianas (percentis 25 e 75) dos valores de *n-fold-changes* de expressão. Todos os valores de *P* foram obtidos através do teste *t* de Student usando a variável corrigida por log, exceto para miR-100-5p, miR-129-5p, miR-190a-5p, miR-19b-3p, miR-200b-3p e miR-496, os quais não apresentaram distribuição normal, e seus valores de *P* foram calculados pelo teste de Mann-Whitney. ND (não detectado) = expressão de miRNA não observada neste grupo. \*Valores de *P* em negrito significam  $P < 0,05$ .

Fonte: elaborado pelo autor.

Nas amostras de plasma, 21 miRNAs (47,7%) apresentaram expressão detectável, mas apenas 5 (miR-100-5p, miR-200b-3p, miR-214-3p, miR-375 e miR-548am-5p) foram significativamente expressos ( $P < 0,05$ ), ao comparar os dois grupos (Tabela 6).

**Tabela 6 – Expressão relativa dos miRNAs no plasma na fase de triagem utilizando cartão customizado de 48 miRNAs**

miRNA	Grupo Controle (n = 17)	Grupo CaP (n = 17)	Valor de <i>P</i> *
<b>hsa-miR-100-5p</b>	<b>1,30 (0,69–1,69)</b>	<b>3,13 (1,05–84,58)</b>	<b>0,012</b>
hsa-miR-107	0,09 (0,04–0,25)	0,10 (0,05–0,31)	0,531
hsa-miR-122-5p	0,93 (0,35–1,38)	0,92 (0,43–2,04)	0,430
hsa-miR-148a-3p	1,24 (0,97–1,80)	1,06 (0,82–1,63)	0,454
hsa-miR-18a-5p	0,03 (0,01–0,05)	0,01 (0,005–0,07)	0,977
hsa-miR-18b-5p	9,57 (2,95–66,79)	5,58 (2,57–17,21)	0,165
hsa-miR-190a-5p	0,67 (0,25–31,05)	4,86 (0,43–70,45)	0,312
hsa-miR-19a-3p	0,01 (0,004–0,03)	0,01 (0,005–0,04)	0,684
hsa-miR-19b-3p	1,30 (0,54–3,70)	1,31 (0,41–4,99)	0,800
<b>hsa-miR-200b-3p</b>	<b>0,02 (0,007–0,03)</b>	<b>0,11 (0,02–0,24)</b>	<b>0,008</b>
hsa-miR-204-5p	1,95 (0,53–37,67)	1,83 (0,47–3,17)	0,161
hsa-miR-205-5p	0,03 (0,01–0,07)	0,07 (0,007–0,14)	0,402
hsa-miR-21-5p	0,72 (0,65–1,07)	0,91 (0,64–1,00)	0,895
<b>hsa-miR-214-3p</b>	<b>0,25 (0,11–0,42)</b>	<b>0,52 (0,32–0,59)</b>	<b>0,003</b>
hsa-miR-216a-5p	1,43 (1,21–4,61)	2,30 (1,23–20,83)	0,539
hsa-miR-221-3p	0,38 (0,33–0,53)	0,49 (0,31–0,60)	0,554
hsa-miR-30c-5p	10,33 (7,25–19,28)	7,90 (6,25–14,06)	0,385
<b>hsa-miR-375</b>	<b>0,05 (0,03–0,10)</b>	<b>0,11 (0,05–0,47)</b>	<b>0,040</b>
<b>hsa-miR-548am-5p</b>	<b>0,17 (0,06–0,30)</b>	<b>0,92 (0,27–5,45)</b>	<b>0,002</b>
hsa-miR-579-3p	0,04 (0,01–0,69)	0,10 (0,02–0,69)	0,666
hsa-miR-885-5p	0,49 (0,25–0,75)	0,53 (0,35–1,42)	0,141

Dados apresentados em medianas (percentis 25 e 75) dos valores de *n-fold-changes* de expressão. Todos os valores de *P* foram obtidos através do teste *t* de Student usando a variável corrigida por log, exceto para miR-205-5p, o qual não apresentou distribuição normal, e seu valor de *P* foi calculado pelo teste de Mann-Whitney. ND (não detectado) = expressão de miRNA não observada neste grupo. \*Valores de *P* em negrito significam  $P < 0,05$ .

Fonte: elaborado pelo autor.

Das 40 amostras de urina, duas foram excluídas da análise devido ausência de expressão do controle exógeno cel-miR-39, resultando em 19 amostras em cada grupo. Analisando as 38 amostras urinárias, 19 miRNAs (43,2%) tiveram expressão detectável, mas apenas 2 miRNAs (miR-21-5p e miR-375) foram expressos de forma significativa na comparação entre casos e controles (Tabela 7).

**Tabela 7 – Expressão relativa dos miRNAs na urina na fase de triagem utilizando cartão customizado de 48 miRNAs**

MiRNA	Grupo Controle (n = 19)	Grupo CaP (n = 19)	Valor de P*
hsa-miR-100-5p	0,022 (0,001; 6,980)	0,004 (0,001; 0,184)	0,413
hsa-miR-107	0,001 (0,0002; 0,006)	0,001 (0,0001; 0,013)	0,664
hsa-miR-124-3p	0,343 (0,308; 349,26)	2,910 (0,410; 4,530)	0,734
hsa-miR-129-5p	0,029 (0,005; 2,920)	0,221 (0,035; 0,506)	0,475
hsa-miR-148a-3p	0,002 (0,0004; 0,025)	0,008 (0,001; 0,020)	0,279
hsa-miR-187-3p	0,047 (0,016; -)	0,010 (0,002; 0,316)	0,236
hsa-miR-190a-5p	1,007 (0,064; 55,34)	0,457 (0,009; 7,819)	0,335
hsa-miR-19a-3p	0,003 (0,0003; 0,197)	0,003 (0,001; 0,010)	0,934
hsa-miR-19b-3p	0,037 (0,004; 1,130)	0,128 (0,013; 3,769)	0,364
hsa-miR-200b-3p	0,001 (0,00005; 0,013)	0,002 (0,0003; 0,009)	0,495
hsa-miR-204-5p	0,008 (0,002; 0,030)	0,011 (0,004; 0,070)	0,322
hsa-miR-205-5p	0,002 (0,00008; 0,006)	0,005 (0,001; 0,028)	0,059
<b>hsa-miR-21-5p</b>	<b>0,0001 (0,00002; -0,001)</b>	<b>0,0003 (0,0001; 0,002)</b>	<b>0,049</b>
hsa-miR-214-3p	0,039 (0,020; 0,089)	0,045 (0,015; 0,060)	0,838
hsa-miR-216a-5p	0,138 (0,044; 0,292)	0,304 (0,012; 1,500)	0,524
hsa-miR-221-3p	0,005 (0,00006; 0,143)	0,016 (0,005; 0,069)	0,415
hsa-miR-30c-5p	0,007 (0,0005; 0,185)	0,009 (0,003; 0,622)	0,386
<b>hsa-miR-375</b>	<b>0,942 (0,420; 7,877)</b>	<b>4,862 (2,184; 23,08)</b>	<b>0,048</b>
hsa-miR-507	0,022 (0,011; 0,035)	0,034 (0,024; 0,071)	0,142

Dados apresentados em medianas (percentis 25 e 75) dos valores de *n-fold-changes* de expressão. ND (não detectado) = expressão de miRNA não observada neste grupo. \*Valores de P calculados pelo teste de *Mann-Whitney*. Valores de P em negrito foram significativos  $P < 0,05$ .

Fonte: elaborado pelo autor.

Nesta segunda fase, em que foi possível analisar a expressão dos miRNAs com um número amostral maior, observa-se que todos os miRNAs diferentemente expressos ( $P < 0,05$ ) nos três espécimes clínicos foram mais expressos (maior quantidade do alvo) no grupo CaP em comparação com os controles, exceto o miR-205-5p que foi mais expresso no grupo controle nas amostras de tecido prostático. Além disso, dentre todos os miRNAs testados, o miR-375 apresentou expressão aumentada nos indivíduos do grupo CaP, tanto nas amostras de tecido da próstata, plasma e urina, tornando-se um potencial biomarcador a ser avaliado.

#### 4.4 Resultados da fase de validação dos miRNAs

Foram encontrados um total de nove miRNAs diferentemente expressos entre os grupos CaP e controle durante a fase de triagem, considerando os três tipos de espécimes clínicos. Desses nove alvos, quatro miRNAs foram escolhidos para o processo de validação através do ensaio molecular de RT-qPCR: miR-200b-3p, miR-21-5p, miR-375 e miR-548am-5p. Esses quatro miRNAs foram selecionados com base nos critérios descritos no capítulo Abordagem Metodológica. Conforme

demonstrado na Tabela 8, nem todos os miRNAs encontrados na fase de triagem como potenciais biomarcadores de CaP mantiveram suas diferenças de expressão estatisticamente significativas na etapa de validação. Todos os miRNAs testados no tecido da próstata (miR-21-5p, miR-200b-3p e miR-375) foram regulados positivamente no grupo CaP em comparação ao grupo controle, apresentando valores de *fold change* de 1,86, 1,64 e 5,89, bem como significância estatística de  $P = 0,003$ ,  $P = 0,030$  e  $P < 0,001$ , respectivamente. A Figura 9 traz a representação gráfica desta regulação positiva (Fig. 9A: miR-21-5p, Fig. 9B: miR-200b-3p e Fig. 9C: miR-375). Nas amostras de plasma, o miR-375 também foi regulado positivamente no grupo CaP em comparação com os indivíduos controle ( $P = 0,012$ ; Tabela 8; Fig. 9F) com um valor de *fold change* = 1,44. Da mesma forma, o miR-200b-3p apresentou expressão mais elevada no grupo CaP, embora a comparação com as amostras de controle não tenha atingido significância estatística formal ( $P = 0,067$ ; Tabela 8; Fig. 9E). O miR-548am-5p não demonstrou diferença de expressão nas amostras de plasma na fase de validação. Além disso, não foram detectadas diferenças significativas na expressão do miR-21-5p e miR-375 nas amostras urinárias entre os grupos caso e controle (Tabela 8; Fig. 9G, 9H). Nestas análises os miRNAs teciduais e plasmáticos foram normalizados com o miR-24-3p. Já o cel-miR-39 foi utilizado como normalizador na análise dos miRNAs urinários.

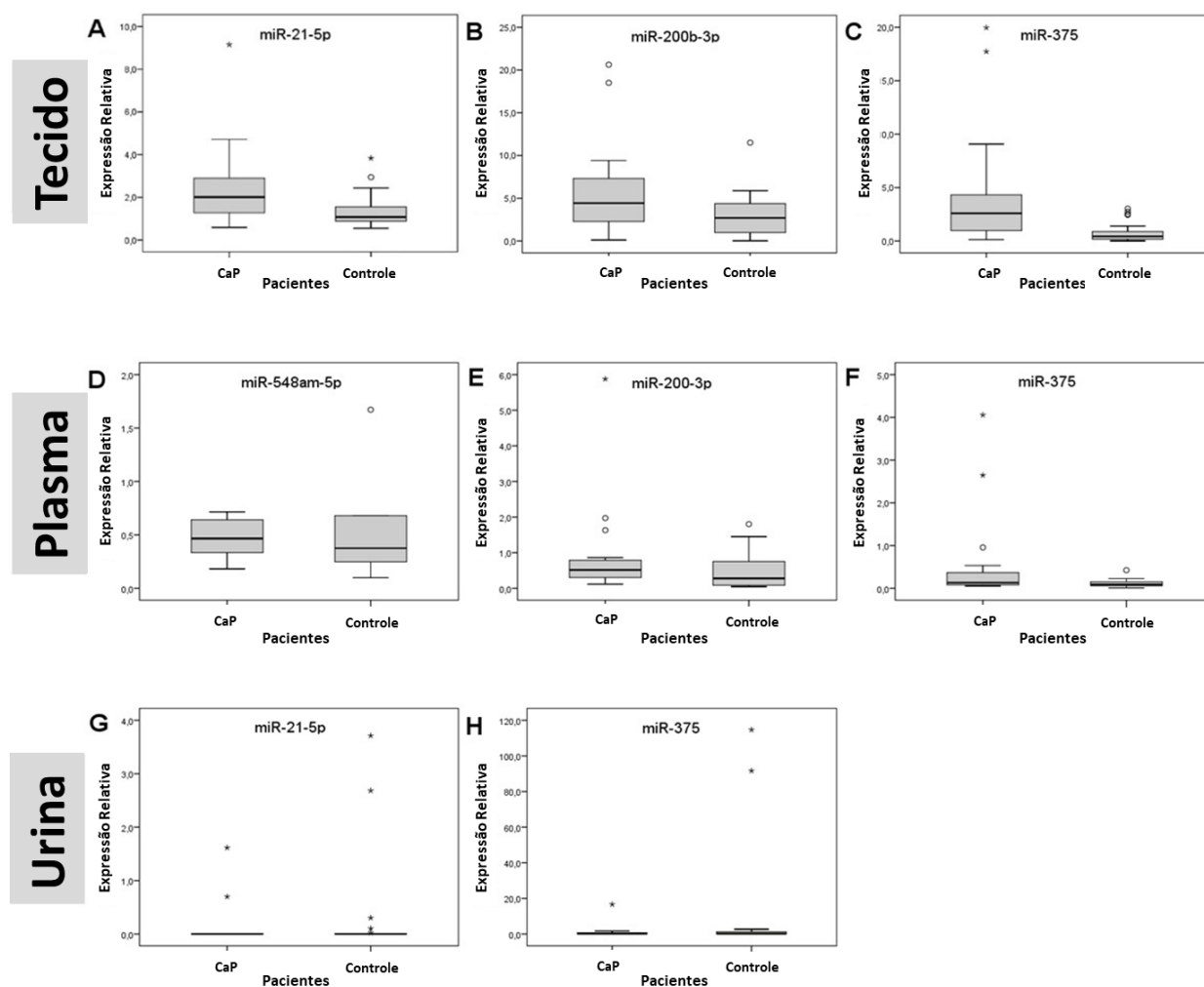
**Tabela 8 – Expressão dos miRNAs no tecido prostático, plasma e urina de pacientes CaP e controles na fase de validação**

<i>miRNA</i>	<i>Grupo Controle (n = 28)</i>	<i>Grupo CaP (n = 22)</i>	<i>Fold change</i>	<i>Valor de P*</i>
<i>Tecido</i>				
hsa-miR-21-5p	1,08 (0,88–1,59)	2,01 (1,27–2,92)	<b>1,86</b>	<b>0,003</b>
hsa-miR-200b-3p	2,70 (0,98–4,55)	4,43 (2,28–7,41)	<b>1,64</b>	<b>0,030</b>
hsa-miR-375	0,44 (0,15–0,92)	2,59 (0,88–4,44)	<b>5,89</b>	<b>&lt;0,001</b>
<i>Plasma</i>				
hsa-miR-200b-3p	0,28 (0,09–0,85)	0,52 (0,27–0,80)	1,86	0,067
hsa-miR-375	0,09 (0,06–0,15)	0,13 (0,08–0,40)	<b>1,44</b>	<b>0,012</b>
hsa-miR-548am-5p	0,38 (0,21–0,93)	0,47 (0,29–0,64)	1,24	0,775
<i>Urina</i>				
hsa-miR-21-5p	0,0004 (0,0001–0,0091)	0,0004 (0,0002–0,0019)	1,00	1,000
hsa-miR-375	0,16 (0,06–1,55)	0,06 (0,04–0,71)	0,38	0,279

Dados apresentados sob forma de medianas (percentis 25 – 75) de valores em *n-fold changes*. \*Valores de *P* em negrito tem significância estatística ( $P < 0,05$ ).

Fonte: elaborado pelo autor.

**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**



Boxplots representam o primeiro e terceiro quartil, sendo a mediana representada pela linha horizontal interna.

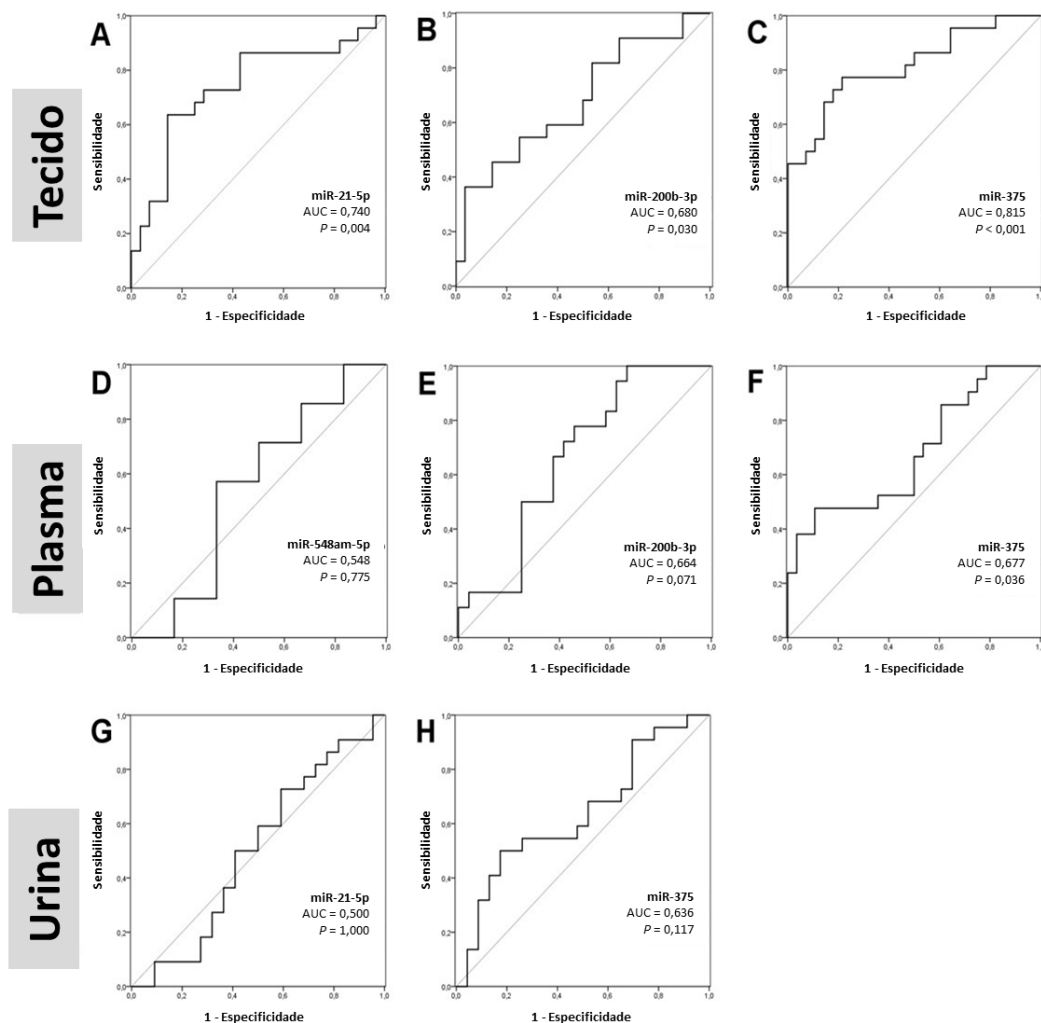
Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.5 miRNAs como biomarcadores de diagnóstico

As análises ROC foram realizadas para avaliar a capacidade dos miRNAs de discriminar entre os pacientes com CaP e os indivíduos controles (Figura 10; Tabela 9). Com base nos resultados das curvas ROC, o valor de AUC mais elevado foi encontrado na pesquisa do miR-375 (Fig. 10C) em amostras de tecido da próstata (0,815, IC 95% 0,693-0,937). O miR-21-5p também mostrou um alto valor de AUC: 0,740 (IC 95% 0,594-0,886), seguido do miR-200-3p com um bom valor de AUC (0,680, IC 95% 0,529-0,832) (Figura 10A e 10B, respectivamente). Nas amostras de

plasma, o miR-375 também mostrou um bom valor de AUC: 0,677, IC 95% 0,522-0,832. Da mesma forma, o miR-200b-3p apresentou um valor de AUC de 0,664 (IC 95% 0,500-0,829), embora o valor de  $P$  não fosse significativo ( $P = 0,071$ ; Figura 10E). Nesta análise, o miR-375 apresentou valores de 0,773 de sensibilidade e 0,786 de especificidade para amostras de tecido da próstata e 0,476 e 0,893 para plasma, respectivamente (Tabela 9). O miR-21-5p e o miR-375 nas amostras de urina não mostraram valores de AUC estatisticamente significativos (Figura 10G e 10H, respectivamente). Além disso, foi escolhido um valor de *cut-off* para maximizar a sensibilidade e especificidade, aplicando o índice de Youden (máximo = sensibilidade + especificidade - 1) para cada análise ROC (Tabela 9).

**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**



Fonte: elaborado pelo autor.



**Tabela 9 – Valores de sensibilidade e especificidade dos miRNAs pesquisados na fase de validação a partir da análise das curvas ROC**

miRNA	AUC	95% CI	Valor de <i>P</i> *	Cut-off	Sensibilidade	Especificidade
<i>Tecido</i>						
miR-21-5p	0,740	0,594-0,886	<b>0,004</b>	1,725	0,636	0,857
miR-200b-3p	0,680	0,529-0,832	<b>0,030</b>	6,312	0,364	0,964
miR-375	0,815	0,693-0,937	<b>&lt;0,001</b>	0,957	0,773	0,786
<i>Plasma</i>						
miR-200b-3p	0,664	0,500-0,829	0,071	0,116	1,000	0,333
miR-375	0,677	0,522-0,832	<b>0,036</b>	0,178	0,476	0,893
miR-548am-5p	0,548	0,207-0,888	0,775	0,462	0,571	0,667
<i>Urina</i>						
miR-21-5p	0,500	0,325-0,675	1,000	0,0002	0,727	0,409
miR-375	0,636	0,472-0,801	0,117	0,063	0,500	0,826

Os valores de AUC, *cut-off*, sensibilidade e especificidade foram calculados a partir da análise das curvas ROC, conforme descrito no capítulo Abordagem Metodológica.

\*Os valores de *P* em negrito foram significativos a  $P < 0,05$ .

Fonte: elaborado pelo autor.

Foi realizada uma análise comparativa do poder de diagnóstico da combinação de miRNAs circulantes (miRNAs plasmáticos) juntamente com valores de PSA, através do uso de um modelo de regressão logística (Tabela 10). Todas as medidas de combinação não mostraram melhora significativa dos valores da AUC para miR-375 e miR-200-3p. A análise combinada revelou o par miR-375 / miR-200b-3p com o maior valor de AUC (0,674), embora o miR-375 individualmente tenha expressado 0,677 em amostras de plasma. De acordo com o índice de Youden, todas as combinações expressaram especificidade elevada (0,964 – 1,00), mas baixa sensibilidade. Já em relação a análise de curva ROC múltipla, o par miR-375 / miR-200b-3p combinado com os valores de PSA, também não resultou em diferenças significativas de valores AUC comparado aos valores das outras combinações (Figura 11). Entretanto, foi revelado que os valores individuais de AUC do miR-375 e miR-200b-3p foram maiores, quando comparados com o PSA individualmente (AUC = 0,590; Tabelas 9 e 10).

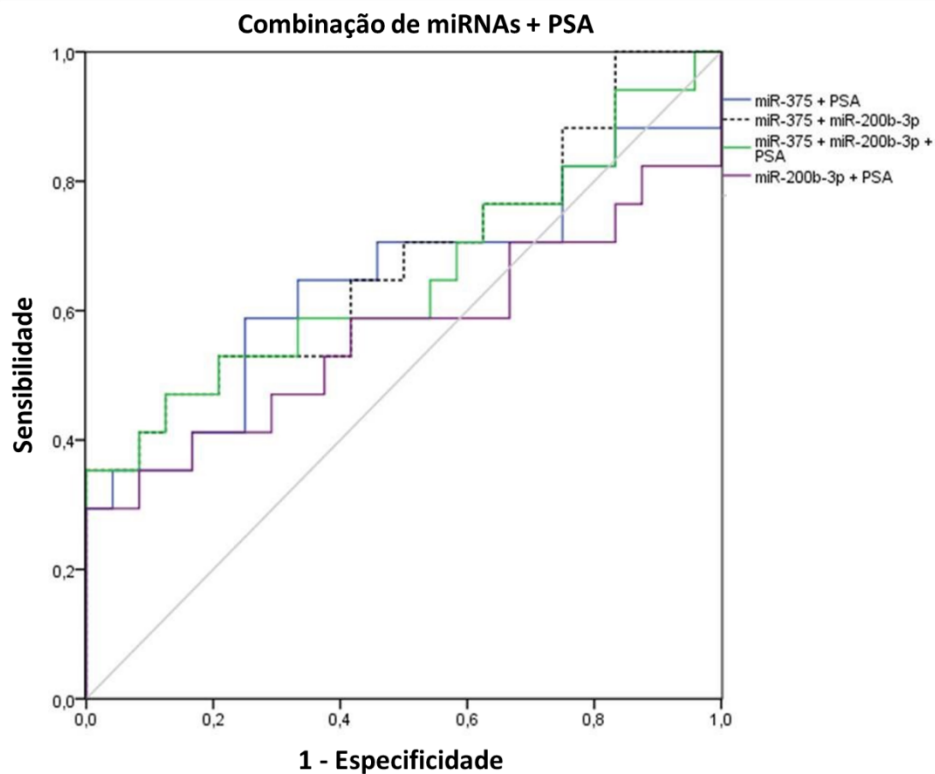
**Tabela 10 – Resultados da análise das curvas ROC de miRNAs plasmáticos testados em combinação**

miRNAs / PSA	AUC	95% CI	Valor de P	Cut-off	Sensibilidade	Especificidade
PSA	0,590	0,419-0,762	0,278	35,44	0,27	1,00
miR-375 + PSA	0,642	0,455-0,829	0,125	0,447	0,381	0,964
miR-200b-3p + PSA	0,566	0,368-0,764	0,475	0,572	0,278	1,00
miR-375 + miR-200b-3p	0,674	0,499-0,850	0,060	0,642	0,353	1,00
miR-375 + miR-200b-3p + PSA	0,654	0,472-0,837	0,095	0,583	0,353	1,00

Os valores de AUC, *cut-off*, sensibilidade e especificidade foram calculados a partir da análise das curvas ROC, conforme descrito no capítulo Abordagem Metodológica.

Fonte: elaborado pelo autor.

**Figura 11 – Curva ROC múltipla da combinação do miR-375, miR-200b-3p e PSA para diferenciar indivíduos com CaP e controles**



Fonte: elaborado pelo autor.

Adicionalmente, foi analisada a associação entre os resultados de expressão do miR-200b-3p e miR-375 plasmáticos com três diferentes faixas de PSA entre os grupos CaP e controle. As faixas de PSA pesquisadas foram: <10 ng/mL, 10 a 20

ng/mL e >20 ng/mL. Baseado no teste de Kruskal-Wallis, houve uma indicação de que o miR-200b-3p está associado significativamente com os valores de PSA informados ( $P = 0,032$ ). Estratificando o resultado, foi possível verificar uma tendência de aumento da expressão de miR-200b-3p, quando há aumento de valores de PSA, partindo da faixa de 10 a 20 para valores acima de 20 ng/mL ( $P = 0,028$ ) nos pacientes do grupo CaP, quando comparados aos controles. Não houve associação estatisticamente significativa entre o aumento de expressão do miR-375 plasmático e as diferentes faixas de PSA ( $P = 0,066$ ).

Uma análise semelhante foi realizada comparando a expressão dos miR-200b-3p e miR-375 detectados no plasma com três diferentes faixas de escores de Gleason ( $\leq 6$ , 7 e  $\geq 8$ ). Foi evidenciada uma tendência de aumento da expressão do miR-200b-3p, à medida que houve um aumento do escore de Gleason de valores <6 para valores iguais ou acima de 8 com significância estatística ( $P = 0,040$ ) nos indivíduos do grupo CaP. Já em relação ao miR-375 plasmático, não houve associação estatisticamente significativa entre o aumento de expressão deste miRNA e as três faixas de valores de escore de Gleason ( $P = 0,120$ ).

## 5 DISCUSSÃO

Em apenas alguns anos, os miRNAs tornaram-se firmemente estabelecidos como componentes moleculares-chave da célula, tanto em estados normais quanto patológicos (EBERT; SHARP, 2012). O câncer, em particular, tem sido o foco principal da pesquisa dos miRNAs na última década, e muitos estudos demonstraram a importância destas pequenas moléculas de RNA na biologia do câncer, controlando a expressão de seus mRNAs alvo para facilitar o crescimento tumoral, invasão, angiogênese e evasão imune (STAHLHUT; SLACK, 2013). Além disso, os perfis de miRNAs expressos em cada tipo de câncer trazem informações que podem definir subtipos relevantes, sobrevida do paciente, resposta ao tratamento, bem como um diagnóstico mais preciso.

Neste estudo, pesquisamos os miRNAs diferentemente expressos no CaP para uso como biomarcadores de rastreamento. Esta pesquisa identificou pela primeira vez o perfil de miRNAs de uma população do Sul do Brasil. Ademais, este foi o primeiro estudo em que foi pesquisado os miRNAs diferentemente expressos de três espécimes clínicos diferentes (tecido, plasma e urina) coletados de um mesmo indivíduo, refletindo melhor a dinâmica de expressão dos miRNAs. É importante ressaltar que os miRNAs foram detectados em fluidos biológicos (plasma e urina), de forma a permitir o rastreamento menos invasivo do CaP.

### 5.1 Dados clínico-laboratoriais da população de estudo

A população estudada foi de indivíduos que estavam com suspeita clínica de CaP. Assim como em outros cânceres, a idade é um marcador de risco importante, ganhando um significado especial no CaP, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam exponencialmente após a idade de 50 anos. Neste estudo, a idade média dos pacientes entre os dois grupos analisados (casos e controles) foi de 65 anos, o que reflete as taxas de incidência no mundo, uma vez que 85% dos casos de CaP são diagnosticados a partir desta idade (PATEL; KLEIN, 2009). Os dois grupos estudados não diferiram estatisticamente na idade, portanto a idade não foi a base da variabilidade entre os pacientes com e sem CaP.

Os urologistas costumam estratificar o risco de CaP em baixo, intermediário e alto risco de desenvolver o tumor, baseado nos valores de PSA e escore de Gleason. O risco baixo compreende níveis de PSA < 10 ng/mL e escore de Gleason  $\leq$  6, intermediário (PSA 10-20 ng/mL e escore de Gleason = 7) e risco alto (PSA > 20 ng/mL e escore de Gleason 8-10). Entretanto, devido a heterogeneidade existente dentro de cada grupo de risco, estes níveis podem ser ainda mais estratificados, considerando o número de procedimentos de biópsia realizados em cada paciente, bem como o percentual de células neoplásicas presentes em cada fragmento biopsiado (LITWIN; TAN, 2017). Apesar de não haver significância estatística nos valores de PSA obtidos entre os grupos do nosso estudo ( $P = 0,092$ ), verificou-se uma maior prevalência de pacientes com exames de PSA na faixa < 10 ng/mL, tanto nos casos como nos controles, com um percentual de 45,5 e 60,7%, respectivamente. Estes dados apontam que exames de PSA com valores abaixo de 10 ng/mL não são bons indicadores de presença do tumor, necessitando de um exame de biópsia investigativa. Já em relação ao escore de Gleason, nossos dados revelaram que no grupo CaP os tecidos biopsiados apresentaram baixos índices de malignidade (40,9% com escore de Gleason 6), o qual reflete um baixo risco de morbidade e mortalidade de nossa amostragem (MARCH; KOUFOGIANNIS; LOUIE-JOHNSUN, 2017).

Na população estudada, os fatores de risco de história familiar de CaP e tabagismo não informaram dados significativos. Entretanto, sabe-se que história familiar de pai ou irmão com CaP antes dos 60 anos de idade é um marcador de importância, podendo aumentar o risco de 3 a 10 vezes em relação à população em geral, podendo refletir tanto características herdadas quanto estilos de vida compartilhados entre os membros da família (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020). Histórico familiar é um dos fatores de risco para CaP já bastante elucidados em diversos estudos de coorte e caso-controle, nos quais confirmaram esta associação. O risco relativo para CaP aumenta de acordo com o número de membros da família afetados e o grau de parentesco, e é inversamente relacionado a idade em que os membros da família foram afetados (PATEL; KLEIN, 2009). Já em relação ao tabagismo, nenhuma relação clara e dependente da dose foi demonstrada entre tabagismo e risco de desenvolver CaP (SAWADA, 2017). No entanto, o tabagismo é uma fonte de exposição ao cádmio, que aumenta o estresse oxidativo, bem como elevação dos níveis circulantes de andrógenos, elementos que representam potenciais mecanismos de carcinogênese da próstata (VELLA *et al.*, 2017).

## 5.2 Análise geral da expressão dos miRNAs

Em nosso estudo, avaliamos o perfil de expressão de 44 miRNAs de casos e controles a partir de amostras de tecido prostático, plasma e urina. Na fase de triagem encontramos nove miRNAs desregulados, ou seja, diferencialmente expressos, entre todas as amostras testadas: miR-100-5p, miR-148a-3p, miR-18a-5p, miR-200b-3p, miR-205-5p, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-375 e miR-548am-5p. Quatro destes miRNAs foram escolhidos para a fase de validação. Entre eles, os miR-200b-3p, miR-21-5p e miR-375 foram detectados nos tecidos e mantiveram a mesma tendência de expressão observada na fase de triagem. No plasma, apenas o miR-375 continuou sendo significativamente mais expresso no grupo CaP em comparação com os controles. Sendo assim, o miR-375 apresentou maior expressão tanto nas amostras de tecido prostático quanto nas amostras plasmáticas de pacientes com CaP, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, nas amostras de urina, nenhum dos dois miRNAs testados (miR-21-5p e miR-375) na fase de triagem confirmou estar associado ao diagnóstico de CaP através dos ensaios de validação.

## 5.3 miR-375 como biomarcador de CaP

O miR-375 foi identificado pela primeira vez como um miRNA específico de ilhotas pancreáticas, o qual regula a secreção de insulina induzida por glicose em linhagem de células beta embrionárias murino MIN6 (POY *et al.*, 2004). No entanto, vários estudos de perfil de expressão de miRNAs revelaram a desregulação da expressão do miR-375 em várias neoplasias como, por exemplo, carcinoma hepatocelular (HE *et al.*, 2012), câncer gástrico (DING *et al.*, 2010), câncer de cabeça e pescoço (AVISSAR *et al.*, 2009), carcinoma de esôfago (MATHÉ *et al.*, 2009), melanoma e glioma (CHANG *et al.*, 2012). O miR-375 foi o primeiro miRNA relatado como biomarcador para CaP por Brase *et al.* no ano de 2011. Os autores identificaram 69 miRNAs que foram desregulados em amostras de soro de pacientes com CaP metastático em comparação com a pacientes apresentando tumor localizado da próstata. Três miRNAs, incluindo o miR-375, mostraram uma maior correlação com o estágio do tumor e escore de Gleason. Além disso, a expressão do miR-375 mostrou considerável associação com metástase linfonodal; no entanto, poderia não

discriminar entre pacientes com CaP de alto risco (Gleason 8) e pacientes com risco intermediário de CaP (escore de Gleason 7). O miR-375 também mostrou maior expressão nos tecidos tumorais da próstata em comparação com o epitélio normal (BRASE *et al.*, 2011). Um estudo semelhante de Bryant *et al.* no ano de 2012 relatou expressão diferencial de 16 miRNAs, incluindo o miR-375, em amostras de plasma de 16 pacientes com CaP metastático comparadas com 55 pacientes com CaP localizado. A expressão diferencial de três miRNAs, incluindo miR-375 e miR-200b, conseguiu discriminar pacientes com CaP metastático e pacientes com CaP localizado (BRYANT *et al.*, 2012). Outro estudo de 2015 destacou o potencial do miR-375 como biomarcador prognóstico de CaP em que os autores relataram associação significativa de níveis elevados de miR-375 com menor sobrevida global (taxa de mortalidade de aproximadamente 80%) (HUANG *et al.*, 2015). Mais recentemente, o estudo de Bidarra e colaboradores também constatou que os níveis de miR-375 aumentam ao longo da progressão da doença, bem como demonstrou que os níveis circulantes (plasma) de miR-375 detectam o potencial de progressão do CaP já no diagnóstico, refletindo os aspectos biológicos e clínicos do tumor e de agressividade mesmo em doenças clinicamente localizadas (BIDARRA *et al.*, 2019). Assim, a expressão do miR-375 correlaciona-se com parâmetros clínico-patológicos e também pode atuar como um biomarcador prognóstico de CaP.

Como biomarcador de prognóstico de CaP, o miR-375 vem sendo bastante associado ao longo de diversos estudos, o que favorece a sua investigação e seu uso na área diagnóstica. Baseado nisso, nosso estudo obteve excelentes resultados para utilização do miR-375 como biomarcador de diagnóstico de CaP. A análise da curva ROC demonstrou que o miR-375 é o melhor marcador de CaP entre os três miRNAs validados no tecido prostático, com um valor de AUC mais elevado (AUC = 0,815), seguido pelo miR-21-5p (AUC = 0,740) e miR-200b-3p (AUC = 0,680). Além disso, o miR-375 teve sua expressão aumentada em 5,89 vezes (*fold-change*) em amostras de tecido com CaP em comparação aos controles, semelhante aos resultados demonstrados por Souza *et al.* (DE SOUZA *et al.*, 2017). Souza e colaboradores apresentaram um estudo, utilizando análise *in silico* baseada no Atlas do Genoma do Câncer (TCGA), revelando uma diferença de expressão na ordem de 6,74 vezes do tecido tumoral versus tecido normal. De acordo com estudos de metanálises recentes envolvendo dados do *Gene Expression Omnibus* (GEO) e TCGA, o miR-375 está significativamente aumentado em tecidos com CaP agressivos, em relação aos

tecidos saudáveis da próstata e tecidos adjacentes não cancerosos, determinando seu potencial valor diagnóstico para distinguir pacientes com CaP de controles saudáveis (HE *et al.*, 2019).

Considerando os miRNAs circulantes, nosso estudo revelou que o miR-375 foi significativamente mais expresso nas amostras de plasma de pacientes com CaP em comparação aos indivíduos controle, com um bom valor de AUC (AUC = 0,677). A especificidade desse miRNA plasmático foi maior que a do exame de PSA isoladamente (0,893 vs. 0,714), mas a sensibilidade permaneceu bastante semelhante à do PSA (0,476 vs. 0,500), respectivamente. Níveis moderados a elevados de miR-375 foram demonstrados no plasma e soro de pacientes com CaP em comparação com indivíduos sem a neoplasia com valores de AUC variando de 0,650 a 0,800. Bryant *et al.* encontraram um valor de AUC de 0,800 para o miR-375 de exossomos derivados de soro, a partir de uma coorte de 77 indivíduos, na qual o grupo de pacientes com CaP metastático apresentou nível de expressão maior que o grupo não-metastático (BRYANT *et al.*, 2012). Em um estudo de coorte de duas populações independentes, Cheng *et al.* compararam 25 soros de pacientes com CaP metastático resistentes à castração com indivíduos controle, determinando 0,773 como valor de AUC para discriminar os dois grupos (CHENG *et al.*, 2013). Haldrup e colaboradores encontraram uma AUC de 0,650 na pesquisa do miR-375 em amostras de soro de 13 pacientes com HBP (controles) e 31 pacientes com CaP (HALDRUP *et al.*, 2014).

O nível moderado de AUC detectado em nosso estudo indica uma menor diferenciação entre os grupos CaP e controle, o que pode ser explicado pela seleção de diferentes controles negativos (pacientes com HBP, indivíduos saudáveis, etc.). Além disso, quantidades aumentadas de miR-375 no tecido e no sangue foram associadas ao curso agressivo da doença. O miR-375 circulante no sangue mostrou associações significativas com a progressão e metástase do CaP resistente à castração (NGUYEN *et al.*, 2013). Apesar do elevado número de estudos sobre o miR-375, os mecanismos moleculares relacionados à expressão elevada no CaP ainda não foram totalmente elucidados. Além disso, em contrapartida, já foi relatado que esse miRNA suprime o tumor em cânceres humanos, incluindo o CaP, podendo agir como um oncogene, dependendo do contexto celular (BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2016; HE *et al.*, 2019).



#### 5.4 miR-200b como biomarcador de CaP

Os membros da família miR-200, os quais incluem miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 e miR-429, exercem efeito regulador sobre os genes envolvidos na EMT, sendo considerados miRNAs supressores de tumor (PUHR *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2016). A família miR-200 inibe a invasão e as metástases de células cancerígenas, suprimindo a EMT através do direcionamento de *ZEB1* e *ZEB2* (BURK *et al.*, 2008). A análise em todo o genoma dos alvos miR-200 em células vivas confirmou que o miR-200 impede a migração e invasão celular através de um controle coordenado da dinâmica do citoesqueleto de actina (BRACKEN *et al.*, 2014).

O presente estudo demonstrou que o miR-200b-3p foi regulado positivamente no tecido prostático e nas amostras de plasma de pacientes com CaP comparado aos controles, ou seja, expresso mais nos casos do que nos controles. A análise deste miRNA resultou num bom valor de diagnóstico (AUC = 0,680) nas amostras teciduais, no qual apresentou-se aumentado 1,64 vezes (*fold-change*) no tecido tumoral em relação ao tecido sem câncer. O aumento de expressão deste alvo seria uma resposta celular ao processo tumorigênico para inibir o crescimento e a invasão de células tumorais. Isso já foi verificado em estudos com diferentes linhagens celulares de CaP, tais como VCaP e LNCaP, nas quais a família miR-200 foi altamente expressa. Estes achados levaram a indicação de que o miR-200b-3p atua como supressor de tumor em diferentes linhagens celulares de CaP (ZHANG *et al.*, 2016).

Em relação aos resultados testados no plasma, nosso estudo revelou um miR-200b-3p tendendo à significância estatística ( $P = 0,071$ ) com uma AUC de 0,664. Este resultado somado aos dados de literatura é um forte indicativo que este miRNA precisa ser melhor investigado como potencial biomarcador no CaP em nível plasmático. Na literatura científica foi demonstrado que o miR-200b-3p e o miR-375 apresentam níveis aumentados no soro de pacientes com CaP metastático em comparação com pacientes com doença localizada, o que reforça os resultados obtidos em nosso estudo (BRASE *et al.*, 2011). Entretanto, mais recentemente, um estudo revelou dados contrários ao que estava sendo inicialmente estabelecido. Um grupo de pesquisa brasileiro, no qual avaliou o valor prognóstico do miR-200b-3p no monitoramento de pacientes com CaP, observou uma regulação negativa do miR-200b-3p em plasma de pacientes com CaP (*fold change* = -3,5,  $P = 0,02$ , AUC = 0,57) em comparação aos indivíduos controles (DE SOUZA *et al.*, 2017). A apresentação

dos dados do estudo de Souza *et al* entraria em consonância ao estudo de Weischenfeldt *et al*, no qual foi demonstrado que a expressão da quantidade produzida do miR-200b-3p pode ser dependente do estágio tumoral, o que tornaria este miRNA um biomarcador com características prognósticas (WEISCHENFELDT *et al.*, 2013).

A controvérsia sobre a atividade reguladora do miR-200b-3p foi melhor evidenciada em parte do estudo de ZHENG *et al*, no qual utilizaram siRNA (RNA silenciador) específico para silenciar o gene da família de fatores de transcrição ERG, para posteriormente quantificar os níveis de miR-200b-3p por RT-qPCR e verificar sua diferença de atividade. A partir deste experimento os autores inferiram que o miR-200b-3p pode ter atividade dependente do estágio do tumor. Uma outra conclusão deste estudo é que o *ERG* poderia regular a expressão de genes codificadores de proteínas no CaP, além do miR-200b. Esses genes-alvo de codificação de proteínas poderiam aumentar o risco de recorrência e progressão do câncer e, portanto, compensar o efeito benéfico de supressor de tumor do miR-200b. Além disso, os autores verificaram que a prevalência da fusão TMPRSS2 / ERG é significativamente diferente nos indivíduos com CaP de diferentes grupos étnicos (ZHANG *et al.*, 2016). Desta forma, é possível que em diferentes grupos étnicos, o miR-200b-3p possa ter um valor prognóstico diferente.

Embora os resultados do estudo acima estejam relacionados ao valor prognóstico do miR-200b-3p no CaP, seus dados refletem que este miRNA pode regular a expressão gênica de forma positiva ou negativa, conforme necessidade celular. Entretanto, para utilização na área diagnóstica ainda necessitaria de maior investigação científica, visto que a evidência de uma regulação gênica dependente do status celular dificultaria o estabelecimento de valores de *cut-off* para o diagnóstico laboratorial de CaP.

## 5.5 miR-21 como biomarcador de CaP

Muitos miRNAs já foram identificados como elementos cruciais da regulação celular em diferentes tumores humanos. Diversos estudos verificaram que o miR-21-5p tem elevados níveis de expressão no glioblastoma (CHAN; KRICHEVSKY; KOSIK, 2005), câncer de mama (QI *et al.*, 2009) e tumores do trato gastrointestinal (DILLHOFF

*et al.*, 2008; FEBER *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2008) em comparação com tecidos normais. Nos tecidos com CaP, níveis elevados de miR-21-5p já foram detectados em alguns estudos, mostrando associações significativas com a progressão do tumor (ARISAN *et al.*, 2020; RIBAS *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2014). Li e colaboradores descobriram um aumento da expressão de miR-21-5p através da técnica de hibridização *in situ* pesquisada em 169 amostras de tecido prostático após prostatectomia radical, sendo associado à recorrência de câncer (LI *et al.*, 2012). Outros trabalhos relataram que o miR-21-5p serve para neutralizar a expressão de alvos supressores de tumores, como os genes *PTEN* e *PDCD4* (MENG *et al.*, 2007; QI *et al.*, 2009; SERALU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2017). Com base nestes achados, acredita-se que o miR-21-5p desempenhe um papel central no aparecimento de vários tipos de tumores. Em experimentos nos quais se promoveu a inibição de sua transcrição, foi relatada dificuldade no crescimento de células tumorais, indução de apoptose e redução de migração e invasão de células cancerígenas que expressavam níveis altos de miR-21-5p (HUANG *et al.*, 2020; SI *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2008). Com base nesses achados, o miR21-5p é referido como "oncomir" (isto é, um miRNA com propriedades oncogênicas) e a possibilidade de interferir negativamente em sua expressão ou em sua interação com estes alvos tem sido sugerida como uma possível abordagem terapêutica antineoplásica (FENG; TSAO, 2016).

De acordo com os dados da nossa pesquisa, foi encontrado um resultado elevado de AUC na quantificação de miR-21-5p no tecido cancerígeno (AUC = 0,740), em comparação ao grupo controle, refletindo os achados na literatura científica descritos anteriormente. O miR-21-5p teve sua expressão aumentada em 1,86 vezes (*fold-change*) nas amostras teciduais com CaP comparado ao tecido sem tumor. No entanto, nas amostras urinárias não foram encontradas quantidades significativas deste miRNA entre os dois grupos pesquisados. A diferença dos níveis de expressão do miR-21-5p no tecido prostático e na urina pode ser explicada pela regulação específica deste miRNA em compartimentos corporais separados, bem como pela secreção seletiva desse miRNA nos fluidos corporais. Além disso, há poucos estudos que envolvem a pesquisa de miRNAs urinários na área de CaP. No que tange ao miR-21-5p, o estudo de Foj e colaboradores encontraram um aumento dos níveis de miR-21-5p em sedimentos urinários de 60 pacientes com CaP comparados a 10 indivíduos controle (FILELLA; FOJ, 2016). No entanto, este estudo não realizou o processo de validação dos miRNAs detectados na fase de triagem, o que torna o dado muito frágil.

Já os estudos de Samsonov *et al.* e Ghorbanmehr *et al.*, apesar de encontrarem expressão aumentada do miR-21-5p nos indivíduos com CaP, utilizaram exossomos e urina total (sem centrifugação) nos ensaios, respectivamente, dificultando a comparação de resultados (GHORBANMEHR *et al.*, 2019; SAMSONOV *et al.*, 2016).

## **5.6 Combinação dos miRNAs para o diagnóstico laboratorial**

Estudos recentes de miRNAs circulantes no CaP revelaram um bom potencial diagnóstico quando usados como um único biomarcador ou em combinação com outros miRNAs, ou com exame de PSA (JACKSON; GRABOWSKA; RATAN, 2014; KELLY *et al.*, 2013). Desta forma, realizamos análises de correlação dos níveis de expressão para identificar combinações de miRNA que poderiam potencialmente se complementar em um teste de diagnóstico e, assim, aumentar a sensibilidade e a especificidade quando comparadas aos miRNAs individuais. Apenas os miRNAs circulantes da fase de validação foram avaliados, combinando os resultados de expressão relativa dos miR-375 e miR-200b-3p pesquisados no plasma com os valores de PSA dos indivíduos de ambos os grupos. A combinação do par de miRNAs plasmáticos não resultou em melhoria diagnóstica, quando comparado o valor de AUC do teste combinado (0,674) com os valores de AUC observados individualmente (AUC miR-375 = 0,677 e AUC miR-200b-3p = 0,664). A combinação de miRNAs com valores de PSA também resultou em valores similares de AUC, em comparação com os resultados de AUC de miRNAs individuais. Entretanto, todas as combinações testadas no presente estudo atingiram valores de AUC superiores ao valor de AUC para o exame de PSA (0,590). Sendo assim, a utilização dos miRNAs plasmáticos miR-375 e miR-200b-3p, de forma individual ou combinada, permite uma melhor diferenciação diagnóstica entre os casos e controles do que somente a utilização do PSA.

## **5.7 Relação dos miRNAs com valores de PSA e escore de Gleason**

Os resultados de expressão dos miRNAs circulatórios (miR-200b-3p e miR-375) foram avaliados com valores de PSA e escore de Gleason, de modo a verificar uma possível associação com estas características clínico-patológicas. Nosso estudo

evidenciou que o miR-200b-3p plasmático apresenta uma tendência de aumento de expressão quando há aumento de valores de PSA da faixa de 10 a 20 para valores acima de 20 ng/mL, bem como em tecidos com CaP que apresentavam escore de Gleason  $\leq 6$  e que mudaram para valores  $\geq 8$  ( $P = 0,028$  e  $P = 0,040$ , respectivamente). Desta forma, o miR-200b-3p teria um valor prognóstico importante a ser considerado, uma vez que teve uma tendência de aumento da expressão à medida que o tumor aumentou o grau de malignidade. Por outro lado, Katz *et al* encontraram resultados opostos, na qual a diminuição da expressão do miR200b-3p foi significativamente mais baixa nos pacientes com escore de Gleason  $\geq 8$ , quando comparados aos pacientes com escores  $\leq 6$  ( $P = 0,035$ ) (KATZ *et al.*, 2014). Novamente, estas informações contraditórias acerca da participação do miR-200b-3p parecem indicar que este miRNA é modulado conforme o estágio tumoral, dificultando sua caracterização no contexto de diagnóstico do CaP.

## 5.8 Aplicação dos miRNAs no diagnóstico laboratorial

Estudos recentes sugerem que os painéis de biomarcadores superam o poder de diagnóstico em relação ao uso de um biomarcador único, como o PSA. Desta forma, o desenvolvimento de painéis para o diagnóstico de CaP vem sendo amplamente pesquisado no campo da medicina personalizada. Um painel de 07 miRNAs (miR-127-3p, miR-204-5p, miR-329-3p, miR-487b-3p, miR-32-5p, miR-20a-5p e miR-454-3p) foi analisado por Daniel *et al.*, no qual encontraram valores individuais de AUC (0,753 – 0,946) para cada miRNA superiores ao valor de PSA (0,678), em um estudo contendo 28 indivíduos com CaP e 12 controles (DANIEL *et al.*, 2017). Já no estudo de Matin *et al.*, uma coorte de 372 indivíduos com CaP e 12 controles foi testada frente a um painel de 04 miRNAs (miR-4289, miR-326, miR-152-3p e miR-98-5p), na qual os autores avaliaram a combinação destes miRNAs, obtendo um valor de AUC de 0,88, superior ao obtido com o exame de PSA (AUC = 0,678) (MATIN *et al.*, 2018). Já Porzycki *et al.* demonstraram que a análise combinada de miR-141-3p, miR-21-5p e miR-375 em amostras de soro de indivíduos com CaP resultou numa AUC de 0,864, o qual pode melhorar significativamente o nível de previsão da presença de CaP (PORZYCKI *et al.*, 2018).

Atualmente, o diagnóstico definitivo de CaP é estabelecido pelo exame de biópsia, realizado preferencialmente por via transretal guiada por ultrassom. No entanto, quando este exame não tem um resultado conclusivo o médico patologista pode solicitar um exame imuno-histoquímico (IHQ) complementar. A inconclusividade pode ser devida há uma sutil diferença histológica entre processos benignos/reacionais e malignidade como, por exemplo, nos casos de atrofia prostática *versus* adenocarcinoma de próstata. O exame de IHQ utiliza anticorpos específicos para identificar os antígenos presentes nos tecidos. Estes anticorpos estão ligados a um corante específico ou enzima e quando ele se liga no antígeno resulta em uma coloração possível de ser visualizada em um microscópio óptico. Entretanto, de acordo com diversos trabalhos, o exame IHQ não oferece um marcador significativo para diagnosticar ou definir um tumor como benigno ou maligno. Trata-se de um exame que contribui mais para o prognóstico dos pacientes, identificando metástases que podem ser oriundas de tumores de próstata (BJARTELL *et al.*, 2011; MAGI-GALLUZZI, 2018). Em um recente estudo sobre o uso da IHQ no CaP, Carneiro *et al.* afirmou que nenhum dos marcadores utilizados na IHQ (*p53*, *PTEN*, *ERG*) são sensíveis e/ou específicos o suficiente para classificar um tumor de próstata, sendo um exame utilizado como complementar ao diagnóstico histológico (CARNEIRO *et al.*, 2018).

Em nosso estudo foi possível constatar o elevado poder diagnóstico do miR-375 nas amostras de tecido prostático com CaP, bem como sua correlação no plasma. Considerando o contexto de resultados inconclusivos do exame de biópsia prostática mencionado acima, o miR-375 revela-se neste estudo um importante biomarcador de CaP, podendo ser utilizado como auxiliar no diagnóstico desta neoplasia. Pacientes com valores de PSA elevados que são frequentemente submetidos à biópsia prostática com resultados negativos ou inconclusivos, teriam o miR-375 para melhor definir o diagnóstico e a real necessidade de nova biópsia. Isso poderia ser aplicado aos pacientes que sistematicamente possuem valores de PSA acima de 4,0 ng/mL. Para os pacientes com este histórico de PSA, no mesmo dia do exame de biópsia, seria coletado sangue para pesquisa do miR-375 plasmático para avaliar a expressão deste biomarcador. Já em relação à pesquisa do miR-375 tecidual, o histopatologista ao analisar os fragmentos biopsiados do paciente, caso tivesse dúvidas em relação a presença de neoplasia, selecionaria o fragmento suspeito para ser avaliada a expressão do miRNA. Desta forma os miRNAs poderiam ser adicionados no

fluxograma de análise laboratorial, nos casos em que a biopsia não é conclusiva, tornando-se um biomarcador auxiliar no diagnóstico de CaP. Os demais miRNAs teciduais encontrados neste estudo não apresentaram um *fold change* expressivo, o qual pudesse contribuir para o diagnóstico clínico-laboratorial, apesar de sua significância estatística calculada.

Apesar dos resultados promissores do nosso estudo, o uso diagnóstico de biomarcadores de miRNA levanta alguns problemas técnicos. Os níveis de expressão da maioria dos miRNAs são mais baixos e mais variáveis em comparação aos mRNAs. Portanto, são necessários métodos quantitativos sensíveis para a detecção confiável de alterações específicas da expressão do miRNA no câncer. Em nosso estudo, a seleção de miRNAs para análise foi realizada com placas microfluídicas baseadas em um ensaio com sondas nucleotídicas do tipo *TaqMan*, a partir de cDNA pré-amplificado, permitindo a detecção precisa de pequenos desvios nos níveis de expressão de miRNAs entre os grupos de casos e controles. No entanto, controles endógenos padronizados e confiáveis são indispensáveis para esse método relativo de quantificação. Em nosso estudo, foi selecionado o miR-24-3p expresso de forma mais estável no tecido prostático e no plasma. Já na urina foi necessário utilizar o miRNA sintético cel-miR-39, uma vez que não foi encontrado um miRNA endógeno estável urinário. Além disso, o mesmo cel-miR-39 foi usado como *spike-in* para eliminar a variação na eficiência de isolamento do miRNA dos três tipos de amostras durante o processo de extração. Outra questão dos estudos de biomarcadores baseados em miRNA é a variação das quantidades de miRNA em vários tecidos e biofluidos de uma mesma pessoa. Neste caso, a análise dos miRNAs do nosso estudo foi baseada na coleta de espécimes clínicos de uma mesma pessoa, oportunizando um melhor entendimento da dinâmica de expressão destes marcadores num mesmo indivíduo. A variação é explicada por condições fisiológicas e patológicas, regulação específica do miRNA em compartimentos corporais separados e formas pouco exploradas de secreção de miRNA nos fluidos corporais (LIU *et al.*, 2012; SRIVASTAVA *et al.*, 2013).

Apesar do potencial uso dos miRNAs como biomarcadores de CaP a partir da urina, bem como pela utilização de um material clínico não invasivo, não foram encontrados em nosso estudo um miRNA urinário comprovadamente indicativo da presença do tumor. Para concluirmos este achado, utilizamos todo o rigor técnico-científico na execução do protocolo de determinação e quantificação dos miRNAs.

Além disso, devido a não existência de um material urinário padronizado, optamos pelo *pellet* urinário, com o intuito de obter uma urina mais rica em células prostáticas, uma vez que a coleta de urina foi sempre realizada após o DRE do paciente. Mesmo assim, nossos resultados experimentais não validaram com significância estatística o uso dos miRNAs urinários como marcadores de CaP. Entretanto, ao longo do nosso estudo, verificamos que há uma série de desafios de pesquisa não resolvidos relacionados à investigação de miRNAs em fluídos biológicos, incluindo a urina. Com base num recente estudo de revisão científica do nosso grupo de pesquisa, diferentes publicações científicas apresentam um alto nível de heterogeneidade e inconsistência entre os seus dados, no que se refere, por exemplo, ao tipo de amostra utilizada (urina total, sedimento, sobrenadante e EVs), bem como o tipo de plataforma de detecção de miRNA. A mesma falta de consistência também foi observada para o tamanho amostral, uso ou não de DRE para coleta de urina e desenho do estudo (PAIVA *et al.*, 2020). Neste sentido, nossos resultados questionam o uso da urina, bem como destacam a importância de uma interpretação crítica de publicações científicas em relação à pesquisa de miRNAs urinários.

Embora tenha se tentado evitar vieses em nosso estudo, algumas limitações devem ser consideradas durante a interpretação dos resultados. Todos os pacientes incluídos neste estudo de caso-controle foram provenientes de uma mesma instituição hospitalar, o que dificulta a extrapolação dos resultados encontrados para população do nosso Estado. Além disso, o tamanho amostral foi relativamente pequeno, tanto no grupo controle quanto no grupo dos casos. Logo, a inclusão de um “n” amostral maior, com indivíduos provenientes de múltiplos centros/instituições de referência em diagnóstico de CaP ao longo do Estado do RS, tornariam o desfecho mais assertivo para aplicabilidade diagnóstica. Em relação a coleta do tecido prostático, o procedimento de biópsia foi realizado por uma equipe de quatro médicos, o que pode ter contribuído para o aumento de resultados falso-negativos, uma vez que há um certo grau de subestimação na escolha da região a ser biopsiada. Ademais, o ideal seria utilizar para pesquisa de miRNAs o mesmo fragmento de tecido de próstata enviado para o exame histopatológico. No entanto, o processo de parafinação e coloração do tecido poderia promover a degradação dos miRNAs, fazendo com que fosse decidido usar no estudo um fragmento extra coletado na mesma região suspeita da neoplasia. Sobre a coleta de sangue, o ideal seria a coleta no mesmo dia da realização da biópsia prostática e coleta de urina, a fim de se ter a quantificação dos



miRNAs num mesmo momento. Isso não foi realizado para evitar o deslocamento do paciente para outro prédio, onde a coleta de sangue é realizada, de forma a proteger o paciente de mais um procedimento logo após o exame invasivo de biópsia.

## 6 CONCLUSÃO

Os miRNAs desempenham um papel central no desenvolvimento do CaP. Como as funções dos miRNAs no CaP estão sendo decifradas ao longo das últimas décadas, o seu potencial como marcadores de diagnóstico ou prognóstico vem recebendo cada vez mais atenção. A carcinogênese é uma integração complexa de várias alterações nas vias de sinalização celular, sendo de vital importância entender a expressão do miRNA como biomarcadores específicos de tumores. Esse é um processo complexo que inclui a participação dinâmica de vários miRNAs nas etapas sucessivas do CaP. Vários estudos mostraram a utilidade dos miRNAs no manejo clínico do CaP; no entanto, os resultados frequentemente diferem quanto à precisão e a relação com a agressividade do tumor. Além disso, os resultados oferecem uma grande variação nos miRNAs incluídos no perfil selecionado. Resultados contraditórios podem estar associados a importantes questões metodológicas relacionadas à sua quantificação e normalização. De fato, mesmo que os miRNAs apareçam como moléculas inerentemente estáveis, a otimização e a padronização de métodos são necessárias para obter resultados reprodutíveis e de alta qualidade.

Em nosso estudo, vários miRNAs específicos para câncer de próstata foram detectados com sucesso no tecido e plasma de pacientes com CaP e mostraram abundância diferente quando comparados com as amostras biológicas de pacientes sem a neoplasia. Isso revela a adequação destes miRNAs para a detecção não invasiva e específica de CaP, mesmo nos estágios iniciais da doença. O miR-375 aparece como o biomarcador de diagnóstico mais promissor a ser pesquisado no tecido e plasma sanguíneo, podendo ser utilizado como marcador de diagnóstico complementar de CaP. Nossos resultados corroboram achados anteriores sobre a possibilidade de detectar miRNA em amostras teciduais e plasmáticas para o diagnóstico de CaP. No entanto, antes que os miRNAs se tornem uma ferramenta para diagnósticos de rotina, são necessárias pesquisas adicionais: (I) compreensão completamente da expressão do miRNA no corpo humano, (II) elucidação das variáveis pré-analíticas que afetam a detecção dos miRNAs, (III) padronização dos métodos existentes ou desenvolvimento de novos métodos de detecção de miRNAs e (IV) comparação do desempenho de diferentes plataformas de detecção de miRNAs.

A possibilidade de se utilizar o miR-375 como biomarcador sanguíneo auxiliar no diagnóstico de CaP, vem de encontro ao recente conceito de biópsia líquida, ou seja, realização de diagnóstico tumoral não-invasivo. Este tipo de diagnóstico pode ser capaz de substituir, ou pelo menos diminuir, o uso da biópsia tradicional invasiva que tem sucesso limitado e complicações associadas. As biópsias líquidas, devido à sua natureza minimamente invasiva, estão associadas a uma morbidade significativamente menor e podem ser agendadas com maior frequência, possibilitando um monitoramento mais eficaz do paciente suspeito. Isso também pode ser particularmente valioso durante o tratamento, fornecendo medidas temporais da carga tumoral e evidência precoce de recorrência ou resistência ao tratamento. Além disso, a biópsia líquida pode refletir melhor o perfil genético de todos os subclones tumorais presentes em um paciente, diferentemente das biópsias de tecido obtidas de apenas uma região tumoral.

Em resumo, a expressão e atividade desregulada dos miRNAs são comumente observadas nos estudos clínicos com CaP, sendo que estudos de caráter funcional também relacionam os miRNAs nos processos de iniciação e progressão desta neoplasia. Embora alguns miRNAs tenham sido implicados no diagnóstico, desenvolvimento e progressão do CaP, bem como vários mecanismos de regulação dos miRNAs tenham sido relativamente estabelecidos na biologia do CaP, este campo de estudo está apenas começando a entender e apreciar o papel dos miRNAs. À medida que a área de pesquisa em CaP continua evoluindo, assim como o estudo da expressão e função dos miRNAs, novas áreas para descoberta certamente serão reveladas. Algumas das áreas mais notáveis de necessidade não atendida no CaP, incluem a necessidade de biomarcadores de diagnóstico de CaP clinicamente relevantes que possam reduzir a frequência de biópsia de homens com valores de PSA elevados. A atual década de pesquisa é uma grande promessa para a descoberta e tradução contínuas. O valor dos esforços e resultados obtidos neste e nos diversos estudos, será melhor percebido com métodos de pesquisa sistemáticos e consistentes, bem como a sua validação em várias coortes e plataformas de pesquisa.

## 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<sup>a</sup>. 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.





# Urinary microRNAs expression in prostate cancer diagnosis: a systematic review

R. M. Paiva<sup>1</sup> · D. A. G. Zauli<sup>2</sup> · B. S. Neto<sup>3</sup> · I. S. Brum<sup>1</sup> 

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

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> Research and Development Division, Hermes Pardini Group, Vespasiano, MG, Brazil

<sup>3</sup> 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.

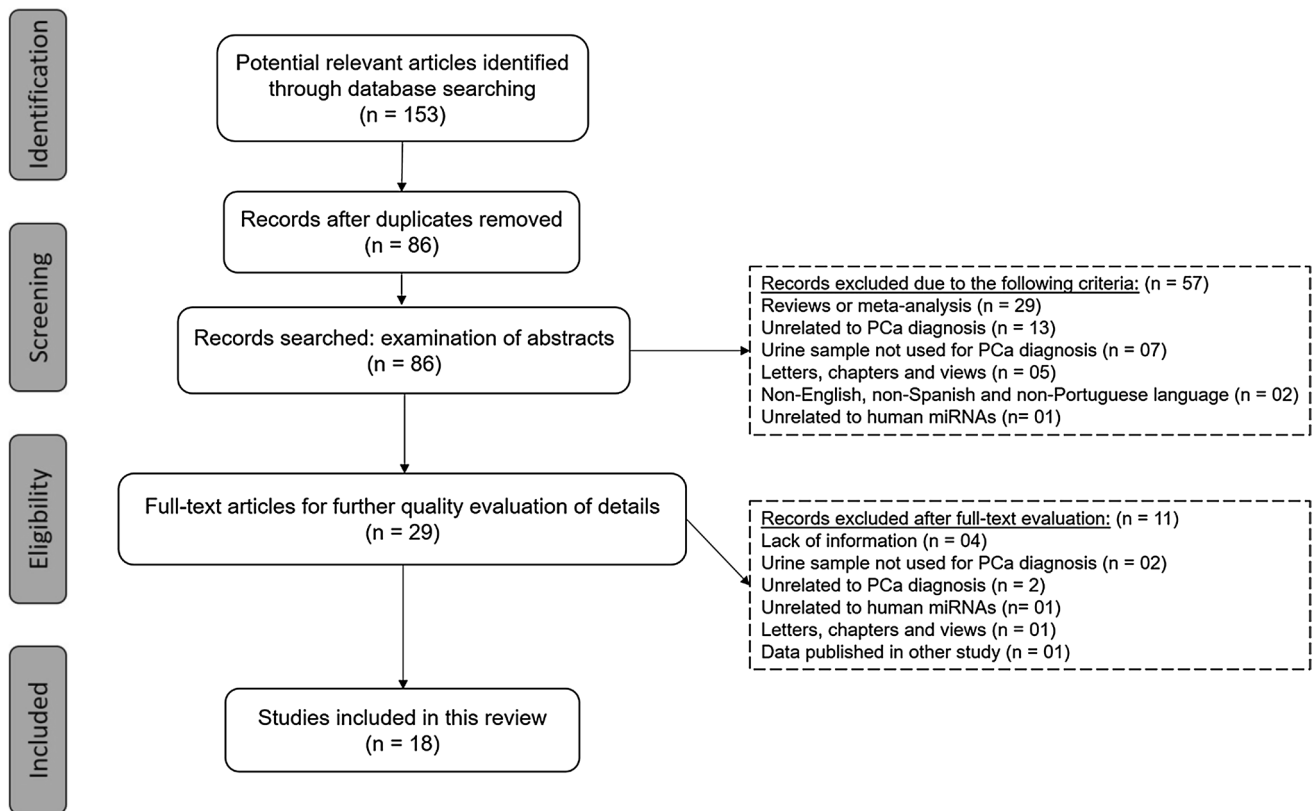
## Results

### 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, Stupolyte 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	Fredsøe et al. 2017 [18]	Denmark	Cohort	Urinary exosomes, -mL <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup>	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 <sup>c</sup> 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 (BioSillica)	RT-qPCR of 12 candidate miRs
9	Xu et al. 2017 [38]	China	Cohort	Urinary exosomes, -mL <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup>	No	RNA isolation kit (BioSillica)	RT-qPCR of five candidates miRs
12	Ghorbanmehr et al. 2019 [46]	Iran	Case-control	Whole urine, -mL <sup>a</sup>	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 <sup>a</sup> of 364 miRs (v.2.1 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 <sup>a</sup>	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 <sup>b</sup>	No	mirVana miRNA isolation kit	Screening: TLDA <sup>a</sup> 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	Gueffi 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

<sup>a</sup>-mL, urine volume not mentioned

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

No.	Study (author, year)	Samples (n)/screening and validation	miRNAs profiling at screening step or method 1		miRNAs profiling after validation step or method 2	
			Downregulated	Overexpressed	Downregulated	Overexpressed
1	Rodriguez 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-1-5-p, and miR-143-3p	–	miR-196a-5p, miR-501-3p	–
2	Fredsøe 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	–	–
4	Wani et al. 2017 [59]	Screening in cell lines: PC-3 Validation in urine: 90 PCa vs 10 BPH vs 50 CT	–	miR-2909	–	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, miR-574-3p, miR-375, miR-200b, and miR-141	–	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)	Samples (n)/screening and validation	miRNAs profiling at screening step or method 1		miRNAs profiling after validation step or method 2	
			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-Guadarrana 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	Strivastava 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 (noncancer, healthy individuals), PC-3 human prostate cancer cell line, DU-145 prostate cancer-insensitive cell line, HeLa cervix carcinoma cell line, LNCaP androgen-responsive prostate cancer cell line, MI 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 miRs 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 miRs 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 miRs, 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-miRs 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 miRs 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 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 <sup>a</sup>
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	↑

<sup>a</sup>Change 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. Stuopelyte K, Daniunaite K, Bakavicius A, Lazutka JR, Jankевичius 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, Masiá 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, Chijioke 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, Holdenrieder 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-Cañzoz 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, Schüller 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.

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

Rodrigo Minuto Paiva<sup>1</sup>, Danielle Alves Gomes Zauli<sup>2</sup>, Brasil Silva Neto<sup>3</sup>, Ilma Simoni Brum<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Endocrine and Tumoral Biology, Department of Physiology, Institute of Basic Sciences of Health, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Research and Development Division, Hermes Pardini Group, Vespasiano, MG, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Urology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

### **Abstract**

Prostate cancer (PCa) incidence has been rising in Brazilian population. Current methods for PCa detection as prostate-specific antigen screening have diagnostic value limited. 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. Expression of 44 miRNAs was screened in three different clinical specimens of 40 patients (20 PCa patients and 20 controls) using TaqMan Custom Array MicroRNA cards (Thermo Fisher Scientific). Then, four of the dysregulated miRNAs were selected for validation in 22 PCa patients and 28 subject controls, using RT-qPCR. Nine miRNAs were differentially expressed in the screening phase between cases and controls among plasma, urine and tissue samples. 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. Our results suggest that miR-375 should be considered as potential plasmatic biomarkers for the diagnosis of PCa. However, large-scale prospective studies are still needed to validate our findings as surrogate markers in diagnosis of prostate cancer.

**Keywords:** MicroRNAs; Prostate cancer; Diagnosis; Circulating miRNAs; Biomarkers.

**Short title:** miR-375 as prostate cancer biomarker.

**Word count of the article:** 5041

**Corresponding Author:**

Ilma Simoni Brum (ORCID: 0000-0002-7428-825X)

Department of Physiology, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500

90050-170 - Porto Alegre, RS, Brazil

Phone.: + 55 51 3308 3559

e-mail: ilma@ufrgs.br

**Introduction**



Prostate cancer (PCa) is the second most common oncological disease and the fifth leading cause of cancer-related death among men worldwide (Bray *et al.* 2018). PCa-related mortality rates are rising in several developing countries of Central and South America, partially justified by increasing in life expectancy and access to the health system. In Brazil, the National Cancer Institute registered a growth of approximately 40% in estimated PCa cases from 2008 to 2018 (Bray *et al.* 2018; Santos 2018).

Routinely, measuring serum prostate-specific antigen (PSA), digital rectal examination (DRE) and prostate biopsy are used in clinical practice for PCa diagnosis. Circulating PSA is the most common non-invasive biomarker for PCa screening, despite its diagnostic value is limited by low sensitivity and specificity (Heidenreich *et al.* 2011). A rise in the PSA level can reflect the presence of cancerous cells, but can also be related to benign conditions such as prostatitis, urinary tract infection or benign prostatic hyperplasia (BPH). In addition, several patients develop this type of cancer in spite of low PSA levels (4–10 ng/mL), which difficult distinguish the early stages of PCa from nonmalignant disorders (Romero-Otero *et al.* 2016). As a result, the development of new accurate biomarkers, minimally invasive, for the early detection of PCa is urgently needed.

MicroRNAs (miRNAs) are small (18 to 24 nucleotides), highly conserved, non-coding RNAs that broadly regulate gene expression post-transcriptionally. Target mRNA undergoes transcriptional repression or cleavage according to base pairing of its 3' untranslated region (UTR) and the seed region (2–8 nucleotides) of mRNA (Bartel 2004; Victor Ambros 2004; Esquela-kerscher & Slack 2006). Regulatory capabilities of miRNAs are involved in almost all physiological processes, including cell proliferation, differentiation, metabolism, and apoptosis. Otherwise, dysregulated miRNA

expression is involved in the alteration of several molecular processes in tissues, promoting development of diseases, including cancer (Esquela-kerscher & Slack 2006; Wang *et al.* 2015). Studies of miRNAs isolation and characterization have pointed different expression profiles of miRNAs obtained from cancerous and benign tissues (Cho 2007; Porkka *et al.* 2007; Ambbs *et al.* 2008). MiRNAs are also detectable in cell-free form circulating in many biological fluids such as blood, urine, saliva, tears and cerebrospinal fluid, usually reflecting tissue-specific injuries, suggesting that they can be used as non-invasive biomarkers (Cortez *et al.* 2011). Growing evidences suggests that circulating miRNAs in PCa are associated to diagnosis and prognosis disease (Blondal *et al.* 2013; Bertoli *et al.* 2016; Fredsøe *et al.* 2018). The vast majority of PCa-specific miRNAs were studied in blood, where miRNAs are excreted from different tissues. On the other hand, few studies have investigated miRNA expression profiling in urine samples from PCa patients, and no study that we know of so far was carried out to miRNA detection in plasma, urine and prostate tissue sampled from the same individual.

Considering that miRNAs might be useful as biomarkers in PCa diagnosis, the objective of this study was to investigate a circulating miRNA profile in the plasma and urine compared with prostate tissue samples between PCa patients and control subjects in a Brazilian population.

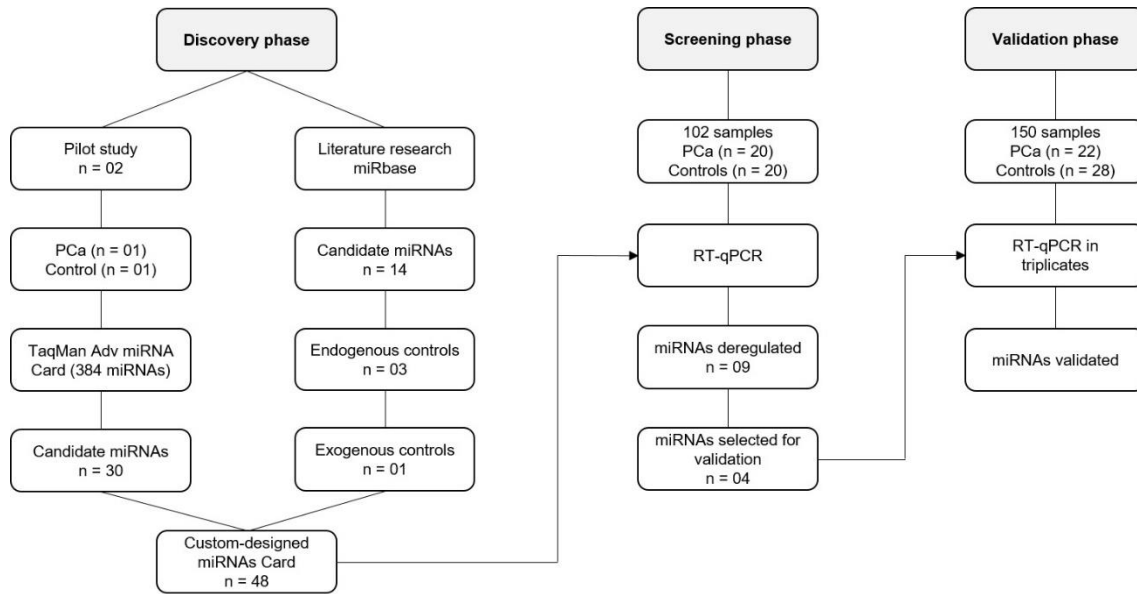
## **Materials and methods**

### **Patient Samples**

For the purposes of this study, blood, urine and prostatic tissue samples from 50 individuals were collected at the Urology Department of Hospital de Clínicas de

Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) between November 2016 to June 2018. All clinical specimens were obtained prospectively from patients who had been attended in the institution for prostatic biopsy, after obtaining informed consent from all study participants. The urine collection was preceded by DRE and followed by prostate biopsy. All peripheral whole blood samples of PCa patients and controls were collected until two weeks after biopsy procedure. Based on histopathologic results, all samples were categorized in two groups: PCa patients and controls. The PCa group included 22 patients with PCa diagnosis (Gleason score  $\geq 6$ ) and the control group 28 patients, whose biopsy samples contained only normal prostate cells and benign glands.

This case-control study was performed with three sample sets, divided in “discovery”, “screening” and “validation” phases. In the “discovery phase” were used a sample of PCa prostate tissue with Gleason score 7 and 100% of tumor cells, and a non-cancerous (0%) prostate tissue, sampled by expert histopathologist. The “screening phase” comprised a total of 102 specimens (28 prostatic tissues, 34 plasmas and 40 urinary samples) from 20 PCa patients and 20 controls. The “validation phase” included the 102 previously specimens and 48 samples from other 10 subjects, totalizing 150 specimens from 22 PCa patients and 28 controls (Fig. 1). A standard questionnaire was used to collect information on current age, cancer history, PCa family history, and smoking. Patients with previous diagnosis of any type of cancer were excluded. The present study received appropriate ethics committee approval from Institutional Review Boards of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (approval no. 20160539) in accordance with the Declaration of Helsinki.



**Figure 1.** Flow chart of study design.

## Sample preparation and RNA extraction

*Plasma samples* – blood samples were collected in EDTA tubes and processed immediately after collection. Non-hemolyzed samples were centrifuged at 1300g for 20 min at 10°C, followed by an ultra-centrifugation at 15500g for 10 min at 10°C, and plasma aliquots were stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was isolated from 450 µL of plasma using the mirVana Paris RNA and Native Protein Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), according to the manufacturer’s protocol. Each sample was eluted in 100 µL of specific Elution Buffer.

*Urine samples* – urine sediment was obtained after centrifugation at 2000 rpm for 10 min at 4°C of approximately 30 mL of total urine collected from patients post-DRE. The supernatant was removed and 1 mL of lower fraction was homogenized and freezing at -80°C until use. MagMAX mirVana Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) was used for RNA isolation from urine according to manufacturer’s instructions. Total RNA

was extracted from 200  $\mu$ L of urine sediments and each sample was eluted in 50  $\mu$ L of specific Elution Buffer.

*Prostate tissue samples* – patients were scheduled for a 12-core transrectal ultrasound-guided prostate biopsy (two cores per region, considering prostate gland divided in six regions). Six extra biopsy tissues were sampled by urologist during prostate biopsy exam (one extra core per region) from all patients for using in this research. The six extra biopsy tissues were stabilized in RNA later and stored individually at  $-80^{\circ}\text{C}$  until its use. Expert pathologists assessed the cores to determine whether the biopsy samples were malignant, classifying with Gleason score only specimens pathologically diagnosed as PCa (Epstein *et al.* 2005). In case PCa patient have more than one cancerous core from biopsy, the core with highest percent of tumor cells was chosen for expression analysis, based on histopathology results reported. Total RNA was extracted from approximately 20-30 mg of unfrozen tissue mechanically homogenized with 450  $\mu$ L of Cell Disruption Buffer, using the mirVana Paris RNA and Native Protein Purification Kit. RNA was eluted with 100  $\mu$ L of specific Elution Buffer, according to the manufacturer's instructions.

During the RNA extraction step, all described clinical specimens (plasma, urine and prostate tissue) were spiked-in with a synthetic *Caenorhabditis elegans* miR-39 (cel-miR-39), obtaining a final concentration of 0,1 pM of cel-miR-39 per sample, for use as candidate a normalizer in downstream analyses and to increase the accuracy of miRNA assessment. RNA concentration and quality derived from all samples was evaluated using the NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). RNA of proven quality was immediately used for cDNA synthesis or stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use.

### **Discovery phase and miRNA card customization**

Initially, a pilot study was conducted for selection of PCa-related miRNAs with diagnostic potential, using the TaqMan Advanced MicroRNA platform (Applied Biosystems, USA). Relative expression of 384 miRNAs were evaluated in cancerous and non-cancerous prostate tissues on TaqMan Advanced miRNA Human A Card (Cat. no. A34714, Applied Biosystems, USA) to screen the differential expression of miRNAs in prostate tissues. Based on these results, information from available literature and miRbase v21.0 database, a panel of 48 miRNAs was customized for miRNA expression profiling.

### **Quantification of miRNA expressions using TaqMan Custom Array MicroRNA Cards**

Expression levels of selected 48 miRNAs were evaluated in plasma, urine and prostate tissue from all subjects of the “screening phase” using TaqMan Custom Array MicroRNA cards (Thermo Fisher Scientific, USA), which include primers and probes for 44 target miRNAs, three candidates as endogenous controls (miR-16-5p, miR-24-3p and miR-191-5p) and cel-miR-39 as exogenous control (Supplementary Table 1).

For the screening study 2  $\mu$ L of RNA template (10 ng of total RNA) were reversibly-transcribed in cDNA and pre-amplified using TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, USA), according manufacturer’s protocol. The transcription reaction was made up with 3’ poly-A tailing and 5’ ligation of an adaptor sequence to extend the mature miRNAs, in order to these sequences could be recognized by universal reverse transcription (RT) primers. Five microliters of cDNA produced was pre-amplified with miR-Amp Master Mix and universal miR-Amp primers (Thermo Fisher Scientific, USA) that recognize miRNAs on 5’ and 3’ ends, and

then diluted ten times with 0.1X TE buffer (pH 8.0) before amplification. In all, 25  $\mu$ L of diluted pre-amplified cDNA were further amplified in 100  $\mu$ L qPCR reaction volume using TaqMan Fast Advanced Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, USA) and were pipetted into the 48 micro-wells of the array card by centrifugation, according manufacturer's protocol. Eight samples were evaluated in each 384 micro-well card. RT real time PCR (RT-qPCR) reactions was carried out on ViiA™7 Fast Real Time PCR System Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA), using the TaqMan Low Density Array (TLDA) block. The thermal cycling conditions were 92°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 1 s and 60°C for 20 s.

#### **Validation of “screening phase” results by individual RT-qPCR**

Four miRNAs were selected for target RT-qPCR in order to confirm their expressions levels. Individual RT-qPCR assays were run in triplicates, following MIAME and MIQE guidelines (Brazma *et al.* 2001; Bustin *et al.* 2009). The criteria for choosing these miRNAs were: (1) miRNAs most differentially expressed between PCa group and controls; (2) those miRNAs found in more the one type of specimen of the “screening phase” and (3) miRNAs undescribed in reference literature.

Individual RT-qPCR was performed in three steps: first, the total RNA was reverse-transcribed into cDNA; second, the cDNA was pre-amplified, and third, a diluted cDNA was amplified by RT-qPCR. The first two steps used the same protocols ran in the “screening sample set”. Selected miRNAs for targeted PCR reactions were run in triplicates using 0.5  $\mu$ L TaqMan miRNA Assays 20X (Thermo Fischer Scientific, USA; Supplementary Table 2), 5  $\mu$ L TaqMan Fast Advanced Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, USA), 2.5  $\mu$ L of diluted cDNA (1:10), and 2  $\mu$ L of RNase-free water, in a total of 10  $\mu$ L. Each sample was assayed with a reference gene previously selected

in the “screening phase”, and a negative control was included in each experiment. qPCR was performed on ViiA™7 Fast Real Time PCR System Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) using the following amplification conditions: 95°C for 20 s, followed by 40 cycles of 95°C for 1 s and 60°C for 20 s. Relative quantification of the four target miRNAs was evaluated using the comparative cycle threshold method.

### **RT-qPCR data evaluation, normalization and statistical analysis**

For RT-qPCR data analysis, quantification cycle (C<sub>q</sub>) values were determined by using ViiA™7 Software v1.2.1 with automatic baseline (C<sub>q</sub> 3-15) and threshold selection parameters. Relative expressions from “screening” and “validation sample sets” were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  method (Schmittgen & Livak 2008) and expression was considered detected when C<sub>q</sub> values were ≤35. All data are shown as n-fold changes in relation to a calibrator sample.

For data normalization, miRNAs (miR-16-5p, miR-24-3p, miR-191-5p or cel-miR-39) with the lowest variation among the samples, as identified by Applied Biosystem™ Analysis Software (Thermo Scientific, USA) in TLDA cards, were chosen as endogenous controls. MiRNA expression levels from plasma and prostate tissue samples were normalized with miR-24-3p, and cel-miR-39 exogenous control was used for urine samples as reference gene.

All statistical analyses were performed using the SPSS statistical package (v.18.0) for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). Categorical data are shown as percentage. Data normal distribution was checked using the Shapiro-Wilk test. Variables with skewed distribution were log<sub>2</sub>-transformed before analyses and are presented as median (25-75th percentiles). Differences in miRNA levels between sample groups were assessed using the Student’s t-test or Mann-Whitney U test, as



appropriate. To investigate the discriminatory power of the dysregulated miRNAs to distinguish between PCa and control individuals, receiver-operating characteristic (ROC) curves were generated and the areas under the curves (AUCs) were calculated. To combine biomarkers, logistic regression analysis was applied. Statistically significant differences were set at  $P < 0.05$ .

## Results

Clinical and laboratory characteristics of the patients enrolled in the study were listed in Table 1. There were no differences between cases and controls of both samples regarding age, PSA, PCa family history, and smoking ( $P > 0.05$ ).

**Table 1:** Clinical and laboratory characteristics of all subjects included in the study considering the discovery, screening and validation phases.

	PCa Group	Control Group	<i>P</i> -value
Patients (n)	22	28	
Mean age $\pm$ SD, years	65.05 $\pm$ 7.6	65.0 $\pm$ 6.2	0.981
PSA, n (%)			
<10 ng/mL	10 (45.5)	17 (60.7)	0.092
10-20 ng/mL	4 (18.2)	8 (28.6)	
>20 ng/mL	8 (36.4)	3 (10.7)	
Gleason score, n(%)			
$\leq 6$	9 (40.9)	-	-
7	6 (27.3)	-	
$\geq 8$	7 (31.8)	-	
PCa Family history, n (%)			
Yes	5 (22.7)	6 (21.4)	1.000
No	17 (77.3)	22 (78.6)	
Smoking, n (%)			
Yes	8 (36.4)	12 (42.9)	0.773
No	14 (63.6)	16 (57.1)	

## Discovery of differentially expressed miRNAs

We analyzed 384 human miRNAs in two prostate tissue samples from PCa patient and control individual, based on histopathology results, using a TaqMan Advanced miRNA Human A Card. Due the low number of samples in this phase, global data normalization was performed to evaluate relative expression results. A total of 304 miRNAs showed a large range difference in the expression of miRNAs ( $\Delta Cq$  1 to 13) between cancer and non-cancer tissue. In order to select the targets most differentially expressed, it was established  $\Delta Cq \geq 5$  as a threshold between PCa and non-PCa tissue results. According to these criteria, 30 miRNAs were selected in this primary assay. Additionally, based on available literature and by searching in the miRbase v21.0 database, 14 miRNAs potentially associated with PCa were also selected for the next phase, including 04 reference controls, totalizing 48 miRNAs (Supplementary Table 1).

### **Expression profile of 44 miRNAs in subjects from the “screening phase”**

Expressions of 44 miRNAs were evaluated in prostate tissue, plasma and urine of PCa patients and non-PCa subjects from 28, 34 and 40 samples of each specimen, respectively. Two urinary samples were excluded from this analysis, since they had not showed expression of cel-miR-39 as exogenous control, totalizing 38 samples. Of these 44 miRNAs, 36 (81.8%) had detectable expression in prostate tissue in more than 30% of the samples. Six of these 36 miRNAs (miR-148a-3p, miR-18a-5p, miR-200b-3p, miR-205-5p, miR-21-5p and miR-375) were differentially expressed between cases and controls (Table 2). For plasma and urine samples, 21 (47.7%) and 19 (43.2%) miRNAs had detectable expression, but only 5 (miR-100-5p, miR-200b-3p, miR-214-3p, miR-375 and miR-548am-5p) and 2 miRNAs (miR-21-5p and miR-375) were significantly expressed, respectively (Table 3 and 4). Of note, all miRNAs

differentially expressed in these three specimens were upregulated in PCa group compared with controls, except to miR-205-5p that was downregulated in the prostate tissue samples of the PCa group. Interestingly, miR-375 was upregulated in PCa patients in prostate tissue, plasma and urine, becoming a potential biomarker to be evaluated.

**Table 2.** MiRNA expressions in prostate tissue of “screening phase” obtained using TaqMan Custom Array MicroRNA cards.

<i>miRNA</i>	<i>Control Group (n = 14)</i>	<i>PCa Group (n = 14)</i>	<b><i>P-value*</i></b>
let-7c-5p	2.75 (2.01–7.98)	1.83 (0.68–6.00)	0.174
hsa-miR-100-5p	1.75 (1.25–2.96)	1.51 (0.71–16.75)	0.613
hsa-miR-107	0.15 (0.02–0.59)	0.06 (0.03–0.49)	0.753
hsa-miR-124-3p	0.20 (0.08–1.00)	0.21 (0.04–0.94)	0.908
hsa-miR-129-5p	0.24 (0.03–0.30)	0.15 (0.09–0.40)	0.643
hsa-miR-139-3p	0.35 (0.01–2.36)	ND	-
hsa-miR-141-3p	0.34 (0.12–0.69)	0.54 (0.35–1.69)	0.351
hsa-miR-148a-3p	0.60 (0.21–0.76)	1.18 (0.84–2.65)	<b>0.020</b>
hsa-miR-184	0.53 (0.28–7.16)	0.53 (0.07–6.40)	0.825
hsa-miR-187-3p	0.23 (0.13–0.72)	0.14 (0.03–0.45)	0.141
hsa-miR-18a-5p	1.76 (0.07–5.30)	8.56 (1.74–56.75)	<b>0.024</b>
hsa-miR-18b-5p	0.40 (0.13–0.80)	1.89 (0.45–22.56)	0.086
hsa-miR-190a-5p	0.18 (0.09–7.86)	0.20 (0.10–31.46)	0.783
hsa-miR-19a-3p	1.32 (0.36–9.37)	4.64 (1.25–54.79)	0.130
hsa-miR-19b-3p	0.24 (0.13–1.16)	0.60 (0.26–1.20)	0.408
hsa-miR-200b-3p	1.50 (0.67–2.54)	3.84 (1.76–6.25)	<b>0.031</b>
hsa-miR-204-5p	0.88 (0.55–1.16)	0.98 (0.37–2.41)	0.394
hsa-miR-205-5p	0.97 (0.57–1.65)	0.39 (0.03–0.88)	<b>0.042</b>
hsa-miR-21-5p	0.63 (0.46–0.78)	1.56 (0.71–2.20)	<b>0.002</b>
hsa-miR-214-3p	0.51 (0.34–0.70)	0.58 (0.43–0.72)	0.257
hsa-miR-216a-5p	0.009 (0.002–0.04)	0.02 (0.009–0.56)	0.268
hsa-miR-221-3p	0.59 (0.40–0.72)	0.52 (0.28–0.64)	0.455
hsa-miR-30c-5p	0.38 (0.26–0.56)	0.50 (0.34–0.96)	0.084
hsa-miR-375	0.36 (0.22–0.97)	1.81 (1.11–4.49)	<b>0.006</b>
hsa-miR-449a	0.58 (0.13–2.32)	1.63 (0.17–8.63)	0.140
hsa-miR-496	0.24 (0.14–1.40)	0.37 (0.28–0.76)	0.848
hsa-miR-507	0.50 (0.13–1.49)	0.78 (0.04–4.09)	0.890
hsa-miR-517a-3p	0.44 (0.11–1.39)	0.56 (0.25–1.81)	0.680
hsa-miR-548am-5p	1.80 (0.27–5.64)	0.88 (0.44–4.66)	0.783
hsa-miR-574-3p	0.70 (0.51–1.01)	0.81 (0.59–1.29)	0.667
hsa-miR-589-5p	0.06 (0.05–1.19)	0.23 (0.05–11.03)	0.177
hsa-miR-624-3p	3.67 (0.20–14.66)	3.64 (0.52–6.00)	0.685
hsa-miR-654-5p	0.10 (0.04–2.30)	0.50 (0.08–2.91)	0.390
hsa-miR-671-3p	0.08 (0.04–0.37)	0.15 (0.10–0.45)	0.473
hsa-miR-885-5p	0.35 (0.08–0.67)	0.29 (0.18–0.50)	0.874
hsa-miR-9-5p	0.33 (0.07–0.54)	0.66 (0.11–2.26)	0.383

Data are shown as median (25th–75th percentiles) of *n*-fold values. All *P*-values were obtained from Student's *t*-test using the log-transformed variable, except to miR-100-5p, miR-129-5p, miR-190a-5p, miR-19b-3p, miR-200b-3p, and miR-496, which have shown skewed distribution and *P*-values were obtained from Mann-Whitney test.

ND (not detected) = no detectable miRNA expression was observed for this group. \**P*-values in bold are significant at  $P < 0.05$ .

**Table 3.** MiRNA expressions in plasma of “screening phase” obtained using TaqMan Custom Array MicroRNA cards.

<i>miRNA</i>	<i>Control Group (n = 17)</i>	<i>PCa Group (n = 17)</i>	<i>P-value*</i>
hsa-miR-100-5p	1.30 (0.69–1.69)	3.13 (1.05–84.58)	<b>0.012</b>
hsa-miR-107	0.09 (0.04–0.25)	0.10 (0.05–0.31)	0.531
hsa-miR-122-5p	0.93 (0.35–1.38)	0.92 (0.43–2.04)	0.430
hsa-miR-148a-3p	1.24 (0.97–1.80)	1.06 (0.82–1.63)	0.454
hsa-miR-18a-5p	0.03 (0.01–0.05)	0.01 (0.005–0.07)	0.977
hsa-miR-18b-5p	9.57 (2.95–66.79)	5.58 (2.57–17.21)	0.165
hsa-miR-190a-5p	0.67 (0.25–31.05)	4.86 (0.43–70.45)	0.312
hsa-miR-19a-3p	0.01 (0.004–0.03)	0.01 (0.005–0.04)	0.684
hsa-miR-19b-3p	1.30 (0.54–3.70)	1.31 (0.41–4.99)	0.800
hsa-miR-200b-3p	0.02 (0.007–0.03)	0.11 (0.02–0.24)	<b>0.008</b>
hsa-miR-204-5p	1.95 (0.53–37.67)	1.83 (0.47–3.17)	0.161
hsa-miR-205-5p	0.03 (0.01–0.07)	0.07 (0.007–0.14)	0.402
hsa-miR-21-5p	0.72 (0.65–1.07)	0.91 (0.64–1.00)	0.895
hsa-miR-214-3p	0.25 (0.11–0.42)	0.52 (0.32–0.59)	<b>0.003</b>
hsa-miR-216a-5p	1.43 (1.21–4.61)	2.30 (1.23–20.83)	0.539
hsa-miR-221-3p	0.38 (0.33–0.53)	0.49 (0.31–0.60)	0.554
hsa-miR-30c-5p	10.33 (7.25–19.28)	7.90 (6.25–14.06)	0.385
hsa-miR-375	0.05 (0.03–0.10)	0.11 (0.05–0.47)	<b>0.040</b>
hsa-miR-548am-5p	0.17 (0.06–0.30)	0.92 (0.27–5.45)	<b>0.002</b>
hsa-miR-579-3p	0.04 (0.01–0.69)	0.10 (0.02–0.69)	0.666
hsa-miR-885-5p	0.49 (0.25–0.75)	0.53 (0.35–1.42)	0.141

Data are shown as median (25th–75th percentiles) of *n*-fold change values. All *P*-values were obtained from Student's *t*-test using the log-transformed variable, except to miR-205-5p, which have shown skewed distribution and *P*-value were obtained from Mann-Whitney test. \**P*-values in bold are significant at  $P < 0.05$ .

**Table 4.** MiRNA expressions in urine of “screening phase” obtained using TaqMan Custom Array MicroRNA cards.

<i>miRNA</i>	<i>Control Group (n = 19)</i>	<i>PCa Group (n = 19)</i>	<i>P-value*</i>
hsa-miR-100-5p	0.022 (0.001; 6.980)	0.004 (0.001; 0.184)	0.413
hsa-miR-107	0.001 (0.0002; 0.006)	0.001 (0.0001; 0.013)	0.664
hsa-miR-124-3p	0.343 (0.308; 349.26)	2.910 (0.410; 4.530)	0.734
hsa-miR-129-5p	0.029 (0.005; 2.920)	0.221 (0.035; 0.506)	0.475
hsa-miR-148a-3p	0.002 (0.0004; 0.025)	0.008 (0.001; 0.020)	0.279
hsa-miR-187-3p	0.047 (0.016; -)	0.010 (0.002; 0.316)	0.236
hsa-miR-190a-5p	1.007 (0.064; 55.34)	0.457 (0.009; 7.819)	0.335
hsa-miR-19a-3p	0.003 (0.0003; 0.197)	0.003 (0.001; 0.010)	0.934
hsa-miR-19b-3p	0.037 (0.004; 1.130)	0.128 (0.013; 3.769)	0.364
hsa-miR-200b-3p	0.001 (0.00005; 0.013)	0.002 (0.0003; 0.009)	0.495
hsa-miR-204-5p	0.008 (0.002; 0.030)	0.011 (0.004; 0.070)	0.322
hsa-miR-205-5p	0.002 (0.00008; 0.006)	0.005 (0.001; 0.028)	0.059
hsa-miR-21-5p	0.0001 (0.00002; -0.001)	0.0003 (0.0001; 0.002)	<b>0.049</b>
hsa-miR-214-3p	0.039 (0.020; 0.089)	0.045 (0.015; 0.060)	0.838
hsa-miR-216a-5p	0.138 (0.044; 0.292)	0.304 (0.012; 1.500)	0.524
hsa-miR-221-3p	0.005 (0.00006; 0.143)	0.016 (0.005; 0.069)	0.415
hsa-miR-30c-5p	0.007 (0.0005; 0.185)	0.009 (0.003; 0.622)	0.386
hsa-miR-375	0.942 (0.420; 7.877)	4.862 (2.184; 23.08)	<b>0.048</b>

hsa-miR-507	0.022 (0.011; 0.035)	0.034 (0.024; 0.071)	0.142
-------------	----------------------	----------------------	-------

Data are shown as median (25th;75th percentiles) of *n*-fold values. ND (not detected) = no detectable miRNA expression was observed for this group. \**P*-values were obtained from Mann-Whitney test. *P*-values in bold are significant at *P* < 0.05.

### Validation of the four selected miRNAs by RT-qPCR

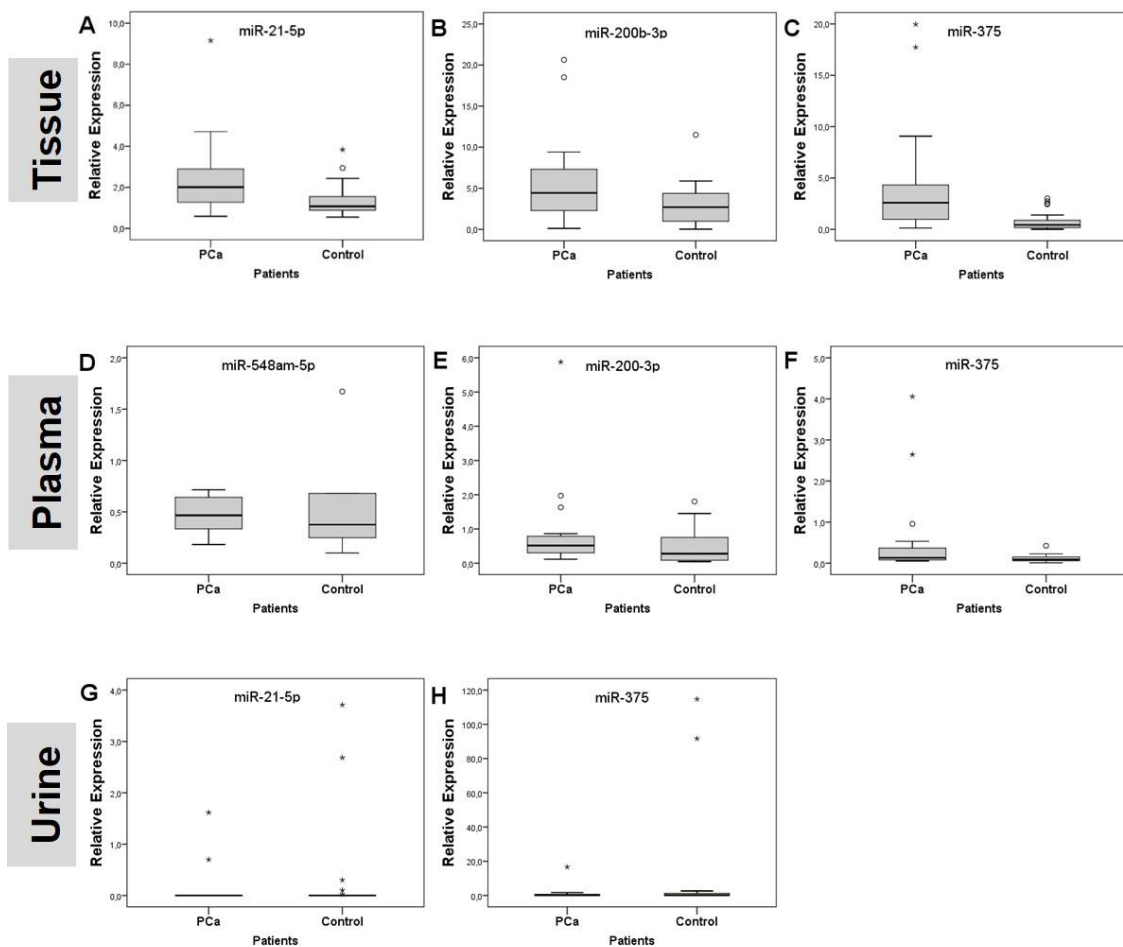
A total of nine different miRNAs were found deregulated among the analyzed groups of the “screening phase”, considering the three types of samples. Of these nine miRNAs, we chose four miRNAs to validate by RT-qPCR in the “validation phase”: miR-200b-3p, miR-21-5p, miR-375, and miR-548am-5p. These four miRNAs were selected based on the criteria described in the Materials and Methods section. As shown in Table 5 and Fig. 2, not all miRNAs found in the “screening phase” as potential PCa biomarkers maintained their significant expression differences. All miRNAs tested in prostate tissue (Fig. 2A: miR-21-5p, Fig. 2B: miR-200b-3p and Fig. 2C: miR-375) were upregulated in PCa group compared to the control group ( $P = 0.003$ ,  $P = 0.030$  and  $P < 0.001$ , respectively). In plasma samples, miR-375 (Fig. 2F) was also upregulated in PCa group in comparison to the control subjects ( $P = 0.012$ ; Table 5). Similarly, miR-200b-3p seems to be upregulated in PCa group, although the comparison with the control samples did not reach formal statistical significance ( $P = 0.067$ ; Fig. 2E; Table 5). No significant difference in the expression of miR-21-5p and miR-375 in urine samples were detected between case and control groups (Fig. 2G, 2H; Table 5).

**Table 5.** MiRNA expressions in prostate tissue, plasma and urine samples from PCa and control patients at validation phase.

<i>miRNA</i>	<i>Control Group (n = 28)</i>	<i>PCa Group (n = 22)</i>	<i>Fold change</i>	<i>P-value*</i>
<i>Tissue</i>				
hsa-miR-21-5p	1.08 (0.88–1.59)	2.01 (1.27–2.92)	<b>1.86</b>	<b>0.003</b>
hsa-miR-200b-3p	2.70 (0.98–4.55)	4.43 (2.28–7.41)	<b>1.64</b>	<b>0.030</b>
hsa-miR-375	0.44 (0.15–0.92)	2.59 (0.88–4.44)	<b>5.89</b>	<b>&lt;0.001</b>

<i>Plasma</i>			
hsa-miR-200b-3p	0.28 (0.09–0.85)	0.52 (0.27–0.80)	0.067
hsa-miR-375	0.09 (0.06–0.15)	0.13 (0.08–0.40)	<b>1.44</b> <b>0.012</b>
hsa-miR-548am-5p	0.38 (0.21–0.93)	0.47 (0.29–0.64)	0.775
<i>Urine</i>			
hsa-miR-21-5p	0.0004 (0.0001–0.0091)	0.0004 (0.0002–0.0019)	1.000
hsa-miR-375	0.16 (0.06–1.55)	0.06 (0.04–0.71)	0.279

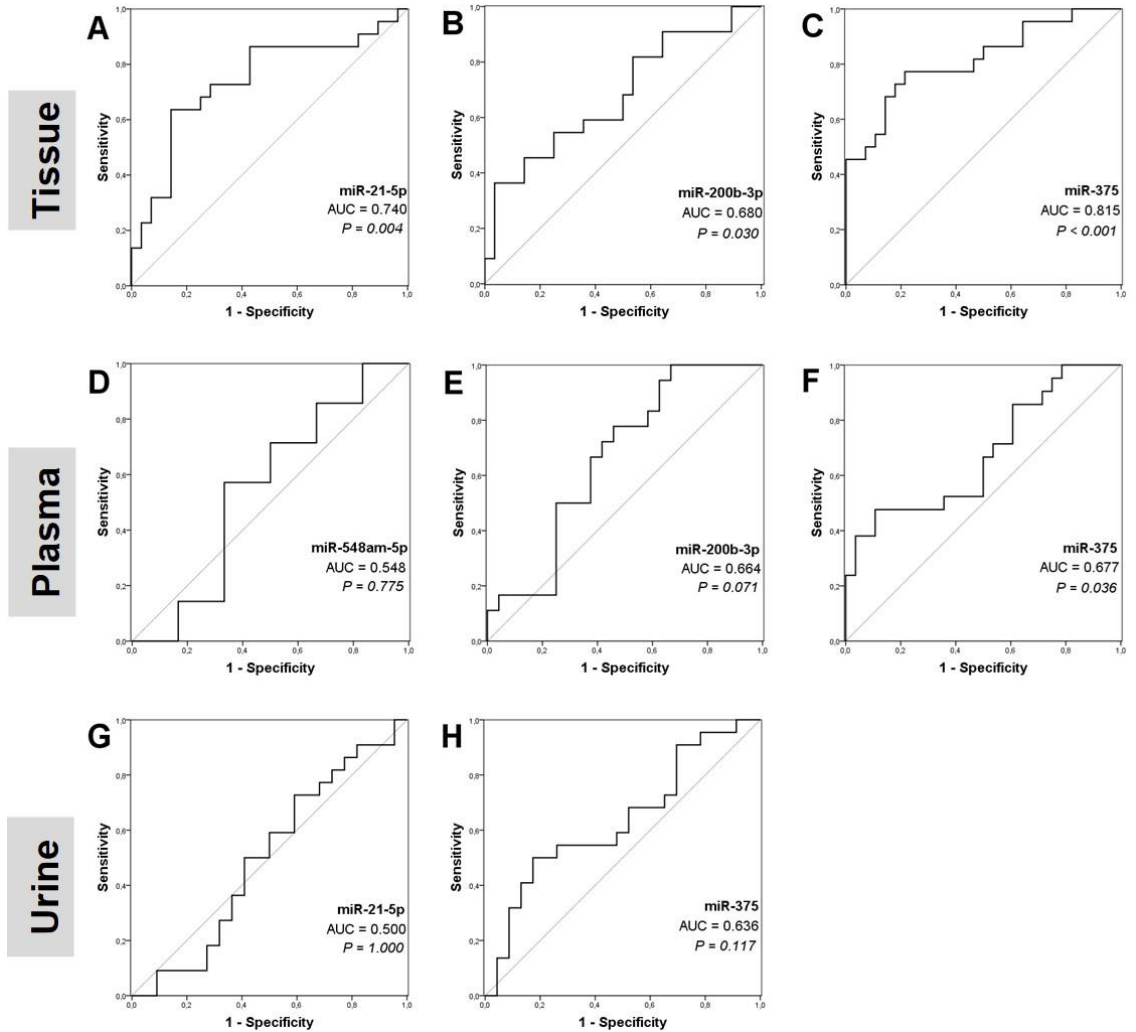
Data are shown as median (25th–75th percentiles) of *n*-fold values. \**P*-values in bold are significant at *P* < 0.05.



**Figure 2.** Box plots representing tissue (miR-21-5p, miR-200-3p and miR-375), plasma (miR-548am-5p, miR-200-3p and miR-375) and urine (miR-21-5p and miR-375) expression levels in prostate cancer (PCa) and control subjects at validation set. Boxes represent the first and third quartiles, and the median is shown as a horizontal line. Expression levels of the miRNAs are normalized to miR-24-3p (tissue and plasma) and cel-miR-39 (urine).

### **MiRNAs as diagnostic markers**

ROC analyses were performed to evaluate the capability of miRNAs to discriminate between PCa and non-PCa patients (Fig. 3; Table 6). As a result of ROC analyses, the highest AUC was indicated for miR-375 (Fig. 3C) in prostate tissue samples (0.815, 95% CI between 0.693 and 0.937). The miR-21-5p showed also a high AUC value: 0.740 (95% CI 0.594–0.886), followed by miR-200-3p with a good AUC value (0.680, 95% CI 0.529–0.832) (Fig. 3A and 3B, respectively). In plasma samples, miR-375 showed also a good AUC value: 0.677, 95% CI between 0.522 and 0.832. Similarly, miR-200b-3p presented a AUC value of 0.664 (95% CI 0.500–0.829), although with *P* value not significant ( $P = 0.071$ ; Fig. 3E). Among them, miR-375 was found in two different specimens with 0.773 of sensitivity and 0.786 of specificity for prostate tissue samples and 0.476 and 0.893 for plasma, respectively (Table 6). The miR-21-5p and miR-375 from urine samples showed no significant statistical AUC values (Fig. 3G and 3H, respectively). The cut-off value was chosen to maximize both, sensitivity and specificity, by applying the Youden's index (maximum = sensitivity + specificity – 1) for each ROC analysis (Table 6).



**Figure 3.** ROC curve analysis of miRNAs from tissue (A–C), plasma (D–F) and urine (G–H) to differentiate PCa and controls samples.

**Table 6.** Receiver operating curves (ROC) for miR-21-5p, miR-200b-3p, miR-375 and miR-548am-5p expressions in prostate tissue, plasma and urine from PCa patients and control subjects.

miRNA	AUC	95% CI	P-value*	Cut off	Sensitivity	Specificity
<i>Tissue</i>						
miR-21-5p	0.740	0.594-0.886	<b>0.004</b>	1.725	0.636	0.857
miR-200b-3p	0.680	0.529-0.832	<b>0.030</b>	6.312	0.364	0.964
miR-375	0.815	0.693-0.937	<b>&lt;0.001</b>	0.957	0.773	0.786
<i>Plasma</i>						



miR-200b-3p	0.664	0.500-0.829	0.071	0.116	1.000	0.333
miR-375	0.677	0.522-0.832	<b>0.036</b>	0.178	0.476	0.893
miR-548am-5p	0.548	0.207-0.888	0.775	0.462	0.571	0.667
<i>Urine</i>						
miR-21-5p	0.500	0.325-0.675	1.000	0.0002	0.727	0.409
miR-375	0.636	0.472-0.801	0.117	0.063	0.500	0.826

AUC, Cut-off, sensibility and specificity values are provided by ROC curve analysis, as described in the Materials and Methods Section. \**P*-values in bold are significant at  $P < 0.05$ .

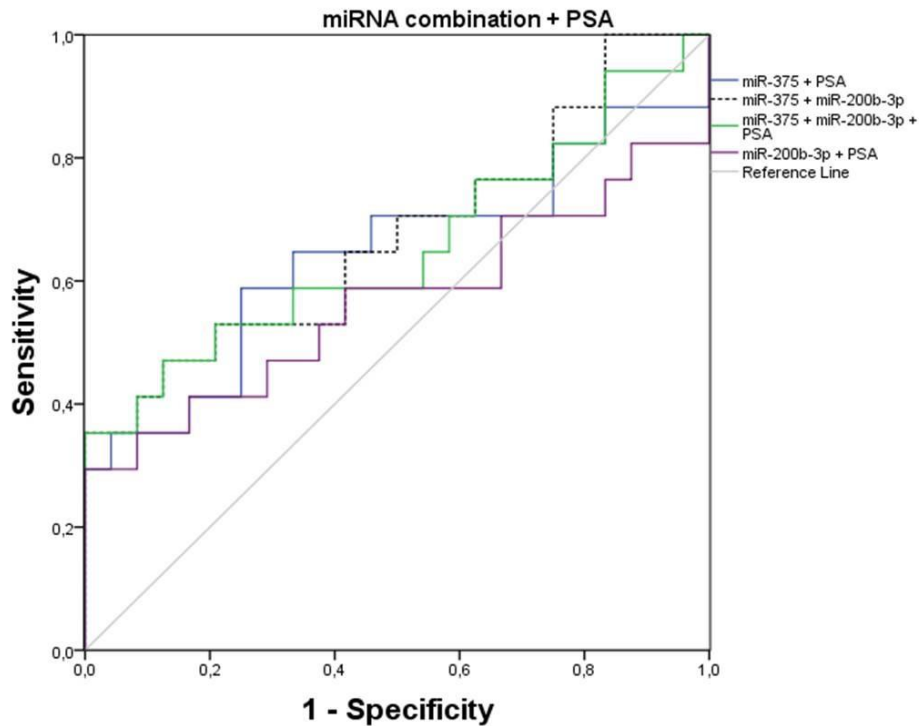
Comparative analysis of diagnostic power of more than one circulating miRNA (plasmatic miRNAs), as well in combination to PSA values were also calculated using a stepwise logistic regression model (Table 7). All combination measures showed no significant improvement of AUC values for miR-375 and miR-200-3p. Combined analysis revealed the pair miR-375/miR-200b-3p with the highest AUC value (0.674), although individual miR-375 has expressed 0.677 in plasma samples. According to Youden's index, all combinations expressed elevated specificity (0.964 – 1.00), but low sensitivity. Analysis of the pair miR-375/miR-200b-3p together with the PSA values also showed no significative differences between AUC values with other combinations, according to multimarker ROC curve analysis (Fig. 4). However, it was revealed that individual ROC values from miR-375 and miR-200b-3 were higher than only PSA (AUC = 0.590; Tables 6 and 7).

**Table 7.** Results of ROC analysis for the plasmatic microRNAs tested in combination.

miRNAs / PSA	AUC	95% CI	<i>P</i> -value	Cut off	Sensitivity	Specificity
PSA	0.590	0.419-0.762	0.278	35.44	0.27	1.00
miR-375 + PSA	0.642	0.455-0.829	0.125	0.447	0.381	0.964
miR-200b-3p + PSA	0.566	0.368-0.764	0.475	0.572	0.278	1.00

miR-375 + miR-200b-3p	0.674	0.499-0.850	0.060	0.642	0.353	1.00
miR-375 + miR-200b-3p + PSA	0.654	0.472-0.837	0.095	0.583	0.353	1.00

AUC, Cut-off, sensibility and specificity values are provided by ROC curve analysis, as described in the Materials and Methods Section.



**Figure 4.** Multimarker ROC curve analysis by combinations of miR-375, miR-200b-3p, and PSA to differentiate PCa from controls.

## Discussion

In Brazil, the incidence of prostate cancer has been on the steady rise over the past decades. Significant efforts have been made to identify new biomarkers that could clinically improve the PCa diagnosis. Recently, miRNAs have been pointed as ideal noninvasive markers of PCa, since they are involved in tumor biology, including tumor initiation, development, drug resistance, metastasis and diagnosis.

To the best of our knowledge, this is the first study using three different specimens collected from the same subject for miRNA detection as PCa biomarker,

evaluating the miRNA profiling in a Brazilian population. In our study, we evaluated the expression profile of 44 miRNAs in PCa cases and controls in prostate tissue, plasma and urine samples. In the screening phase we found nine miRNAs dysregulated among all specimens tested: miR-100-5p, miR-148a-3p, miR-18a-5p, miR-200b-3p, miR-205-5p, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-375, and miR-548am-5p. Four of these were chosen for the validation phase. Among them, miR-200b-3p, miR-21-5p and miR-375 were detected in prostate tissues and maintained the expression trend observed in the screening phase. In plasma, only miR-375 has continued significantly overexpressed in PCa group compared to the controls. In this case, miR-375 was overexpressed in PCa tissues and plasma specimens from PCa patients. However, in urine samples, none of the two miRNAs (miR-21-5p and miR-375) tested in the screening phase were confirmed to be associated with PCa diagnosis. In addition, in our study, miRNAs well expressed in PCa tissue were not uniformly well detectable in plasma and urine of PCa patients. Similar discrepancies between the abundance of miRNAs in tissues and body fluids have been reported in other studies as well (Liu *et al.* 2012; Srivastava *et al.* 2013; Stuopelyte *et al.* 2016a). In addition, differences in miRNAs levels between various body fluids were also reported and the variation was seen between samples of different cohorts (Bryant *et al.* 2012; Sapre *et al.* 2014).

One of the most studied miRNAs, miR-375 which is shown to be upregulated in various cancers including PCa, was identified as overexpressed miRNA in PCa in our study. ROC curve analysis demonstrated that miR-375 is the best marker for PCa among three miRNAs validated in tissue, with the highest AUC of 0.815, followed by miR-21-5p (AUC of 0.740) and miR-200b-3p (AUC of 0.680). Besides, we have found 5.89 fold changes in miR-375 expression in PCa tissue samples compared to the controls, similarly to the result demonstrated by Souza *et al.* (De Souza *et al.* 2017), a

study based on The Cancer Genome Atlas (TCGA), that revealed 6.74 fold changes of tumor tissue versus normal tissue. In line with a recent meta-analyses involving Gene Expression Omnibus (GEO) and TCGA data, miR-375 was significantly upregulated in aggressive PCa tissues than that in healthy prostate tissues and adjacent noncancerous tissues, determining its potential diagnostic value to distinguish PCa patients from healthy controls (He *et al.* 2019). Considering circulating miRNAs, our study revealed miR-375 significantly overexpressed in plasma samples from PCa patients compared with control subjects, with a good AUC of 0.677. The specificity of this plasmatic miRNA was higher than that of the PSA test (0.893 vs. 0.714), but sensitivity remained quite similar to that of PSA (0.476 vs. 0.500), respectively. Moderate a high levels of miR-375 have been shown in plasma and serum from PCa patients in comparison to healthy controls with AUC values ranged from 0.650 to 0.906 (Bryant *et al.* 2012; Cheng *et al.* 2013; Haldrup *et al.* 2014; Stuopelyte *et al.* 2016b). The moderate level of AUC detected in our study indicates a lower differentiation between PCa and control groups, which may be explained by selection of different negative controls (BPH patients, healthy individuals, etc.). However, miR-375 expression results remain quite relevant in our study, since they were found dysregulated in two different specimens (tissue and plasma). The authors of the present paper propose that the expression profile of miR-375 in prostatic tissue and plasma may reflect the expression changes of miR-375 in a prostate cancer condition. Moreover, increased amounts of miR-375 in tissue and blood were associated with aggressive course of disease. Blood-circulating miR-375 showed significant associations with PCa progression and metastasis of castration-resistant PCa (Nguyen *et al.* 2013). Bryant *et al.* (Bryant *et al.* 2012) also described the power of miR-375 in predict metastatic PCa using blood-derived exosomal. Despite the elevate number of

miR-375 studies, the molecular mechanisms related to overexpression in PCa has not yet been fully elucidated. These miRNA has been reported to suppress tumor in human cancers including PCa, however it acted as an oncogene in some cancers, depending on the cellular context (Bertoli *et al.* 2016; He *et al.* 2019).

The present study also indicates that miR-200b-3p was upregulated in tissue and plasma of PCa patients. A good diagnostic value of miR-200-3p in our study (AUC = 0.680) from tissues could be related to Zhang *et al.* (Zhang *et al.* 2016) study, which have found overexpression in this miRNA acting as tumor suppressor in PCa cell lines, inhibiting PCa cell growth and invasion. In plasma, our study revealed a miR-200b-3p tended toward significance ( $P = 0.071$ ) with a similar AUC of 0.664. Moreover, miR-200b-3p and miR-375 have been shown to be increased in the serum of patients with metastatic prostate cancer compared with patients with localized disease (Brase *et al.* 2011). However, a Brazilian study observed downregulation of miR-200b-3p in plasma of PCa patients (fold change = -3.5,  $P = 0.02$ , AUC = 0.57) compared to controls (De Souza *et al.* 2017). The controversial data needs to be more explored, since members of miR-200 family exert regulatory effect on genes involved in the epithelial-mesenchymal transition, which confers enhanced migratory capacity, invasiveness and stem cell properties for prostate cells (Filella & Foj 2016).

In PCa tissues, elevated levels of miR-21-5p have been detected, and showed significant associations with PCa progression (Li *et al.* 2012). According to our data, a high AUC value was reached by measurement of cancerous tissue amount of miR-21-5p (AUC = 0.740), compared to control group, while the levels of the same target in urine were not different. The difference of miR-21-5p levels in tissue and urine could be explained by specific miRNA regulation in separate body compartments and selective secretion of this miRNA into body fluids. A crucial role of miR-21-5p was

reported in prostate carcinogenesis promoting cell proliferation, inhibiting apoptosis, enhancing tumor invasion and metastasis (Krichevsky & Gabriely 2009). This miRNA is usually upregulated in PCa cells and directly targets *PTEN* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten), whose downregulation results in reduced apoptosis in PCa.

There are few urine-based studies available that aim to aid miRNAs as diagnosis of PCa. Urinary biomarkers are also promising indicators of PCa as they can be obtained by noninvasive methods. Recent studies paralleling the present study have demonstrated the feasibility of measuring the levels of miRNAs in urine from PCa patients and comparing them to those of healthy controls or patients with BPH (Srivastava *et al.* 2013; Korzeniewski *et al.* 2015; Rodríguez *et al.* 2017). Stuopelyte *et al.* (Stuopelyte *et al.* 2016b) have demonstrated that urinary miR-375 revealed a good PCa diagnostic value in two independent cohorts (AUC 0.684 and 0.797), comparing with two different control groups (23 BPH and 62 healthy individuals), respectively. Foj *et al.* (Foj *et al.* 2017) have found that miR-21 and miR-375 were significantly upregulated in urinary pellets of PCa patients (AUC 0.817 and 0.707, respectively) from 60 PCa patients and 10 healthy subjects by RT-qPCR. However, our study has failed to validate urinary miR-21-5p and miR-375 as prostate cancer biomarker. A similar study using 135 urine specimens also not differed significantly levels of miR-375 from PCa patients and controls in the validation phase (Bryant *et al.* 2012). On the other hand, our study confirmed that miRNAs can be readily detected in urine from PCa and control patients. The expression level of these oligonucleotides was probably too low for reliable testing, as indicated in data. This could be explained due the small quantity of miRNAs in biological fluids, as urine. We have use large volumes of urine collected after DRE, in which miRNAs were investigated in the urinary

sediment, in order to increase the number of prostatic cells in the specimen. However, miRNA recovery from urine is still extremely challenging, since no specific method or standard protocol was described. Another possible explanation is that urine by itself is quite a variable material, reflecting possible urinary tract diseases and depending on hydration status. Moreover, the same lack of standardization observed in miRNA recovery was also observed in different reports, regarding the employment of various analytical platforms and methods of statistical analysis, which could have contributed in our outcome (Git *et al.* 2010; Pritchard *et al.* 2012; Balacescu *et al.* 2017).

On the other hand, recent studies of circulating miRNAs in PCa revealed their good diagnostic potential when used as a single biomarker or in combination with others miRNAs or PSA test (Kelly *et al.* 2013; Jackson *et al.* 2014). We performed correlation analyses of expression levels to identify miRNA combinations, which could potentially supplement each other in a diagnostic test, and thus increase sensitivity and specificity when compared to individual miRNAs. Only circulating miRNAs from validation phase were evaluated, combining miR-375 and miR-200b-3p from plasma and PSA values. Testing pair of miRNA resulted in no further improvement of high AUC values observed for single miRNA (miR-375 and miR-200b-3p, AUC values were 0.677 and 0.664, respectively). The combination of miRNAs with PSA values also resulted in similar AUC values, compared to single miRNAs. However, all combinations tested in the present study reached AUC values greater than only PSA marker. Recent studies suggest that panels of biomarkers outperform diagnostic power of single biomarker such as PSA, thus various combinations of miRNAs have been tested for noninvasive detection of PCa (Daniel *et al.* 2017; Matin *et al.* 2018). Porzycki *et al.* (Porzycki *et al.* 2018) indicates that combined analysis of serum miR-141-3p, miR-21, and miR-375 can significantly improve the prediction level of the presence of prostate cancer.

Besides, using miRNAs panel as biomarker has advantages over single miRNAs, since certain miRNAs have aberrant expression in many types of cancers, such as let7 family members (Chen *et al.* 2012).

Some strengths and limitations of our study should be considered. As strengths, we used a well-designed case-control study in which miRNAs selected were validated in triplicates. Also, the use of three different specimens from the same individual reflects better the quantitative miRNA distribution over the body compartments. Besides, spike-in control was used in all samples to normalize the amount of input miRNA and to control the variation in RT-qPCR efficacy. As limitations, first, we could not validate all differentially expressed miRNAs from the screening phase. Second, although the selection of 44 analyzed miRNAs was based on a pilot study, miRbase and literature selection, we cannot exclude the possibility that an important PCa-related miRNA was not analyzed since more than 4000 miRNAs have been described so far. Third, although the overall sample size of the present study is relatively sufficient, the number of individuals with prostate cancer could be higher. A larger study enriched with a substantial proportion of PCa patients is warranted.

## **Conclusions**

The possible use of miRNAs in the clinic as diagnostic tool for PCa is based on a growing body of investigations throughout the last decade. In this study, some PCa-specific miRNAs were successfully detected in tissue and plasma of PCa patients and showed different quantity when compared to the control group. Considering plasma miRNAs, these data are promising in the search for a specific and non-invasive diagnosis for PCa. Notably, an increased expression level of miR-375 in patients with



prostate cancer can indicate subsequent tumorigenesis, and this result suggests that miR-375 may serve as a potential predictive biomarker for the diagnosis of CaP.

### **Declaration of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

### **Funding**

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).

### **References**

- Ambis S, Prueitt RL, Yi M, Hudson RS, Howe TM, Petrocca F, Wallace T., Liu CG, Volinia S, Calin GA *et al.* 2008 Genomic profiling of microRNA and mRNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Research* **68** 6162–6170. (doi:10.1371/journal.pone.0178059)
- Balacescu O, Petrut B, Tudoran O, Feflea D, Balacescu L, Anghel A, Sirbu IO, Seclaman E & Marian C 2017 Urinary microRNAs for prostate cancer diagnosis, prognosis, and treatment response: are we there yet? *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*. **8** 1–16. (doi:10.1002/wrna.1438)
- Bartel DP 2004 MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116** 281–297.
- Bertoli G, Cava C & Castiglioni I 2016 MicroRNAs as biomarkers for diagnosis, prognosis and theranostics in prostate cancer. *International Journal of Molecular*

*Sciences* **17** 421. (doi:10.3390/ijms17030421)

Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, Andreasen D, Mouritzen P, Wrang Teilum M & Dahlsveen IK 2013 Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* **59** S1–S6. (doi:10.1016/j.ymeth.2012.09.015)

Brase JC, Johannes M, Schlomm T, Haese A, Steuber T, Beissbarth T, Kuner R & Sültmann H 2011 Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *International Journal of Cancer* **128** 608–616. (doi:10.1002/ijc.25376)

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA & Jemal A 2018 Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68** 394–424. (doi:10.3322/caac.21492)

Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC *et al.* 2001 Minimum information about a microarray experiment (MIAME) -toward standards for microarray data. *Nature Genetics* **29** 365–371.

Bryant RJ, Pawlowski T, Catto JWF, Marsden G, Vessella RL, Rhees B, Kuslich C, Visakorpi T & Hamdy FC 2012 Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *British Journal of Cancer* **106** 768–774. (doi:10.1038/bjc.2011.595)

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL *et al.* 2009 The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55** 611–622. (doi:10.1373/clinchem.2008.112797)

Chen ZH, Zhang GL, Li HR, Luo JD, Li ZX, Chen GM & Yang J 2012 A panel of five

- circulating microRNAs as potential biomarkers for prostate cancer. *Prostate* **72** 1443–1452. (doi:10.1002/pros.22495)
- Cheng HH, Mitchell PS, Kroh EM, Dowell AE, Chéry L, Siddiqui J, Nelson PS, Vessella RL, Knudsen BS, Chinnaiyan AM *et al.* 2013 Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer-associated hypoxia. *PLoS ONE* **8** e69239. (doi:10.1371/journal.pone.0069239)
- Cho WCS 2007 OncomiRs: The discovery and progress of microRNAs in cancers. *Molecular Cancer* **6** 60. (doi:10.1186/1476-4598-6-60)
- Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK & Calin GA 2011 MicroRNAs in body fluids - the mix of hormones and biomarkers. *Nature Reviews Clinical Oncology* **8** 467–477. (doi:10.1038/nrclinonc.2011.76)
- Daniel R, Wu Q, Williams V, Clark G, Guruli G & Zehner Z 2017 A panel of microRNAs as diagnostic biomarkers for the identification of prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **18** E1281. (doi:10.3390/ijms18061281)
- Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL & Committee IG 2005 The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology* **29** 1228–1242. (doi:10.1097/01.pas.0000173646.99337.b1)
- Esquela-kerscher A & Slack FJ 2006 Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* **6** 259–269. (doi:10.1038/nrc1840)
- Filella X & Foj L 2016 Prostate cancer detection and prognosis: from prostate specific antigen (PSA) to exosomal biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* **17** 1–22. (doi:10.3390/ijms17111784)

- Foj L, Ferrer F, Serra M, Arévalo A, Gavagnach M, Giménez N & Filella X 2017 Exosomal and Non-Exosomal Urinary miRNAs in Prostate Cancer Detection and Prognosis. *Prostate* **77** 573–583. (doi:10.1002/pros.23295)
- Fredsøe J, Rasmussen AKI, Thomsen AR, Mouritzen P, Høyer S, Borre M, Ørntoft TF & Sørensen KD 2018 Diagnostic and Prognostic MicroRNA Biomarkers for Prostate Cancer in Cell-free Urine. *European Urology Focus* **4** 825–833. (doi:10.1016/j.euf.2017.02.018)
- Git A, Dvinge H & Salmon-Divon M 2010 Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA (New York)* **16** 991–1006. (doi:10.1261/rna.1947110)
- Haldrup C, Kosaka N, Ochiya T, Borre M, Høyer S, Orntoft TF & Sorensen KD 2014 Profiling of circulating microRNAs for prostate cancer biomarker discovery. *Drug Delivery and Translational Research* **4** 19–30. (doi:10.1007/s13346-013-0169-4)
- He S, Shi J, Mao J, Luo X, Liu W, Liu R & Yang F 2019 The expression of miR-375 in prostate cancer: A study based on GEO, TCGA data and bioinformatics analysis. *Pathology Research and Practice* **215** 152375. (doi:10.1016/j.prp.2019.03.004)
- Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, Van Der Kwast T, Wiegel T *et al.* 2011 EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *European Urology* **59** 61–71. (doi:10.1016/j.eururo.2010.10.039)
- Jackson BL, Grabowska A & Ratan HL 2014 MicroRNA in prostate cancer: Functional importance and potential as circulating biomarkers. *BMC Cancer* **14** 930. (doi:10.1186/1471-2407-14-930)
- Kelly BD, Miller N, Healy NA, Walsh K & Kerin MJ 2013 A review of expression

- profiling of circulating microRNAs in men with prostate cancer. *BJU International* **111** 17–21. (doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11244.x)
- Korzeniewski N, Tosev G, Pahernik S, Hadaschik B, Hohenfellner M & Duensing S 2015 Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **33** 16.e17-16.e22. (doi:10.1016/j.urolonc.2014.09.015)
- Krichevsky AM & Gabriely G 2009 miR-21: A small multi-faceted RNA. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **13** 39–53. (doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x)
- Li T, Li RS, Li YH, Zhong S, Chen YY, Zhang CM, Hu MM & Shen ZJ 2012 MiR-21 as an independent biochemical recurrence predictor and potential therapeutic target for prostate cancer. *Journal of Urology* **187** 1466–1472. (doi:10.1016/j.juro.2011.11.082)
- Liu H, Zhu L, Liu B, Yang L, Meng X, Zhang W, Ma Y & Xiao H 2012 Genome-wide microRNA profiles identify miR-378 as a serum biomarker for early detection of gastric cancer. *Cancer Letters* **316** 196–203. (doi:10.1016/j.canlet.2011.10.034)
- Matin F, Jeet V, Moya L, Selth LA, Chambers S, Clements JA & Batra J 2018 A plasma biomarker panel of four microRNAs for the diagnosis of prostate cancer. *Scientific Reports* **8** 6653. (doi:10.1038/s41598-018-24424-w)
- Nguyen HC, Xie W, Yang M, Hsieh CL, Drouin S, Lee GS & Kantoff PW 2013 Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate* **73** 346–354. (doi:10.1002/pros.22572)
- Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TLJ & Visakorpi T 2007 MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Research* **67** 6130–

6135. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0533)
- Porzycki P, Ciszkowicz E, Semik M & Tyrka M 2018 Combination of three miRNA (miR-141, miR-21, and miR-375) as potential diagnostic tool for prostate cancer recognition. *International Urology and Nephrology* **50** 1619–1626. (doi:10.1007/s11255-018-1938-2)
- Pritchard CC, Cheng HH & Tewari M 2012 MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics* **13** 358–369. (doi:10.1038/nrg3198)
- Rodríguez M, Bajo-Santos C, Hessvik NP, Lorenz S, Fromm B, Berge V, Sandvig K, Line A & Llorente A 2017 Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. *Molecular Cancer* **16** 4–9. (doi:10.1186/s12943-017-0726-4)
- Romero-Otero J, García-Gómez B, Duarte-Ojeda JM, Rodríguez-Antolín A, Vilaseca A, Carlsson S V. & Touijer KA 2016 Active surveillance for prostate cancer. *International Journal of Urology* **23** 211–218. (doi:10.1111/iju.13016)
- Santos M de O 2018 Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia* **64** 119–120. (doi:10.32635/2176-9745.rbc.2018v64n1.115)
- Sapre N, Hong MK, Macintyre G, Lewis H, Kowalczyk A, Costello AJ, Corcoran NM & Hovens CM 2014 Curated microRNAs in urine and blood fail to validate as predictive biomarkers for high-risk prostate cancer. *PLoS ONE* **9** e91729. (doi:10.1371/journal.pone.0091729)
- Schmittgen TD & Livak KJ 2008 Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* **3** 1101–1108. (doi:10.1038/nprot.2008.73)
- De Souza MF, Kuasne H, Barros-Filho MDC, Cilião HL, Marchi FA, Fuganti PE, Paschoal AR, Rogatto SR & De Syllos Cólus IM 2017 Circulating mRNAs and

- miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *PLoS ONE* **12** 1–16. (doi:10.1371/journal.pone.0184094)
- Srivastava A, Goldberger H, Dimtchev A, Ramalinga M, Chijioke J, Marian C, Oermann EK, Uhm S, Kim JS, Chen LN *et al.* 2013 MicroRNA Profiling in Prostate Cancer - The Diagnostic Potential of Urinary miR-205 and miR-214. *PLoS ONE* **8** 1–11. (doi:10.1371/journal.pone.0076994)
- Stuopelyte K, Daniunaite K, Jankevičius F & Jarmalaite S 2016a Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (Kaunas, Lithuania)* **52** 116–124. (doi:10.1016/j.medic.2016.02.007)
- Stuopelyte K, Daniunaite K, Bakavicius A, Lazutka JR, Jankevicius F & Jarmalaite S 2016b The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer. *British Journal of Cancer* **115** 707–715. (doi:10.1038/bjc.2016.233)
- Victor Ambros 2004 The functions of animal microRNAs. *Nature* **431** 350–355. (doi:10.1038/nature02871)
- Wang YL, Wu S, Jiang B, Yin FF, Zheng SS & Hou SC 2015 Role of MicroRNAs in Prostate Cancer Pathogenesis. *Clinical Genitourinary Cancer* **13** 261–270. (doi:10.1016/j.clgc.2015.01.003)
- Zhang Z, Lanz RB, Xiao L, Wang L, Hartig SM, Ittmann MM, Feng Q & He B 2016 The tumor suppressive miR-200b subfamily is an ERG target gene in human prostate tumors. *Oncotarget* **7** 37993–38003. (doi:10.18632/oncotarget.9366)