

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ENZO FERREIRA ZANELLA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS TRANSCRITOS DOS GENES *HPN*, *GSTM3* E
NETO2 PARA DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

PATOS DE MINAS - MG

2024

ENZO FERREIRA ZANELLA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS TRANSCRITOS DOS GENES *HPN*, *GSTM3* E
NETO2 PARA DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof^a. Dr^a. Thaise Gonçalves de Araújo

PATOS DE MINAS - MG

AGOSTO DE 2024

ENZO FERREIRA ZANELLA

Expressão diferencial dos transcritos dos genes *HPN*, *GSTM3* e *NETO2* para diagnóstico de pacientes com câncer de próstata

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – Instituto de Biotecnologia
Presidente

Dra. Hebreia de Oliveira Almeida Souza – Instituto de Biotecnologia
Membro

Dr. Raoni Pais Siqueira – Instituto de Biotecnologia
Membro

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa que se encontra no Sistema Eletrônico de Informações (SEI) da Universidade Federal de Uberlândia

Patos de Minas, Minas Gerais, 09 de agosto de 2024.

AGRADECIMENTOS

A jornada pelo curso de Bacharel em Biotecnologia foi iluminada pela luz divina, que esteve sempre presente em cada passo que dei. A Deus, minha gratidão eterna por me guiar e proteger em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus pais, que mesmo distantes fisicamente, nunca mediram esforços para me dar todo o suporte necessário. Vocês foram meu porto seguro, o alicerce em que pude confiar em cada desafio e conquista. Sem o amor e a dedicação de vocês, este sonho não seria possível.

À minha família, cujas boas energias e orações incessantes foram a força silenciosa que me amparou em cada desafio, meu sincero e profundo agradecimento. À minha namorada e à família dela, que se tornaram um pilar de apoio e incentivo, proporcionando-me a confiança e a determinação necessárias para seguir em frente, minha eterna gratidão.

Aos meus amigos e companheiros de estrada, que aliviaram o peso dessa jornada complexa com sua presença e apoio incondicional. Cada riso, cada conversa e cada gesto de amizade foram essenciais para tornar o caminho mais leve e cheio de esperança.

Ao Prof. Osmar Vitucci (in memoriam), que com sua paixão pela área, despertou em mim o amor pela Biotecnologia. Sem ele, certamente minha escolha profissional teria sido diferente. Sua inspiração foi o farol que me guiou até aqui.

Aos professores de ensino básico, especialmente os do ensino médio e do cursinho, meu reconhecimento e gratidão por terem plantado as sementes do conhecimento que floresceram ao longo desta jornada. Sem a base sólida que me proporcionaram, nada disso seria possível.

E aos professores do ensino superior, em especial Thaíse, Terezinha, Peterson e Dayane, além do Raoni, técnico do GBio, meu reconhecimento e admiração por terem sido exemplos de excelência e dedicação ao longo dessa trajetória. Cada um de vocês contribuiu de maneira única e especial para a realização deste sonho.

RESUMO

O Câncer de Próstata (CaP) é o mais incidente na população masculina mundial, o que o torna um problema de saúde pública. Indolente em seus estágios iniciais, necessita de métodos diagnósticos mais assertivos, uma vez que os níveis séricos do Antígeno Prostático Específico (PSA) não são exclusivos para os casos de malignidade. Painéis de marcadores moleculares têm se mostrado promissores, auxiliando no manejo clínico dos pacientes. Presentemente, objetivamos caracterizar um novo conjunto de biomarcadores em nível transcricional, visando estabelecer uma ferramenta para o diagnóstico precoce da doença. Para isso, inicialmente, foram acessados os dados disponíveis no The Cancer Genome Atlas (TCGA) para os transcritos de *KLK3*, *AR*, *HPN*, *GSTM3*, *NETO2*, *PRUNE2*, *FOLH1* e *PCA3* em tecidos com CaP (n = 461) e tecidos não-tumorais adjacentes (n = 51). Apenas os transcritos do *AR* não diferenciaram as amostras e, por meio das análises de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), os genes *GSTM3*, *HPN* e *NETO2* se destacaram, com $AUC \geq 90$ ($p < 0,05$). Assim, esses genes foram quantificados por qPCR em amostras de RNA total extraído do sangue de dez pacientes diagnosticados com CaP e doze indivíduos saudáveis. Novamente, os três marcadores diferiram entre os grupos de estudo, com Área Sob a Curva (AUC) > 90 ($p < 0,05$). Portanto, por diferentes metodologias, os genes *HPN*, *GSTM3* e *NETO2* apresentaram potencial diagnóstico relevante, de modo que sugerimos sua análise combinada, a qual poderá ser incluída em estratégias otimizadas de diagnóstico da doença, de modo a promover a qualidade de vida, em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da ONU (ODS) 3.

Palavras-chave: Biomarcadores; Câncer de Próstata; Diagnóstico; Expressão gênica

ABSTRACT

Prostate Cancer (PCa) is the most common cancer among the male population worldwide, making it a public health problem. Indolent in its early stages, it requires more accurate diagnostic methods, as serum levels of Prostate-Specific Antigen (PSA) are not exclusive to malignancy cases. Panels of molecular markers have shown promise, aiding in the clinical management of patients. Presently, we aim to characterize a new set of biomarkers at the transcriptional level, aiming to establish a tool for the early diagnosis of the disease. For this, data available in the The Cancer Genome Atlas (TCGA) for the transcripts of KLK3, AR, HPN, GSTM3, NETO2, PRUNE2, FOLH1, and PCA3 in PCa tissues (n = 461) and adjacent non-tumoral tissues (n = 51) were initially accessed. Only AR transcripts did not differentiate the samples, and through Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analyses, the genes GSTM3, HPN, and NETO2 stood out, with $AUC \geq 90$ ($p < 0.05$). Thus, these genes were quantified by qPCR in RNA samples extracted from the blood of ten patients diagnosed with PCa and twelve healthy individuals. Again, the three markers differed between the study groups, with Area Under de Courve (AUC) > 90 ($p < 0.05$). Therefore, by different methodologies, the genes HPN, GSTM3, and NETO2 showed relevant diagnostic potential, suggesting their combined analysis, which could be included in optimized diagnostic strategies for the disease, promoting quality of life, in line with the UN Sustainable Development Goals (SDGs) 3.

Keywords: Biomarkers. Diagnosis. Prostate Cancer. Gene expression

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: receptor androgênico
ATM: mutaded ataxiatelangiectasia
AUC: área sob a curva
CaP: câncer de próstata
cDNA: DNA complementar
CHECK2: Checkpoint Kinase
CTCs: células-tronco cancerígenas
dATP: desoxiadenosina fosfatada
dCTP: desoxicidina fosfatada
DEPC: dietilpirocarbonado
dGTP: desoxiguanidina fosfatada
DHT: diidrotestosterona
DLX1: homebox 1 sem distal
DNA: ácido desoxirribonucleotídeo
dNTP: desoxirribonucleotideo fosfatado
dTTP: desoxitimidina fosfata
EGFRs: receptores do fator de crescimento epidérmico
FOLH1: folato hidrolase 1
fPSA: PSA livre
GLOBOCAN: Global Câncer Observatory
HCaP: câncer de próstata hereditário
HEF: hormônio estimulador de folículo
HK2: peptidase 2 relacionada à calicreína humana
HL: hormônio luterizante
HLHL: hormônio liberador de hormônios luterizantes
HOXB13: homebox - B13
HOXC6: homebox 6
HPB: hiperplasia prostática benigna
HPN: hepsina
INCA: Instituto Nacional do Câncer
iPSA: PSA intacto
KIT: receptor de tirosina quinase para SCF
MET: receptor de tirosina quinase para HGF
NETO2: neuropilina e tolueno
NT: não-tumor/não-tumoral
OMS: organização mundial da saúde
OR: odds ratio
PCA: análise de componentes principais
PCA3: antígeno 3 do câncer de próstata
PHI: Prostate Health Index
PSA: antígeno prostático específico
PSMA: Antígeno de membrana específico de próstata
qPCR: PCR em tempo real
RAS: sarcoma de rato
RM: ressonância magnética
RNA: ácido ribonucleotídeo
RT-PCR: reação de transcriptase reversa combinada com a reação em cadeia polimerase

SG: escore de Gleason

SNPs: polimorfismo de nucleotídeo único

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TMPRSS2: serino-protease transmembrana do tipo 2, 21q22.3

TNM: tumor-node-metastasis

TPA: terapia de privação de andrógeno

tPSA: PSA total

TR: toque retal

VPN: valor preditivo negativo

VPP: valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
1.1.	O câncer e sua relevância epidemiológica	9
1.2.	Câncer de próstata.....	11
	1.2.1. Diagnóstico e estadiamento	13
	1.2.2. Tratamento.....	15
1.3.	Testes Diagnósticos e marcadores moleculares	17
	1.3.1. Principais biomarcadores moleculares para CaP . Erro! Indicador não definido.	
	1.3.2. Outros marcadores	21
	1.3.3. As ferramentas ômicas.....	22
2.	OBJETIVOS	23
2.1.	Objetivo geral	23
2.2.	Objetivos específicos	23
3.	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1.	Acesso ao TCGA	24
3.2.	Análises por qPCR.....	24
	3.2.1. Grupo de estudo.....	24
	3.2.2. Isolamento do RNA e síntese de cDNA	25
	3.2.3. PCR quantitativa.....	25
3.3.	Análises Estatísticas.....	26
4.	RESULTADOS	26
5.	DISCUSSÃO	32
6.	CONCLUSÃO	37
7.	REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. O câncer e sua relevância epidemiológica

Câncer é o nome genérico para um conjunto de doenças que podem afetar diferentes tecidos e órgãos, sendo caracterizado pela capacidade descontrolada das células de se dividirem e invadirem sítios distantes (OMS, 2021). Molecularmente, o controle do processo de divisão celular é alterado, devido ao acúmulo de mutações somáticas, como inserções e deleções, em genes supressores tumorais e oncogenes, o que conduz à malignidade (IRANZO, et al. 2018). Os primeiros modulam o ciclo celular por meio da ativação de genes envolvidos na resposta contra células danificadas ou transformadas, impedindo a carcinogênese. A mutação no gene que codifica para P53 (conhecidamente supressor tumoral), por exemplo, provoca o acúmulo dessa proteína no núcleo, sendo esta uma característica amplamente utilizada na análise da agressividade de tumores (CHEN, et al. 2020). Oncogenes são genes que se tornam disfuncionais devido a ocorrência de mutação, fusão ou superexpressão. Essas alterações podem desregular a proliferação celular ou suprimir a atividade apoptótica, favorecendo a carcinogênese (BROWN, 2021). Portanto, supressores tumorais impedem o desenvolvimento da doença, contudo, mutações podem bloquear sua atividade inibitória, favorecendo a ação de oncogenes e, conseqüentemente, o surgimento de tumores malignos em uma ação molecular dinâmica. Destaca-se o oncogene vírus do sarcoma de rato (RAS). Este codifica para GTPases atuantes na transdução de sinal da maioria dos receptores do fator de crescimento, incluindo os receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFRs), receptor de tirosina quinase para HGF (MET) e receptor de tirosina quinase para SCF (KIT) (TIMAR e KASHOFER, 2020).

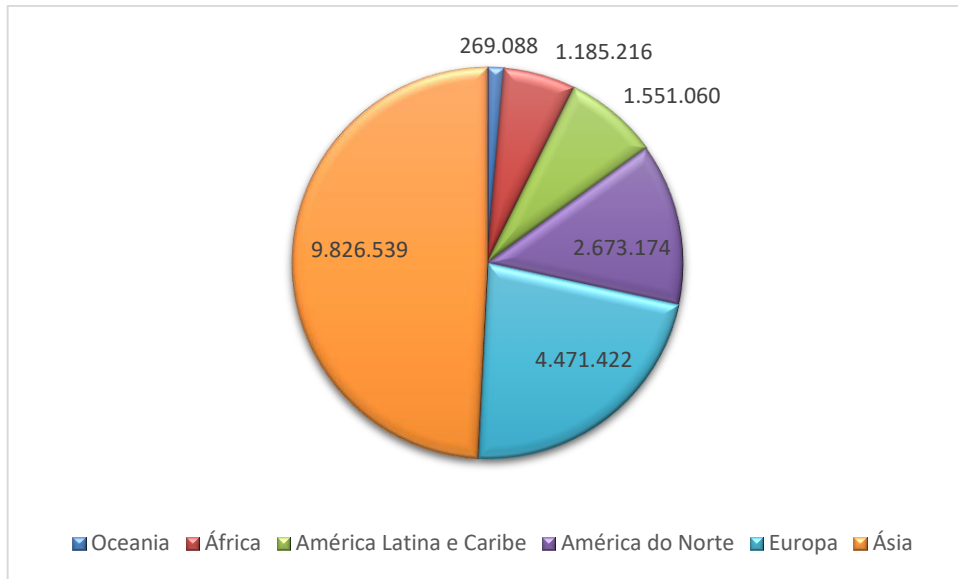
Em 2000, Douglas Hanahan e Robert Weinberg compilaram as principais características relacionadas ao surgimento e a progressão tumorais, definidas como *hallmarks*. Segundo esses autores, células transformadas apresentam capacidade autoreplicativa persistente e se dividem continuamente. Portanto, não respondem aos múltiplos sinais antiproliferativos, tampouco aos sinais inibitórios de crescimento. Além disso, evadem a mecanismos apoptóticos. A via PI3 quinase-AKT/PKB, por exemplo, transmite sinais antiapoptóticos e se encontra ativada em células tumorais. A manutenção dos telômeros em células cancerígenas favorece sua imortalização e os autores também evidenciaram a importância da angiogênese, com a formação de vasos sanguíneos, e da invasão de tecidos adjacentes, o que promove o surgimento

de metástases (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Em 2011, Hanahan e Weinberg propuseram novos *hallmarks*. Foram incluídas a instabilidade genômica, a inflamação, a reprogramação metabólica e evasão ao sistema imune (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

Senga e Grose observaram que as células-tronco cancerígenas (CTCs) compõem uma subpopulação celular única desdiferenciada e com capacidade de auto-renovação. Esse comportamento confere vantagem na sobrevivência das células malignas, garantindo a heterogeneidade e resistência terapêuticas. Já a epigenética é uma marca única dessas células, responsável pela persistência da doença. Interessantemente, o organismo humano abriga diferentes microrganismos modulando uma microbiota dinâmica e ativa. Esta pode apresentar efeito protetor, mas também causar instabilidade cromossômica e epigenética. Finalmente, a sinalização neural alterada também é associada a tumores. Os nervos simpáticos produzem noradrenalina, mediada pelos receptores β -adrenérgicos, cujos níveis aumentam durante períodos de estresse, sendo relacionados à promoção da doença (SENGA e GROSE, 2021).

De fato, a heterogeneidade e complexidade do câncer são evidenciadas pelos alarmantes índices de morbidade e mortalidade na população global. Segundo o Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) em 2022, ocorreram 19,9 milhões de novos casos da doença com 9 milhões de óbitos, sendo que mais da metade destes ocorreram na Ásia (Figura 1). Na Europa foram registrados 22,4% dos novos diagnósticos e 20,4% das mortes por câncer. Nas Américas, a incidência foi de 20,9% e 14,2% foram vítimas fatais. Mundialmente, 12,4% dos tumores diagnosticados em 2022 foram pulmonares. O câncer de mama ocupou o segundo lugar com 11,5% do total. O terceiro mais incidente foi o câncer colorretal (9,6%) e o quarto o câncer de próstata (CaP), com 7,3% de novos diagnósticos. Em homens, o câncer de pulmão foi o mais incidente (15,2%), seguido pelo CaP (14,2%) e colorretal (10,4%). Em mulheres, o câncer de mama se destacou com 23,8% dos diagnósticos, seguido de pulmão (9,4%) e colorretal (8,9%). Quanto aos óbitos, o câncer de mama foi o que mais matou mulheres, com uma taxa 15,4%. Já em homens, o câncer de pulmão (22,7%) e de fígado (9,6%) foram as duas principais causas de morte. O CaP foi responsável por 7% dos óbitos. As projeções para 2050 indicam uma tendência preocupante, com 19 milhões de novos casos em homens e 16,3 milhões em mulheres, e taxas de mortalidade de 10,5 milhões e 8,0 milhões, respectivamente (GLOBOCAN, 2024).

Figura 1: Incidência mundial de câncer em homens e mulheres em números absolutos registrados em 2022.



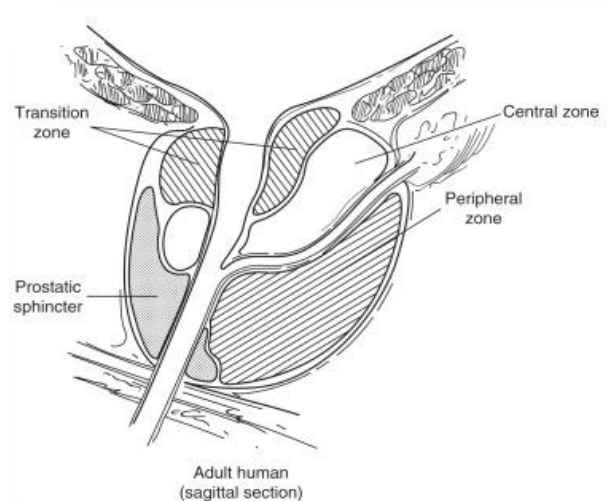
Fonte: GLOBOCAN, 2022.

Na América Latina, o Brasil tem ocupado a primeira posição entre os países com maior incidência de cânceres, com 627.193 diagnósticos (40,5%), e maior mortalidade, com 278.835 óbitos (37,5%). Entre homens brasileiros, o CaP foi o mais comum em 2022, com cerca de 102.519 novos casos (GLOBOCAN, 2022). Estimativas no Instituto Nacional do Câncer (INCA) projetam que, para o triênio 2023-2025, ocorram 704 mil novos casos de câncer, sendo 483 mil excluindo os casos de câncer de pele não melanoma. O câncer de pele não melanoma é previsto como o mais comum, com 220 mil casos novos (31,3%), seguido pelos de mama, com 74 mil (10,5%); próstata, com 72 mil (10,2%); cólon e reto, com 46 mil (6,5%); pulmão, com 32 mil (4,6%); e estômago, com 21 mil (3,1%) novos casos. Em homens, espera-se que os mais frequentes sejam o de pele não melanoma, com 102 mil (29,9%); próstata, com 72 mil (21,0%); cólon e reto, com 22 mil (6,4%); pulmão, com 18 mil (5,3%); estômago, com 13 mil (3,9%); e cavidade oral, com 11 mil (3,2%). Já nas mulheres, os principais serão câncer de pele não melanoma, com 118 mil (32,7%); mama, com 74 mil (20,3%); cólon e reto, com 24 mil (6,5%); colo do útero, com 17 mil (4,7%); pulmão, com 15 mil (4,0%); e tireoide, com 14 mil (3,9%) casos novos. Desconsiderando câncer de pele não melanoma, o CaP ocupa a segunda posição entre os tumores mais frequentes no Brasil (INCA, 2023).

1.2. Câncer de próstata

A próstata é um órgão localizado abaixo da bexiga, responsável por secretar componentes do líquido seminal. É constituída por tecido conjuntivo e glandular e dividida em regiões histológicas. A zona periférica corresponde à região distal da próstata, a zona de transição está localizada próxima à uretra e a zona central possui morfologia cônica, sendo mais larga na base da próstata (ITTMAN, 2018) (Figura 2). No contexto da anatomia, Diao e colaboradores (2022) utilizaram o plano coronal para dividir a próstata facilitando a visualização no modelo digital 3D (DIAO et al., 2022).

Figura 2: Ilustração esquemática da próstata humana e estruturas adjacentes. Encontram-se evidenciadas as zonas prostáticas.



Fonte: ITTMAN, 2018

O aumento gradual de tamanho da próstata, definido como hiperplasia prostática benigna (HPB) é relacionado ao envelhecimento (DANGELO e FATTINI, 2011). O desenvolvimento de HPB consiste na proliferação de células do estroma e epitélio da zona de transição da próstata, pressionando a uretra, o que culmina com sintomas urinários como dificuldade de iniciar a micção, dor, gotejamento, incapacidade de esvaziamento da bexiga ou infecções. A ausência de tratamento da HPB pode levar à retenção crônica e alterações na musculatura lisa da bexiga (BARADHI, et al, 2022). Contudo, outras patologias podem acometer o órgão como prostatite bacteriana aguda, prostatite bacteriana crônica, prostatite não bacteriana, prostatodina e CaP (RITCH e COOKSON, 2018).

Enquanto a HPB é considerada originária da zona de transição, a maioria dos CaP se desenvolve na zona periférica (TIAN et al, 2020). Este foi o segundo tumor mais incidente (1,4 milhão) e o quarto com maior taxa de mortalidade entre os homens (397.430) no mundo em 2022 (GLOBOCAN, 2024), o que o torna um problema de saúde pública. Na Europa foram cerca de 2.359.303 novos casos, com 1.091.871 vítimas fatais e, nas Américas, os números foram 2.196.877 diagnósticos e 756.864 mortes. No Brasil, considerando dados do INCA, foram registrados 65.840 novos casos de tumores prostáticos e 15.983 mortes em 2022 (INCA, 2024)

Segundo o GLOBOCAN, em 2022 o CaP foi o com maior número de novos casos entre homens mundialmente, com 268.490 diagnósticos. Também foi responsável por 34.500 mortes, correspondendo a 11% dentre os demais cânceres masculinos. Até 2025 são esperados 240.00 novos casos, totalizando 1,65 milhão de novos diagnósticos de 2020 a 2025 em todo o mundo (GLOBOCAN, 2024). No Brasil, o número de novos diagnósticos de CaP aumentará em 18,7 mil, entre os anos de 2020 e 2025, somando 116 mil novos casos. A mortalidade por tumores prostáticos aumentará em 4,5 mil, no mesmo período, chegando a 22,8 mil mortes pela doença em 2025 (GLOBOCAN, 2024). Em paralelo, dados do INCA estimam, no Brasil, para cada ano do triênio 2023 a 2025, 71.730 mil novos casos de CaP. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o CaP é o segundo tipo de neoplasia maligna mais frequente entre homens e é o mais incidente em todas as regiões do país (INCA, 2023).

1.2.1. Diagnóstico e estadiamento

O surgimento do CaP é associado a fatores internos e externos. Os internos incluem a idade, histórico familiar e hereditariedade. Já os externos estão relacionados ao ambiente e aos hábitos individuais. O envelhecimento humano torna as células vulneráveis às alterações moleculares, sendo o câncer uma doença comum em indivíduos com mais de 40 anos. Além disso, mutações genéticas com herança autossômica permitem o desenvolvimento de CaP hereditário (HCaP) (VIETRI et al., 2021). Estudos usando marcadores genéticos confirmaram a associação entre histórico familiar e o risco de desenvolvimento da doença (PERDANA et al., 2016). Os genes *Homebox-B13 (HOXB13)*, *Breast Cancer Gene 2 (BRCA2)*, *Checkpoint Kinase (CHECK2)* e *Mutated Ataxiatelangiectasia (ATM)* são considerados importantes marcadores genéticos para HCaP. A interrupção das vias de reparo do DNA relacionadas a esses genes leva ao aumento do perfil mutacional e à instabilidade genômica, com o consequente acúmulo de aberrações genômicas (VIETRI et al., 2021).

Já a alimentação do indivíduo é um fator modificável essencial à homeostase do organismo. Dieta saudável, sem alimentos processados, e a prática de atividades físicas diminuem a chance de ocorrência de neoplasias malignas (INCA, 2022). Além disso, o acúmulo de adipócitos promove alterações metabólicas e hormonais, como, por exemplo, a resistência à insulina, o que se torna preocupante devido ao aumento dos níveis circulantes desse hormônio, sendo um fator de risco relevante (KAISER et al., 2019). Por fim, também são cancerígenos agentes químicos, físicos e biológicos ambientais como substâncias tóxicas, pesticidas, poeira, poluentes, radiações e microrganismos infecciosos (INCA, 2022).

Os sintomas do CaP não são definidos, tampouco específicos, e podem incluir diminuição no jato urinário, hesitação, noctúria e esvaziamento incompleto da bexiga (DANGELO e FATTINI, 2011). Seu diagnóstico pode ser realizado por toque retal (TR) ou aferição dos níveis séricos de antígeno prostático específico (PSA). O TR é indolor e causa algum desconforto se a próstata estiver com tamanho aumentado. O PSA é dosado, em geral, no sangue, sendo os valores considerados normais entre 3 a 10 ng/mL, considerando um ponto de corte de 4 ng/mL. Mesmo sendo métodos consolidados para possível identificação de CaP, possuem baixa precisão no diagnóstico de câncer, pois HPB e prostatites podem provocar inchaço na próstata e alterar os níveis de PSA (ILIC, et al., 2018). Portanto, a confirmação depende da análise do tecido, o qual é obtido por biópsia transretal ou transperineal guiada por ultrassonografia retal ou ressonância magnética (RM) (DROST et al., 2019). Dessa maneira, a biópsia avalia microscopicamente a morfologia do fragmento extraído do tecido, aumentando a precisão no diagnóstico de CaP (DROST et al., 2019).

Após a identificação da malignidade, os tumores prostáticos são estadiados, o que define o prognóstico da doença, guia a conduta clínica e o tratamento do paciente. São adotados os parâmetros de TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) e escore de Gleason (SG) (VAN LEENDERS, et al., 2020). O TNM considera a lesão primária (T), o acometimento linfonodal (N) e a disseminação para outros órgãos (M), podendo classificar a doença em graus, visando uma classificação personalizada (SAOUD et al., 2020). Estádios I e II correspondem ao estágio precoce de CaP. Estádio III está associado à doença localmente avançada e o estágio IV indica câncer avançado e metastático (COSTA et al., 2020).

O SG é um sistema de avaliação do grau histológico do CaP, baseado no arranjo microscópico e arquitetura ou padrão glandular, tomando-se como referência a próstata ativa (LESLIE et al., 2022). O escore é a somatória dos perfis histológicos primário (dominante) e secundário, variando de 2 a 10, o que permite classificar em graus de 1 a 5 (STARK et al., 2009). Graus entre 1-3 correspondem a estruturas glandulares bem delimitadas, podendo conter

células uniformes e pequenas ou células com tamanho e forma variada. O grau 4 compreende células fusionadas em massas amorfas ou formando glândulas irregulares. Grau 5 corresponde aos tumores anaplásicos (VAN LEENDERS et al., 2020). Portanto, grau 1 representa padrão e aparência glandulares normais e grau 5 representa camadas de células cancerosas anormais. Assim, tumores de baixo risco possuem SG de $3+3=6$ ou menor. Cânceres de grau intermediário possuem SG de $3+4=7$ e os alto risco possuem SG de $4+3=7$ ou superior (LESLIE et al., 2022).

1.2.2. Tratamento

Atualmente, para o tratamento do CaP, são adotadas cirurgia, radioterapia, terapia hormonal e quimioterapia (INCA, 2021). Para o Cap localizado são realizadas a cirurgia (prostatectomia), radioterapia e crioterapia, considerando o estado funcional do paciente e expectativa de vida superior a 10 anos. De fato, o CaP pode ser controlado ou curado com intervenção cirúrgica quando em estágios iniciais, em que há a possibilidade de remoção completa do tumor. Esta também pode ser uma estratégia paliativa, voltada para a melhora na qualidade de vida de pacientes com tumores avançados (LESLIE et al., 2022).

A radioterapia é o principal método para tratamento de pacientes com CaP, sendo fundamental para o controle do tumor e disseminação da doença. É eficaz para tumores localizados com efeitos colaterais menos severos (JAROSZ-BIEJ et al., 2021). Além disso, pode promover a liberação e ativação de antígenos, recrutando linfócitos T e promovendo uma resposta imunológica inata e adaptativa. Já a crioterapia é um método menos invasivo, o qual consiste em inserir pequenas agulhas de termoacoplamento para direcionar o resfriamento da próstata, vesículas seminais ou ambas, destruindo as células malignas do tecido prostático (JUNG et al., 2018). Além disso, a ablação focal pode ser utilizada, contudo, sua eficácia ainda permanece por ser comprovada enquanto método curativo (LESLIE et al., 2022). Estão incluídos a crioablação, ultrassom focalizado de alta intensidade, terapia fotodinâmica, eletroporação irreversível, ablação a laser focal e aplicação da terapia focal como tratamento de resgate (AHDROOT et al., 2019).

A terapia de privação de andrógeno (TPA) consiste no bloqueio hormonal, uma vez que, apesar de essenciais para o funcionamento normal do órgão, a testosterona e diidrotestosterona (DHT) estão associadas ao crescimento das células cancerosas. Portanto, a inibição da produção androgênica permite a diminuição ou crescimento retardado do tumor, sendo indicada para os casos de CaP avançado (CRAWFORD et al., 2019). A TPA inclui a orquiectomia, com a retirada dos testículos, ou a castração química, com a utilização de análogos ou antagonista hormonais.

Os análogos de hormônio liberador de hormônio luteinizantes (HLHL) estimulam os receptores da hipófise aumentando o hormônio luteinizante (HL) e hormônio estimulador de folículo (HEF). Dessa maneira, a exposição à medicamentos crônicos promove a regulação negativa de receptores da hipófise diminuindo HL e HEF, e, conseqüentemente, a produção de andrógenos. Em oposição aos análogos, os antagonistas de HLHL bloqueiam os receptores hipofisários inibindo a síntese de testosterona (TUCCI et al., 2018). Também são utilizados medicamentos antiandrogênicos, os quais inibem, por competição, a ligação de diidrotestosterona ao receptor androgênico (AR) no sítio de ligação. Os antiandrogênicos impedem a translocação nuclear do AR e interação do AR com o promotor, controlando, assim, a proliferação de células transformadas e ativando mecanismos apoptóticos (HU et al., 2020). Outro medicamento utilizado em TPA são os inibidores de CYP17, enzima envolvida na síntese de testosterona. CYP17 é encontrada nos testículos, glândulas adrenais e tecido tumoral da próstata (HU et al., 2020).

A quimioterapia é um tratamento baseado em medicamentos contra o câncer, transportados pelo sistema sanguíneo, a fim de destruir as células transformadas, impedindo tanto a proliferação celular quanto a difusão pelo organismo (INCA, 2021). Para o tratamento de CaP, o docetaxel e cabazitaxel têm sido utilizados como terapia de segunda linha (NADER et al., 2018). Docetaxel é considerado um importante agente quimioterápico e relacionado ao aumento da expectativa de vida de pacientes com CaP (BARATA e SARTOR, 2019).

A terapia adotada considera os riscos e efeitos colaterais, a idade do paciente, condições de saúde e probabilidade de cura. Para tumores de Estádios I e II são indicados a vigilância ativa, prostatectomia radical e radioterapia, sendo possível combinar alguns desses tratamentos. Em Estádio III é comum o tratamento por radioterapia, braquiterapia e hormonioterapia. CaP de Estádio IV é tratado com hormonioterapia, quimioterapia e cirurgia para aliviar os sintomas (ONCOGUIA, 2020). Contudo, em CaP avançado, o tratamento inicial, em geral, se mostra ineficiente demandando novas abordagens. Para a doença localmente avançada preconiza-se a radioterapia, criocirurgia e/ou prostatectomia radical. Em casos mais graves, a hormonioterapia é o método mais eficaz. Perante esse cenário, o CaP metastático apresenta um custo total de R\$ 917.000,00 por paciente, incluindo tratamento oncológico sistêmico, exames e internação hospitalar (ONCOGUIA, 2020).

Apesar dos avanços dos métodos de imagem e das estratégias terapêuticas, muitos pacientes são diagnosticados tardiamente e/ou refratam ao tratamento. Adicionalmente, a heterogeneidade dos tumores prostáticos ainda desafia as pesquisas, exigindo múltiplos esforços dedicados à sua compreensão. Nesse contexto, é premente a necessidade de se

identificar e validar biomarcadores capazes de triar a população com maior acurácia e de direcionar a vigilância ativa, impactando significativamente na sobrevida dos pacientes.

1.3. Testes Diagnósticos e marcadores moleculares

Os testes diagnósticos consistem em técnicas ou procedimentos utilizados para confirmar ou descartar a presença de uma doença ou condição médica de um indivíduo (OMS, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde, os testes diagnósticos devem ser precisos, seguros, acessíveis, aceitáveis e validados por estudos clínicos (OMS, 2017). O diagnóstico consiste no processo de identificação da doença ou condição de saúde do indivíduo (OMS, 2017). Já a detecção envolve a triagem ou monitoramento de sinais da enfermidade antes do aparecimento de sintomas clínicos claros. Para ambos são utilizados biomarcadores. (NHS, 2021).

Biomarcadores são moléculas ou sinais capazes de detectar uma doença, prognosticar, determinar qual o tratamento a ser adotado, acompanhar a resposta terapêutica e proporcionar uma melhor qualidade de vida ao paciente (KOHAAR et al., 2019). A seleção de um biomarcador depende da presença e do estágio do tumor e das condições do paciente. Segundo Kohaar e colaboradores (2019), biomarcadores de triagem permitem a detecção precoce durante o período assintomático da doença. Biomarcadores prognósticos preveem os riscos relacionados à progressão da doença e os preditivos antecipam a resposta terapêutica. Devem ser específicos, sensíveis, robustos, além de exigirem métodos não invasivos e apresentarem uma relação custo-benefício (SALCICCIA et al., 2021). A sensibilidade adequada é necessária para detectar o câncer precocemente ou monitorar sua progressão com precisão. No entanto, aumentar a sensibilidade pode resultar em maior taxa de falsos positivos, o que pode levar a procedimentos invasivos desnecessários e ansiedade nos pacientes. Por outro lado, uma alta especificidade é essencial para evitar falsos diagnósticos negativos. É fundamental encontrar um equilíbrio entre sensibilidade e especificidade (INCA, 2021).

A obtenção de amostras de tecido tumoral também exige a discussão de aspectos logísticos e éticos. Em alguns casos, não é possível obter amostras diretamente do tumor ou realizar biópsias repetidas para monitorar a resposta ao tratamento. Nesses casos, a busca por amostras alternativas, como fluidos corporais (sangue, urina, saliva), é uma abordagem promissora. Além disso, os altos custos associados ao desenvolvimento, validação e disponibilidade comercial de testes podem limitar seu acesso em algumas regiões ou sistemas

de saúde, criando desigualdades no atendimento aos pacientes, as quais necessitam ser superadas (FORD e ETTINGER, 2014).

Por fim, a heterogeneidade, pluralidade, plasticidade e complexidade da doença dificultam a validação de marcadores assertivos, exigindo múltiplos esforços em uma maior caracterização e compreensão de seus mecanismos moleculares. A confirmação clínica demanda o estudo em diferentes populações de pacientes e em diferentes centros de pesquisa, para que a confiabilidade dos resultados seja garantida (UHR et al., 2020). De fato, os biomarcadores moleculares têm o potencial de revolucionar o diagnóstico, tratamento e prognóstico do câncer. No entanto, é importante reconhecer e abordar os desafios, de modo que uma colaboração contínua entre pesquisadores, clínicos e empresas de biotecnologia é essencial para superar esses obstáculos e estabelecer estratégias promissoras de combate à doença.

1.3.1. PSA

Dentre os biomarcadores relacionados ao CaP, o mais amplamente utilizado é o PSA, sendo este uma serina protease codificada pelo gene *KLK3* e produzida e secretada pelo epitélio ductal e acinar de próstata. Essa protease tem como função principal a liquefação do sêmen, causando a morte das células espermáticas pela degradação das proteínas semenogelina (FERRO, et al. 2016). Dessa maneira, a concentração de PSA no sangue é naturalmente baixa. Em casos de CaP, o PSA auxilia na detecção, diagnóstico e planejamento do tratamento. Para diagnóstico são consideradas duas isoformas: (i) o PSA total (tPSA), o qual está ligado a inibidores de proteases e (ii) o PSA livre (fPSA ou proPSA) que não se encontra ligado a complexos proteicos (KOHAAR, et al. 2019). A diferença quantitativa entre os níveis de fPSA e tPSA podem distinguir carcinoma de doença inflamatória benigna, uma vez que a menor proporção entre fPSA/tPSA caracteriza a doença maligna (KOHAAR, et al, 2019). O teste sérico *Prostate Health Index* (PHI) determina um único valor para PSA, fPSA e proPSA, com maior especificidade para detecção de CaP na faixa de PSA entre 4-10 ng/mL (BABAJIDE et al., 2021).

Contudo, um único marcador não é suficiente para caracterizar a doença. Nesse contexto, estudos dedicados à identificação e caracterização de biomarcadores para o CaP permanecem relevantes e auxiliam na melhor compreensão da promoção e progressão desses tumores. Devido às semelhanças estruturais entre o PSA e outras *KLKs*, a peptidase 2 relacionada à calicreína humana (hK2) também tem sido analisada juntamente com tPSA, fPSA e PSA intacto (iPSA). Esta é uma forma não clivada internamente e comumente associada ao

câncer (HONG, 2014). A pontuação 4K consiste em um teste sérico com o intuito de analisar esses quatro marcadores, com significativa performance diagnóstica (UHR et al. 2020). Em revisão, a investigação feita por Darst e colaboradores (2020) indicaram que o painel 4K se sobressai em relação ao tPSA e fPSA isolados, o que evidencia o potencial desse teste para melhorar a triagem atual da doença (DARST et al., 2020)

1.3.2. *PSMA*

O Antígeno de Membrana Específico da Próstata (PSMA) consiste em uma proteína transmembrana codificada pelo gene folato hidrolase 1 (*FOLH1*), descoberta pela primeira vez em células prostáticas tumorais, mas também presente em outros cânceres (UIJEN, 2021). Essa proteína tem se destacado no CaP devido ao seu alto nível de expressão em células malignas, relacionada à angiogênese, degradação da matriz extracelular e transdução de sinal via integrina (UIJEN, 2021).

No estadiamento da doença, o PSMA é associado à tomografia por emissão de prótons (PET)/tomografia computadorizada (CT), sendo uma estratégia de detecção por imagem emergente no manejo de pacientes com CaP. PSMA PET/CT é aplicada para confirmação de CaP oligometastático oligorecorrente, além de ser uma ferramenta de avaliação de respostas à terapia (FANTI, 2020).

1.3.3. *PCA3*

O Antígeno 3 do Câncer de Próstata (*PCA3*) é um RNA não codificante superexpresso em amostras de tecido de CaP, sendo um biomarcador detectado na urina coletada após o TR (YAMKAMON et al., 2020). Esse teste (*Progensis PCA3*) consiste na utilização da Reação em Cadeia Polimerase (PCR) para detectar a expressão dos transcritos de *PCA3* e *PSA*, de modo que a razão desses marcadores tem se destacado no diagnóstico do CaP em relação aos níveis séricos do PSA (YAMCAMOM et al., 2020; MATUSZCZAK et al., 2021). O *PCA3* pode controlar a expressão de genes regulados pelo AR por meio da modulação de co-reguladores em células de CaP. Além disso, encontra-se relacionado com o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) e, portanto, com o avanço da doença (GOULART, 2014).

Foi observado um aumento na expressão do gene *PCA3* e uma diminuição na expressão da proteína PRUNE2 (homólogo humano do gene *Drosophila prune*) (LAUER, 2023). Esse comportamento é explicado pela influência negativa que o *PCA3* exerce sobre o gene supressor

tumoral *PRUNE2*. A proteína *PRUNE2* possui um domínio BCH que inibe a família de proteínas Rho, as quais estão envolvidas na transformação celular, migração, metástase e progressão do ciclo celular (LAUER, 2023). A supressão de *PRUNE2*, portanto, resulta em uma menor atividade desse gene, estando associado a um pior prognóstico da doença (BOZGEYIK et al., 2022).

1.3.4. *GSTM3*

Polimorfismos genéticos são variações nas sequências de nucleotídeos e encontram-se relacionados a tumores, podendo, inclusive, comprometer a atividade enzimática. As Glutathionas S-transferases (GSTs) são enzimas desintoxicantes de compostos químicos, como carcinógenos e quimioterápicos, compostas por proteínas citosólicas mitocondriais ou microsossomais e responsáveis pela catalisação da conjugação da glutathiona. Polimorfismos genéticos em seus genes codificantes têm sido associados ao aumento da susceptibilidade ao CaP (WANG et al., 2020).

1.3.5. *NETO2*

O gene *NETO2* codifica para uma proteína denominada Neuropilina e Tolueno (*NETO2*) a qual possui os domínios CUB e LDLa, sendo associada ao desenvolvimento de CaP. *NETO2* é considerada uma oncoproteína vital que contribui para a invasão e metástase de tumores sólidos via ativação da PI3K/Akt (XU et al., 2021).

1.3.6. *HPN*

Hepsina (*HPN*) é uma serina protease de membrana integral de tipo 2 considerada importante na regulação do CaP, modulando a migração e invasão de células transformadas (HOL, 2010). Segundo Wahab e colaboradores, *HPN* causa desorganização na membrana basal, permitindo que as células tumorais invadam o ambiente extracelular e promovam metástase (WAHAB et al., 2022)

Tabela 1: tabela com os principais biomarcadores para CaP e suas características, incluindo função, gene codificante, métodos de detecção e relevância clínica.

Biomarcador	Descrição e Função	Gene	Método de Detecção	Relevância no CaP	Referências
PSA	Serina protease que liquefaz o semen, produzida pelo epitélio prostático	<i>KLK3</i>	Teste sérico (tPSA, fPSA e PHI)	Auxilia na detecção, diagnóstico e planejamento do tratamento	FERRO et al., 2016; KOHAAR et al., 2019; BABAJIDE et al., 2021
PSMA	Proteína transmembrana, alta expressão em células malignas	<i>FOLH1</i>	Associado a exames de image, como PET/CT (PSMA PET/CT)	Usado no estadiamento da doença e na avaliação de resposta à terapia.	UIJEN, 2021; FANTI, 2020
PCA3	RNA não codificante superexpresso em CaP.	<i>PCA3</i>	Teste de urina (Progensa <i>PCA3</i>)	Maior precisão no diagnóstico em relação ao PSA; relacionado à EMT e pior prognóstico.	YAMKAMON et al., 2020; MATUSZCZAK et al., 2021; GOULART, 2014; LAUER, 2023; BOZGEYIK et al., 2022
GSTM3	Enzima detoxificante que catalisa a conjugação de glutathione.	<i>GSTM3</i>	Análise genética (polimorfismos)	Polimorfismos associados ao aumento da susceptibilidade ao CaP.	WANG et al., 2020
NETO2	Proteína envolvida na invasão e metástase de tumores via PI3K/Akt.	<i>NETO2</i>	Expressão gênica (qPCR, RNA-seq)	Considerada uma oncoproteína vital no desenvolvimento do CaP.	XU et al., 2021
HPN	Serina protease que regula a migração e invasão celular.	<i>HPN</i>	Expressão gênica e proteica (qPCR, Western blot, IHC)	Desorganiza a membrana basal, facilitando a invasão celular e metástase.	HOL, 2010; WAHAB et al., 2022

1.3.2. Outros marcadores

Transcritos da fusão entre o gene *TMPRSS2* (serino-protease transmembrânica do tipo 2, 21q22.3) com os genes codificadores de fatores ETS, *ERG*, *ETV1*, *ETV4* ou *ETV5* foram identificados no CaP. Dentre estas, a fusão *TMPRSS2:ERG* tem se destacado, uma vez que *ERG* é considerado um oncogene responsável por promover a proliferação celular, controlar a

diferenciação, estimular a angiogênese e modular a inflamação e apoptose (WANG et al., 2017). Além disso, a fusão é encontrada em cerca de 50% dos cânceres prostáticos rastreados por PSA (TOMLINS et al., 2005).

Os genes Homeobox C6 (*HOXC6*), Homeobox C4 (*HOXC4*) e Homeobox 1 sem distal (*DLX1*) oferecem melhor compreensão dos mecanismos desenvolvimento do CaP. Membros da família de genes *HOXC* possuem expressão baixa ou inexistente em tecido prostático normal, de modo que sua superexpressão é comumente associada à malignidade (LUO e FARNHAM, 2020; JUNG et al., 2020). O gene *DLX1*, por sua vez, é relacionado com a viabilidade e migração de células cancerosas (TAN et al., 2021) e codifica para uma proteína de ligação a β -catenina que, quando superexpressa, ativa a sinalização β -catenina/TCF. O ensaio SelectMDx consiste em um teste molecular realizado em urina para quantificar a expressão de mRNA dos genes *HOXC6* e *DLX1* (HENDRICK et al., 2021). Além disso, esse ensaio se mostrou sensível para detectar CaP avançado (KOHAAR et al., 2019; HENDRICK et al., 2021).

Portanto, compreender as vias moleculares do CaP permite a definição de marcadores clinicamente relevantes, capazes de direcionar o manejo clínico. Os ensaios até então disponíveis apresentam limitações, o que determina a constante necessidade de se caracterizar novos alvos. O diagnóstico precoce é preponderante para a cura e estudos têm demonstrado uma redução significativa na taxa de mortalidade de pacientes quando ações voltadas para a prevenção primária são adotadas. No caso de CaP, a prevenção primária consiste em um estilo de vida mais saudável, como alimentação equilibrada, prática contínua de exercícios físicos, manutenção do peso adequado e evitar o consumo de álcool e cigarro (PINTO e SEGURA, 2006). Nesse cenário, biomarcadores antecipam o fenótipo maligno e são, de fato, revolucionários na área da saúde, sobretudo na oncologia.

1.3.3. As ferramentas ômicas

Segundo o National Cancer Institute o The Cancer Genome Atlas (TCGA) é um consórcio mundial voltado para a caracterização molecular de tumores. Atualmente, conta com milhares de análises depositadas de cerca de 33 tipos de câncer. O programa iniciou em 2005, com a união de esforços do Instituto Nacional de Câncer e o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano, contando com diferentes pesquisadores. Por 12 anos, o TCGA gerou 2.5 petabytes de dados de genômica, epigenômica, transcriptômica e proteômica que auxiliam na compreensão da doença. Assim, permite um aprofundamento nas caracterizações moleculares,

equidade de acesso aos dados, refinamento computacional e evolução das estratégias de análises (NATIONAL CENTER INSTITUTE, 2024).

O National Center Institute demonstra que o TCGA emerge como um catalisador significativo de progresso na pesquisa oncológica, representando não apenas um recurso precioso, mas também um legado de colaboração (NATIONAL CENTER INSTITUTE, 2024). Essa ferramenta é a maior base de dados genômicos de câncer, sendo essencial para a pesquisa oncológica. A análise dos dados do TCGA é crucial para entender os mecanismos moleculares do câncer e explorar novas estratégias terapêuticas. Esse repositório abrangente possibilita a identificação de novos alvos terapêuticos, aprimora o diagnóstico precoce e melhora a avaliação clínica dos tumores. Entre as novas abordagens, o estudo das long non-coding RNAs (lncRNAs) se destaca pelo seu potencial terapêutico significativo. Assim, o TCGA não só avança o conhecimento sobre a biologia do câncer, mas também abre caminho para intervenções terapêuticas mais eficazes e personalizadas (HUANG et al., 2021).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estabelecer o perfil diagnóstico de novos marcadores moleculares para o CaP.

2.2. Objetivos específicos

(i) comparar os níveis transcricionais dos genes *KLK3*, *AR*, *HPN*, *GSTM3*, *NETO2*, *PRUNE2*, *FOLH1* e *PCA3* utilizando dados disponíveis no TCGA para indivíduos com CaP;

(ii) analisar a correlação dos marcadores e estabelecer a melhor combinação para o diagnóstico de CaP;

(iii) detectar e quantificar os níveis transcricionais de diferentes alvos em amostras de sangue de pacientes com CaP e indivíduos saudáveis;

(iv) avaliar a sensibilidade e especificidade dos biomarcadores;

(v) explorar o potencial de biomarcadores como ferramentas para o diagnóstico de CaP.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Acesso ao TCGA

A expressão dos genes *KLK3*, *AR*, *HPN*, *GSTM3*, *NETO2*, *PRUNE2*, *FOLH1* e *PCA3* foi inicialmente avaliada a partir dos dados disponíveis no TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), os quais consistem em arquivos de RNA-seq - versão 2 (Illumina Hi-Seq). Foram selecionadas amostras de tecidos com CaP (n = 461) ou não-tumoriais adjacentes (n = 51) acessados em janeiro de 2023. Cada perfil de expressão gênica (contagem de tags por gene) foi normalizado para leituras por kilobase de exon por milhão de leituras de sequência mapeada (RPKM), de acordo com o tamanho do CDS e contagem de tags inteiras usando a fórmula $(109 * C) / (N * L)$, em que 109 é um fator de correção, C é o número de leituras que correspondem a um gene, N é o total de tags mapeáveis no experimento e L é o tamanho do CDS (MORTAZAVI et al., 2008).

3.2. Análises por qPCR

3.2.1. Grupo de estudo

Foram utilizadas, nesse estudo, amostras de sangue periférico de 22 indivíduos, sendo 10 diagnosticados com CaP e 12 de voluntários saudáveis. Para os pacientes com CaP, foram incluídos homens que não tinham sido submetidos à quimioterapia pré-operatória, radiação ou terapia hormonal. Estes foram classificados de acordo com parâmetros clínicos e laboratoriais.

A idade média dos participantes foi de 65,14 anos (variação de 59 a 74 anos) para o grupo CaP e de 42,5 anos (variação de 22 a 63 anos) para os indivíduos saudáveis. Considerando os aspectos histopatológicos dos tumores, os pacientes apresentaram TNM T1 (14,28%), T2 (28,57%) e T3 (57,15%). A graduação histológica de acordo com o escore de Gleason foi agrupada em Gleason > 7 (60%) e Gleason < 7 (40%). Os níveis séricos médios de tPSA para os pacientes com CaP foram 9,44 (\pm 7,43, faixa de 4,5 a 21,1). Todos os procedimentos foram consentidos, sendo este estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa na Universidade Federal de Uberlândia, sob o número 4.100.044/2020.

3.2.2. Isolamento do RNA e síntese de cDNA

O isolamento do RNA total do sangue periférico das amostras foi realizado conforme protocolo previamente publicado (NEVES et al., 2012). O material extraído foi avaliado quantitativamente e qualitativamente por espectrofotometria, nos comprimentos de 260 e 280 nm. Além disso, a qualidade do RNA foi observada em gel de agarose 1,5%, submetido a 100 volts por 1 hora em tampão TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X e visualizado com GelRed 1X (Biotium). O RNA total foi mantido a -80 °C até as análises subsequentes.

Para a transcrição reversa, ou síntese de cDNA, foi utilizado 1 µg de RNA total, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Invitrogen), 1X de Tampão da MMLV-RT (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP-Invitrogen) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como primers randômicos em um volume final de 20 µl que foi completado com água tratada com DEPC. A solução foi incubada a 37°C por 1 hora, em seguida, aquecida a 95°C por 5 minutos e, em seguida, armazenada a -20 °C.

3.2.3. PCR quantitativa

As reações para qPCR foram preparadas utilizando o kit PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA), contendo 2 µl de cDNA, 5 µl de Mix 2x qPCR (Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,5 µM dos oligonucleotídeos para os genes *GSTM3*, *NETO2* e *HPN* (Tabela 1) e água ultrapura para um volume final de 10 µL. A amplificação foi conduzida em termociclador QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher, EUA). A ciclagem incluiu o aquecimento a 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Os dados foram analisados utilizando o software QuantStudio™ Design & Analysis Software v1.4.3 (Thermo Fisher Scientific, EUA), sendo confirmada a especificidade dos primers pela análise da curva de dissociação e os transcritos quantificados pelo método Cq comparativo utilizando o gene de referência B-2-microglobulina (*B2M*).

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação transcricional por qPCR.

Gene	Primer sense (5' - 3')	Primer antisense (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>β2M</i>	CCTGCCGTGTGAACCATGT	GCGGCATCTTCAAACCTCC	94
<i>GSTM3</i>	ACTGGGATATTCGTGGGCTG	CGCAAGATGGCATTGCTCT	214
<i>NETO2</i>	CGAACCAGCAATGGAGGT	TTCTTTGACGTGGAGCAG	102
<i>HPN</i>	CCGCCATCTGCCAAGACT	CCCACAGAGGTGTGCTCCAT	128

3.3. Análises Estatísticas

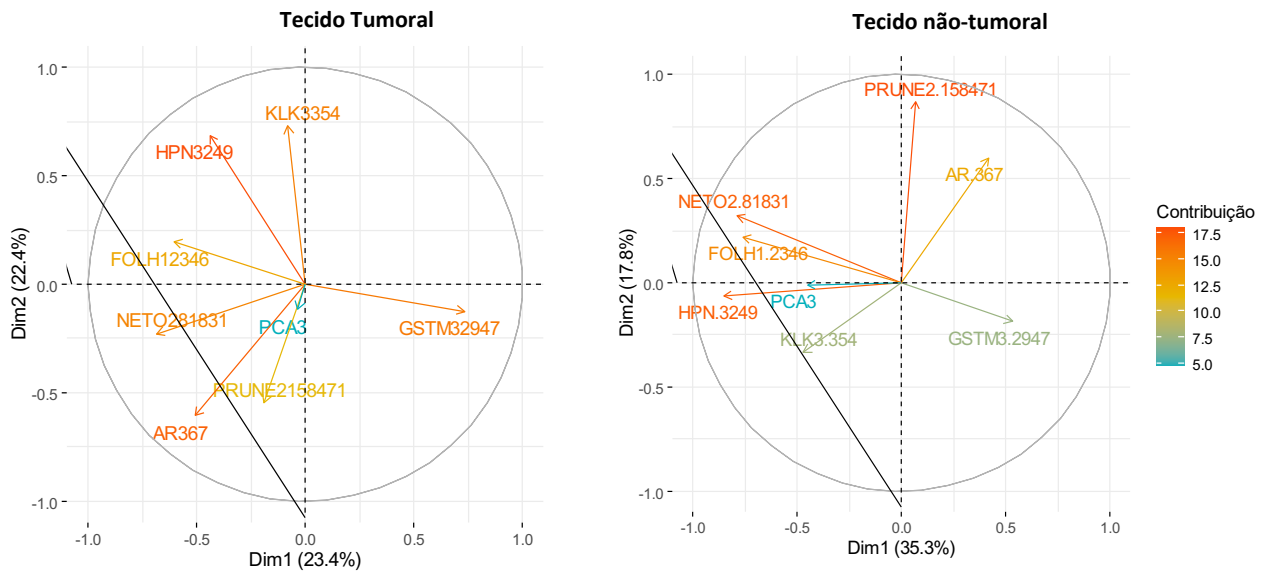
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPrism versão 9.0 (GraphPad Software, EUA). Primeiramente foi realizada a análise de componentes principais, a qual compara variáveis e determina a variabilidade de cada parte presente nos dados. Na pesquisa, a análise de componentes principais foi feita para determinar a contribuição de cada marcador. O teste Shapiro-Wilk foi conduzido para verificar a distribuição das amostras. As diferenças dos níveis transcricionais entre os grupos de estudo foram, então, estabelecidas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. O poder discriminatório foi estimado pela curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A área sob a curva (AUC) definiu a eficácia do marcador. Um limite de detecção foi estimado de acordo com as diferenças máximas entre os grupos em suas medianas e percentis. Esses limites foram utilizados para calcular os valores de *odds ratio* (OR). Em todas análises foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. Para determinar a correlação entre dois marcadores foi construída uma matriz de correlação linear, permitindo analisar a correlação dos dados dos marcadores e identificar padrões entre múltiplos marcadores ao mesmo tempo.

4. RESULTADOS

Para avaliar o perfil discriminatório dos marcadores, os dados do TCGA, disponíveis gratuitamente, foram, inicialmente, utilizados. Uma primeira análise de componentes principais (PCA) permitiu a identificação de padrões nos dados, relevando a contribuição de cada marcador para a condição do paciente (tumor ou não-tumor) (Figura 3). Considerando a escala de contribuição e o diagnóstico separadamente, observa-se que, nos tecidos com CaP, o marcador que menos contribuiu para essa condição foi o gene *PCA3*. Nos tecidos não-tumorais

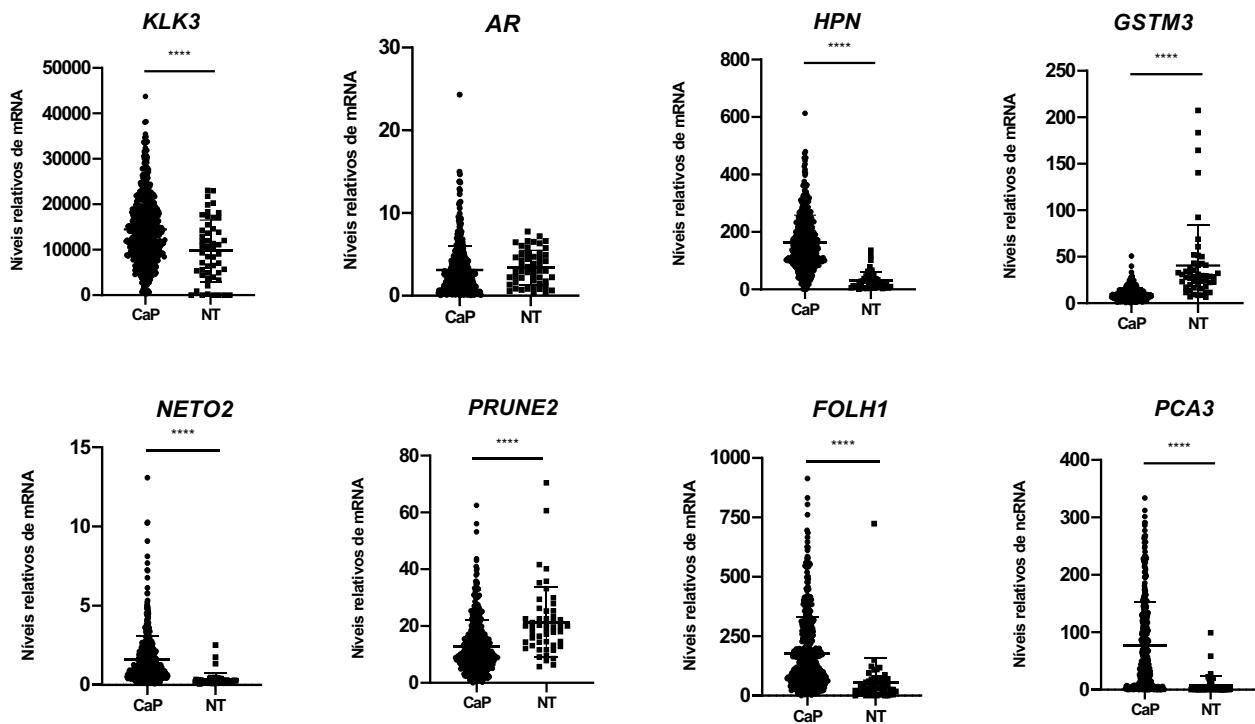
tanto *PCA3* quanto *KLK3* e *GSTM3* não se mostraram relevantes. Já os genes *HPN* e *NETO2* divergiram no comportamento entre as duas amostras, contribuindo de maneira expressiva para a determinação da condição das amostras.

Figura 3: Análise dos componentes principais para os níveis de expressão dos genes *KLK3*, *AR*, *GSTM3*, *NETO2*, *HPN*, *PRUNE2*, *FOLH1* e *PCA3* conforme dados obtidos do TCGA de amostras de tecido de pacientes com câncer de próstata e não tumoral adjacente.



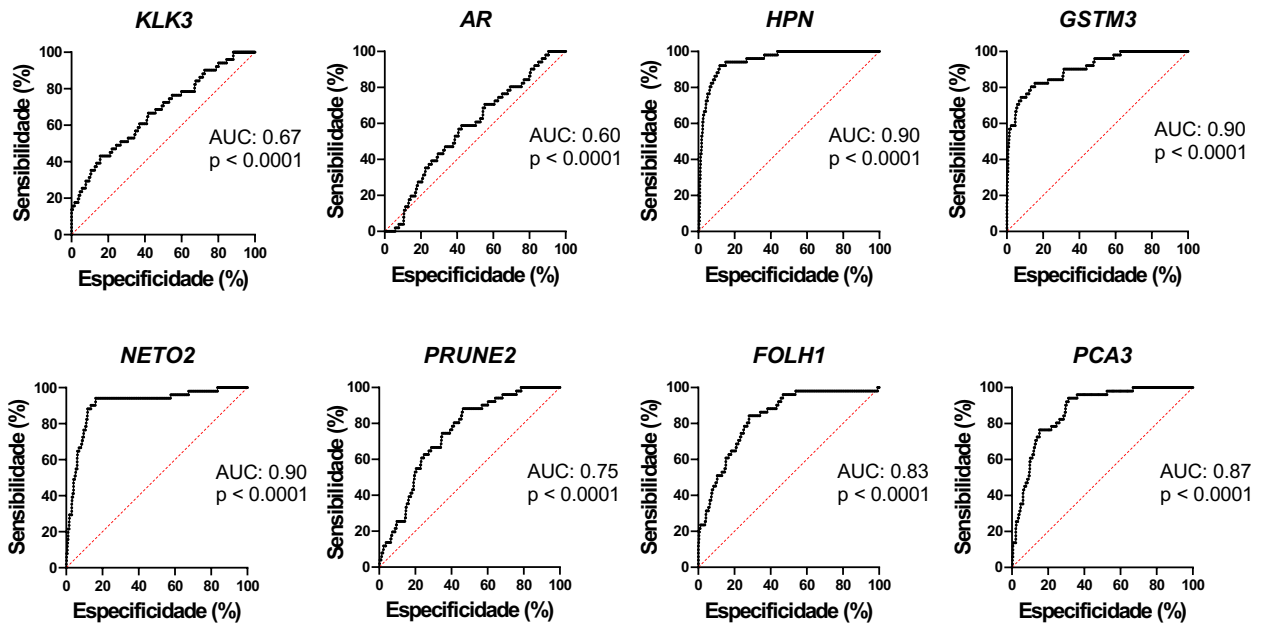
Posteriormente, os níveis de expressão dos marcadores foram comparados entre as duas amostras (tumoral e não-tumoral), a fim de se estabelecer o perfil diagnóstico de cada gene. Observou-se que somente os transcritos de *AR* não diferenciaram os tecidos (Figura 4). Além disso, apenas os níveis de mRNA de *GSTM3* em amostras de CaP apresentaram níveis reduzidos, enquanto os demais se mostraram superexpressos.

Figura 4: Níveis relativos dos transcritos dos genes *KLK3*, *AR*, *HPN*, *GSTM3*, *NETO2*, *PRUNE2*, *FOLH1* e *PCA3* em amostras de tecido com câncer de próstata (CaP) e não tumorais adjacentes (NT) obtidas do TCGA.



A curva ROC foi, então, gerada para avaliar a habilidade diagnóstica dos transcritos para CaP (Figura 5). Destacaram-se, nessa análise, os genes *HPN*, *GSTM3* e *NETO2*, todos com $AUC \geq 90$ ($p < 0,05$), indicando expressiva capacidade diagnóstica. Atualmente, os níveis séricos de PSA, codificados pelo gene *KLK3*, são utilizados na prática clínica, contudo, seus transcritos exibiram uma $AUC = 0,67$ ($p < 0,05$), o que não representa uma capacidade diagnóstica ideal para os grupos avaliados. Novamente, o *AR* foi o menos relevante, com $AUC = 0,60$ ($p < 0,05$). O potencial diagnóstico de *PCA3* também foi expressivo, com $AUC = 0,87$ ($p < 0,05$).

Figura 5: Curva ROC relativa aos níveis de expressão dos genes *KLK3*, *AR*, *HPN*, *GSTM3*, *NETO2*, *PRUNE2*, *FOLH1* e *PCA3* para avaliação diagnóstica de tecidos com câncer de próstata em relação ao não tumoral adjacente utilizando dados disponíveis no TCGA. A área sob a curva (AUC) também é apresentada.



Com o objetivo de compreender a relação entre dois marcadores simultaneamente, foi estabelecida uma matriz de correlação (Tabela 3). Essa análise permitiu investigar como as variáveis estão inter-relacionadas, analisando associações ou dependências entre os genes avaliados no estudo. Foram identificadas correlações significativas entre alguns dos marcadores, destacando padrões associados que podem ser relevantes para entender melhor o contexto biológico ou clínico do CaP. Notavelmente, foi observada correlação positiva entre os genes *KLK3* e *HPN* ($r = 0,3940$) e uma correlação negativa entre os genes *GSTM3* e *NETO2* ($r = -0,3045$).

Tabela 3: Matriz de correlação linear entre os transcritos dos genes *KLK3*, *AR*, *HPN*, *GSTM3*, *NETO2*, *PRUNE2*, *FOLH1* e *PCA3* utilizando dados do TCGA referentes a tecidos com câncer de próstata.

	<i>KLK3</i>	<i>AR</i>	<i>GSTM3</i>	<i>NETO2</i>	<i>HPN</i>	<i>PRUNE2</i>	<i>FOLH1</i>	<i>PCA3</i>	y
<i>KLK3</i>	1	-0,2336	-0,0308	-0,1858	0,3940	-0,1147	0,2383	-0,0646	-0,0039
<i>AR</i>	-0,2336	1	-0,2110	0,3253	-0,1608	0,3298	0,1455	0,0271	-0,0197
<i>GSTM3</i>	-0,0308	-0,2110	1	-0,3045	-0,3508	-0,0213	-0,2623	-0,0797	0,0085
<i>NETO2</i>	-0,1858	0,3253	-0,3045	1	0,1700	0,0748	0,2252	0,0131	0,0585
<i>HPN</i>	0,3940	-0,1608	-0,3508	0,1700	1	-0,2137	0,1711	-0,0238	-0,0009
<i>PRUNE2</i>	-0,1147	0,3298	-0,0213	0,0748	-0,2137	1	0,0632	0,0008	-0,0526
<i>FOLH1</i>	0,2383	0,1455	-0,2623	0,2252	0,1711	0,0632	1	-0,0621	-0,0117
<i>PCA3</i>	-0,0646	0,0271	-0,0797	0,0131	-0,0238	0,0008	-0,0621	1	-0,0843
y	-0,0039	-0,0197	0,0085	0,0585	-0,0009	-0,0526	-0,0117	-0,0843	1

Para os dados do TCGA, também foi calculado o OR para avaliar a associação entre a expressão dos genes *HPN*, *GSTM3*, *NETO2* e *PCA3* e o risco de CaP. Foram escolhidos apenas esses quatro genes em função dos valores de AUC, conforme Tabela 4. Inicialmente, foi estabelecido um limite de detecção (*cut-off*), categorizando as amostras. Os resultados mostraram dados estatisticamente significantes, com $p < 0,0001$, indicando que as variações na expressão desses genes não são aleatórias. Individualmente, o *HPN* foi o marcador cuja superexpressão aumentou de forma expressiva a chance de desenvolver a doença, com sensibilidade de 85,0%, especificidade de 94,1% e razão de verossimilhança de 14,4. Nas combinações dos marcadores, quando *HPN* foi associado ao *PCA3*, nenhum tecido não tumoral foi positivo. Adicionalmente, a alta expressão de *HPN* e *NETO2* foi fortemente associada a um aumento significativo no risco de CaP (OR = 163,2). Esses achados sugerem que os transcritos desses genes, especialmente de *HPN*, são potencialmente relevantes na análise de risco da doença.

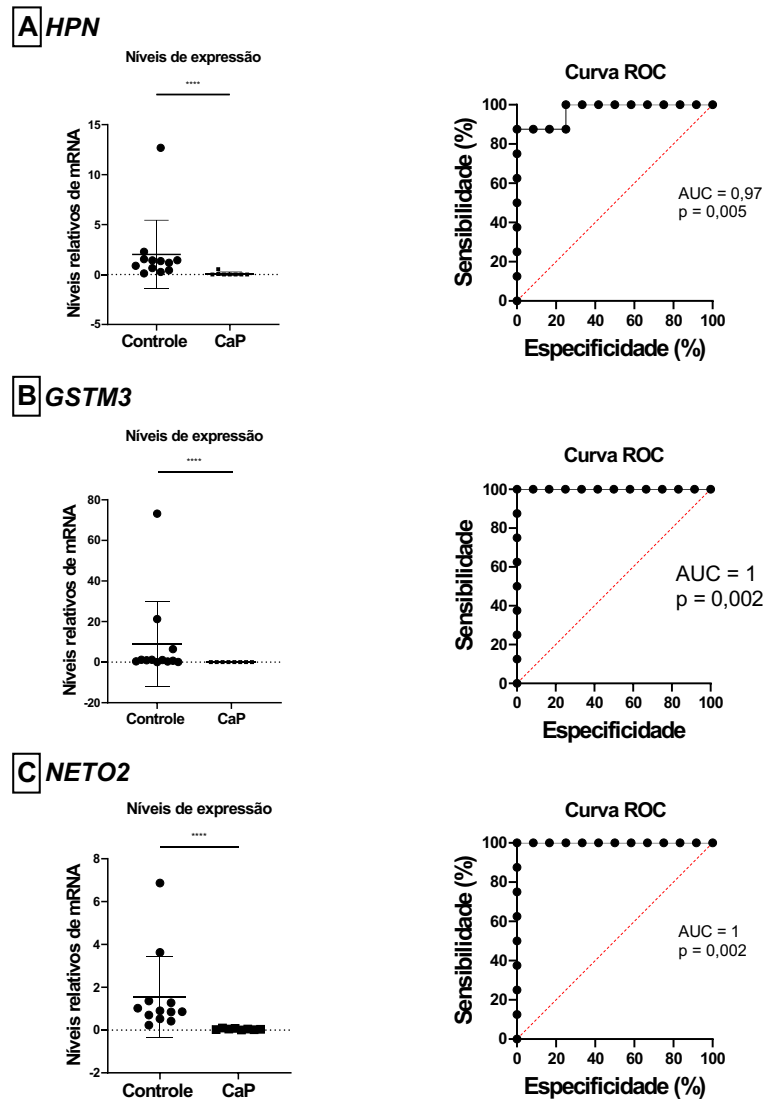
Tabela 4: Perfil diagnóstico dos transcritos dos genes *HPN*, *GSTM3*, *NETO2* e *PCA3* para o câncer de próstata utilizando dados do TCGA de tecidos tumorais e não-tumorais adjacentes.

Marcador molecular (cut-off)	Número de pacientes		Odds ratio	(95% CI)	p	RR	Sens. (%)	Espec. (%)	VPP (%)	VPN (%)	Probabilidade
	Tumor (%)	Não-tumor (%)									
<i>PCA3</i> (≥ 20.18)	264/375 (70.4)	5/51 (9.8)	21.9	8.606- 51.89	< 0.0001	1.4	70.4	90.2	98.1	29.3	7.2
<i>HPN</i> (≥ 78.51)	424/499 (85.0)	3/51 (6.0)	90.4	28.39- 280.6	< 0.0001	1.6	85.0	94.1	99.3	39.0	14.4
<i>GSTM3</i> (≤ 16.54)	434/499 (87.0)	10/51 (19.6)	27.4	13.14- 54.87	< 0.0001	1.6	87.0	80.4	97.8	38.7	4.4
<i>NETO2</i> (≥ 0.4404)	431/499 (86.4)	5/51 (9.8)	58.3	22.39- 138.5	< 0.0001	1.7	86.4	90.2	98.8	40.4	8.8
<i>PCA3+HPN</i>	226/375 (60.3)	0/51 (0.0)	ND	26.68- ∞	< 0.0001	1.3	60.3	100.0	100.0	25.5	ND
<i>PCA3+GSTM3</i>	228/375 (60.8)	2/51 (3.9)	38.0	10.23- 160.5	< 0.0001	1.3	60.8	96.1	99.1	25.0	15.5
<i>PCA3+NETO2</i>	229/375 (61.1)	1/51 (2.0)	78.4	14.05- 799.8	< 0.0001	1.3	61.1	98.0	99.6	25.5	31.14
<i>HPN+GSTM3</i>	376/499 (75.4)	2/51 (3.9)	74.9	20.17- 315.7	< 0.0001	1.4	75.4	96.1	99.5	28.5	19.2
<i>HPN+NETO2</i>	382/499 (76.6)	1/51 (2.0)	163.2	29.21- 1662	< 0.0001	1.4	76.6	98.0	99.7	30.0	39.0
<i>GSTM3+NETO2</i>	388/499 (77.8)	4/51 (7.8)	41.1	15.45- 107.9	< 0.0001	1.4	77.8	92.2	99.0	30.0	9.9

RR: risco relativo; Sens. (sensibilidade); Espec. (especificidade); VPP (valor preditivo positivo); VPN (valor preditivo negativo).

Por fim, foi extraído o RNA total de amostras de sangue de pacientes com CaP e voluntários saudáveis e conduzida a transcrição reversa seguida de ensaios de qPCR para a quantificação dos transcritos de *HPN*, *GSTM3* e *NETO2*, os mais relevantes nas análises com os dados de TCGA. Nas amostras de sangue e utilizando outra metodologia, todos os transcritos se mostraram superexpressos nos voluntários saudáveis, quando comparados aos indivíduos com CaP. Novamente, a AUC apresentou valores acima de 0,90, reiterando o potencial diagnóstico desses marcadores (Figura 6).

Figura 6: Padrão de expressão dos marcadores avaliado por qPCR em amostras de sangue de pacientes com câncer de próstata (CaP) e voluntários saudáveis (controle). (A) Transcritos do gene *HPN*. (B) Transcritos do gene *GSTM3*. (C) Transcritos do gene *NETO2*.



5. DISCUSSÃO

O CaP é uma doença maligna que atinge um expressivo número de homens em todo o mundo, apresentando um amplo espectro clínico, com casos tanto de evolução lenta quanto agressivamente letais. Os atuais métodos de diagnóstico são limitados, sendo o PSA o biomarcador mais amplamente utilizado, mas com apenas de 20 a 40% de acurácia. Nesse cenário, a descoberta de novos marcadores é necessária, pois permite uma melhor compreensão das características biológicas malignas do CaP que, quando integrados às ferramentas atuais, possibilitam um avanço na identificação de grupos de risco e orientam as decisões de tratamento

(CHEN, et al; 2023). Assim, o presente estudo objetivou estabelecer o perfil diagnóstico dos genes *KLK3*, *AR*, *HPN*, *GSTM3*, *NETO2*, *PRUNE2*, *FOLH1* e *PCA3* em amostras de tecido com CaP e não tumorais adjacentes obtidas de bancos de dados, validando os mais promissores em ensaios de qPCR a partir do RNA total extraído do sangue de pacientes com a doença e voluntários saudáveis.

Os genes *KLK3*, *AR*, *PRUNE2*, *FOLH1* e *PCA3* já são amplamente descritos na literatura científica. O *KLK3* codifica para o PSA, o qual é detectado no sangue para diagnóstico precoce e monitoramento da doença, com limitações, incluindo o risco de falsos negativos (LIN et al., 2021). Além disso, o uso indiscriminado de PSA pode levar ao sobrediagnóstico e tratamento de cânceres indolentes, os quais não causariam problemas ao longo da vida do paciente (LIN et al., 2020). O *AR* desempenha um papel fundamental na regulação do crescimento e diferenciação celular da próstata, alterando sua expressão e funcionamento no CaP. Nesse aspecto, é utilizado na gestão da doença, permitindo o ajuste de estratégias terapêuticas (CULIN e PUHR, 2024; ÖZTURAN et al., 2022). O *PRUNE2* é um gene supressor tumoral envolvido na regulação da proliferação celular no CaP, que, quando interage com o *PCA3*, tem sua sequência editada por adenosina desaminases (ADAR). No entanto, o diagnóstico baseado em *PRUNE2* enfrenta limitações, incluindo a complexidade da regulação com *PCA3*, a variabilidade de expressão entre os pacientes e tipos de células e a necessidade de técnicas avançadas para detecção e análise (SALAMEH, et al; 2015). O *PCA3*, por sua vez, além de guiar a edição de *PRUNE2*, é um lncRNA superexpresso em mais de 90% dos tumores prostáticos (DUFFY, 2020). Embora o *PCA3* tenha uma sensibilidade de 65% e uma especificidade de 73%, sua eficácia em prever a gravidade da doença é limitada (BOEHM et al., 2023) (DUFFY, 2020). Finalmente, O *FOLH1*, gene codificante para a proteína PSMA, possui papel terapêutico fundamental no CaP avançado, utilizado em exames de imagem (SAYAR et al., 2023). Entretanto, a expressão heterogênea de PSMA entre diferentes sítios metastáticos e dentro das próprias lesões pode comprometer a precisão diagnóstica, resultando em subestadiamento e falhas na detecção completa de todos os sítios tumorais (SAYAR et al., 2023).

O presente estudo partiu de dados disponíveis no TCGA, um projeto colaborativo de acesso aberto, com dados genômicos, transcriptômicos e epigenômicos de pacientes com câncer, que viabiliza uma investigação abrangente de perfis moleculares e o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais precisas e personalizadas (NATIONAL CENTER INSTITUTE, 2024). Foram utilizadas as informações relativas à expressão dos marcadores em tecido tumoral e não tumoral adjacente. Essa abordagem tem se mostrado

fundamental na compreensão do comportamento biológico de CaP, uma vez que amplia a avaliação para margens cirúrgicas, um aspecto crítico no manejo clínico de tumores sólidos, pois margens cirúrgicas positivas, caracterizadas pelas presenças das células malignas nas bordas do tecido removido, estão associadas a um aumento de risco de recorrência (BRANDY et al., 2021). Adicionalmente, a análise de níveis de expressão gênica é uma ferramenta poderosa na gestão de tumores, permitindo a personalização do tratamento e, potencialmente, melhorando os desfechos clínicos (BRANDY et al., 2021; GIAMPIERI et al., 2022).

Diante de tantos dados, foi, inicialmente, conduzida a análise de componentes principais, a qual revelou padrões distintos de expressão dos genes avaliados. Esta é uma técnica estatística multivariada amplamente utilizada na área da saúde, incluindo o estudo de dados de expressão gênica. O teste realiza a decomposição de um conjunto de variáveis correlacionadas em componentes principais, organizadas por ordem decrescente de variância. Esse tratamento não apenas reduz a dimensionalidade dos dados ao eliminar componentes menos importantes, mas também facilita o desenvolvimento de modelos e permite calcular a contribuição de cada fator nos dados coletados (ZHANG, 2023). Assim, nos resultados desse estudo, a análise proporcionou uma visão dos padrões subjacentes à quantificação dos transcritos, identificando a contribuição de cada marcador.

Para as condições analisadas, o gene *PCA3* foi o que menos contribuiu para o diagnóstico, apesar de ser um biomarcador valioso para o CaP, especialmente quando comparado com o PSA sérico e o exame de toque retal (BOEHM et al., 2023). Como a análise de componentes principais considera o comportamento dos marcadores em conjunto, sugerimos que a baixa relevância do *PCA3* tenha ocorrido quando considerado juntamente com os transcritos dos demais genes e, portanto, seja necessária sua análise separadamente, ou associados a poucos marcadores. Interessantemente, os genes *HPN* e *NETO2* apresentaram comportamentos distintos entre os tecidos tumorais e não-tumorais, destacando-se como importantes na determinação do estado do paciente. Essa divergência sugere que esses genes podem desempenhar papéis importantes nos mecanismos moleculares do CaP, influenciando diretamente o fenótipo da doença, especialmente no que diz respeito ao comprometimento de margens cirúrgicas. De fato, diferentes perfis de expressão gênica podem fornecer características específicas do tumor, permitindo a classificação do risco e planejamento de tratamento personalizado.

Os transcritos foram, então, comparados separadamente e apenas a expressão do gene *AR* não diferiu entre os grupos de estudo. De fato, a expressão da proteína AR exerce uma influência dinâmica complexa no microambiente estromal da próstata. Durante o

desenvolvimento normal, as células estromais exibem níveis elevados de AR, enquanto sua expressão nas células epiteliais é inicialmente mínima, aumentando conforme a progressão para o câncer. Já no avanço da doença, há uma redução gradual na expressão estromal de AR, especialmente em amostras metastáticas, correlacionando-se com um prognóstico desfavorável (SUN et al., 2021). Portanto, a análise apenas de seus transcritos não revela seu real papel desempenhado na doença. Além disso, o AR é um fator de transcrição que regula outros genes como *KLK2*, *KLK3* e *ACPP* (fosfatase ácida prostática), essenciais para a regulação hormonal e progressão do tumor, o que evidencia a necessidade de se avaliar genes *downstream* ao AR. Assim, quantificamos a expressão de *KLK3*, que diferiu entre os grupos, mas com potencial diagnóstico restrito conforme os dados da curva ROC. Esta é uma técnica utilizada para avaliar o desempenho de testes diagnósticos de forma binária. Permite visualizar como diferentes pontos de corte afetam a sensibilidade e especificidade, oferecendo uma avaliação abrangente de capacidade de um teste em distinguir entre resultados normais e anormais, independentemente da prevalência da doença na população estudada (NAHM, 2022).

Conforme os resultados aqui apresentados, a curva ROC para os dados do TCGA revelou eficácia diagnóstica dos transcritos dos *HPN*, *GSTM3* e *NETO2*, os quais demonstraram uma $AUC \geq 0,90$. A AUC quantifica a capacidade do teste diagnóstico em discriminar entre indivíduos com ou sem condição-alvo, variando de 0 a 1. Um valor de 1 indica performance perfeita, enquanto um valor 0,5 sugere uma performance semelhante ao acaso (SIMON et al., 2001). O *PCA3*, nesse momento avaliado individualmente, apresentou $AUC = 0,87$, como esperado diante de seu comportamento já descrito no CaP (MENSAH et al., 2022).

Paralelamente, foi realizado o teste de OR, o qual determina a força da associação entre um fator de risco ou exposição e um desfecho de interesse. Essa análise compara a probabilidade de um evento ocorrer em um grupo exposto versus um grupo não exposto. Um OR maior que 1 indica uma associação positiva, sugerindo que a exposição aumenta o risco do evento (SIMON, 2001). É uma ferramenta diagnóstica importante, pois além dos dados de sensibilidade e especificidade, apresenta informações sobre risco relativo, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e razão de verossimilhança. Notavelmente, a superexpressão dos transcritos dos genes *HPN*, *GSTM3*, *NETO2* e *PCA3* aumentou o risco de CaP, especialmente os genes *HPN* e *NETO2*. De fato, a sensibilidade de 85,0% e especificidade de 94,1% para *HPN* destacaram-se na avaliação da precisão diagnóstica. A alta sensibilidade indica a capacidade do teste de identificar corretamente os casos de CaP, enquanto a especificidade aponta sua habilidade em excluir corretamente indivíduos sem a doença. Esses valores resultam em um valor preditivo positivo (VPP) elevado, indicando que um resultado

positivo para *HPN* está fortemente associado à presença da doença. Por outro lado, a alta especificidade do *HPN* também contribui para um valor preditivo negativo (VPN) confiável, garantindo que um resultado negativo seja altamente indicativo da ausência da lesão, minimizando falsos positivos e reduzindo a necessidade de procedimentos invasivos adicionais, como biópsias. Importante salientar o OR de 163,2 para *HPN* e *NETO2*. Esse valor indica uma associação altamente significativa entre a superexpressão desses genes e o aumento do risco de CaP, sugerindo que a alta expressão de ambos aumenta substancialmente a chance de desenvolver a doença, evidenciando a importância dessa combinação de marcadores na busca de ferramentas mais robustas e aplicáveis na prática clínica.

Em estudo prévio e em consonância com nossos achados, Lu e colaboradores (2022) observaram que o *HPN* é superexpresso no CaP e associado a um tempo de sobrevivência mais curto na doença (LU et al., 2022). Koistinen e colaboradores (2023) também evidenciaram que o *HPN* se encontra superexpresso em células de CaP e associado com uma doença mais grave. Além disso, o *HPN* é regulado por androgênios, sugerindo sua possível aplicação como marcador preditivo de resposta a terapias hormonais (KOISTINEN et al., 2023). Quanto ao *NETO2*, estudos já publicados demonstraram um aumento significativo de sua expressão em amostras de CaP, também associada a estágios avançados da doença, maior invasão tumoral e pior prognóstico. Além disso, *NETO2* tem sido implicado na regulação de vias de sinalização celular chave, como Wnt, TGF- β , STAT, MAPK e PI3K-Akt, todas associadas à carcinogênese (FEDOROVA et al., 2020). Adicionalmente, Sun e colaboradores associou a expressão de transcritos de *NETO2* e outros genes e demonstrou uma capacidade robusta na predição da sobrevida livre de recidiva bioquímica em pacientes com CaP (SUN et al., 2021).

Finalmente, ensaios de qPCR foram realizados para os transcritos de *HPN*, *GSTM3* e *NETO2* em amostras de sangue de pacientes com CaP e voluntários saudáveis. A AUC, novamente, apresentou valores superiores a 0,90, reiterando a alta capacidade discriminatória dos marcadores estudados. O *GSTM3* tem demonstrado um papel multifacetado em diferentes tipos de câncer. Especificamente no CaP, o *GSTM3* foi associado a um aumento no risco da doença quando polimorfismos genéticos estão presentes (WANG et al; 2020).

Nossos resultados mostraram um perfil de expressão diferente entre os dados do TCGA e os de qPCR, com *HPN* e *NETO2* apresentando níveis reduzidos de expressão nos indivíduos com CaP quando analisados por qPCR. A principal diferença metodológica entre o TCGA e a qPCR reside nas amostras utilizadas e nas técnicas analíticas empregadas. O TCGA utiliza amostras de tecido tumoral, proporcionando uma visão direta e abrangente da expressão gênica associada à atividade na lesão e seu microambiente. Em contraste, na qPCR foram utilizadas

amostras de sangue, o que avalia a expressão de marcadores na presença de outras células e moléculas circulantes (RAJKUMAR et al., 2015). Assim, a qPCR fornece uma abordagem menos invasiva, mas potencialmente menos sensível. Além disso, enfrenta desafios ao processamento e degradação do material (FEDOROVA et al; 2020). Metodologicamente, o TCGA utiliza sequenciamento de RNA para fornecer uma visão abrangente da expressão gênica, capturando tanto transcritos abundantes quanto raros. Por outro lado, a qPCR foca em transcritos específicos, o que pode resultar em uma subestimação da expressão de biomarcadores de interesse. Contudo, nosso estudo é limitado quanto ao número de amostras analisadas por qPCR. Portanto, análises adicionais em diferentes cohorts são necessárias para validar os dados aqui apresentados.

6. CONCLUSÃO

Com o objetivo de delinear um perfil molecular diagnóstico para o CaP, o presente estudo utilizou dados do TCGA e identificou padrões de expressão gênica que diferem significativamente entre tecidos tumorais e não-tumorais, destacando-se os genes *HPN*, *GSTM3* e *NETO2*. A análise de componentes principais confirmou a importância desses genes na discriminação do estado clínico dos pacientes, enquanto a comparação de transcritos evidenciou sua relevância diagnóstica, com $AUC > 0,90$ na curva ROC. Esses resultados indicam que os genes possuem alta capacidade discriminatória. Além disso, a superexpressão dos transcritos de *HPN* e *NETO2* mostrou odds ratio elevado, evidenciando uma associação significativa com o aumento de risco de CaP. A combinação desses marcadores proporciona uma ferramenta robusta para a identificação de casos positivos, reduzindo a incidência de falsos positivos e falsos negativos. A implementação desses achados na prática clínica pode aprimorar significativamente a triagem e o diagnóstico precoce de CaP, oferecendo uma abordagem mais precisa e menos invasiva em comparação aos métodos tradicionais.

Em amostras de sangue de pacientes com CaP e voluntários saudáveis analisadas por qPCR, *HPN*, *GSTM3* e *NETO2* mantiveram sua capacidade discriminatória, mas com comportamento diferente comparado ao TCGA. Apesar da necessidade de análises adicionais de qPCR em cohort mais numerosa, a integração desses biomarcadores no protocolo

diagnóstico do CaP pode revolucionar a prática clínica. De fato, compreender essas associações pode ser fundamental para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas mais precisas, bem como para a identificação de alvos terapêuticos mais eficazes, alinhadas com as especificidades biológicas observadas.

Os resultados obtidos nesse estudo proporcionam uma maior compreensão do potencial diagnóstico dos marcadores moleculares investigados, o que não apenas enriquece nossa compreensão das interações entre os marcadores, mas também oferece *insights* importantes para futuras investigações clínicas. A análise detalhada desses marcadores pode potencialmente transformar a prática clínica, oferecendo novas estratégias para diagnóstico precoce, estratificação de risco e desenvolvimento de terapias mais personalizadas e eficazes para pacientes com CaP.

REFERÊNCIAS

- AHDOOT, M. *et al.* Contemporary treatments in prostate cancer focal therapy. **Current opinion in oncology**, v. 31, n. 3, p. 200–206, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6465079/> Acesso em: março de 2022
- ANDKHOIE, M.; MEYER, D.; SZAFRON, M. Factors underlying treatment decision-making for localized prostate cancer in the U.S. and Canada: A scoping review using principal component analysis. **Journal de l'Association des urologues du Canada [Canadian Urological Association journal]**, v. 13, n. 7, p. E220, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6667325/>. Acesso em outubro de 2023
- ARAGON-CHING, J.; NADER, R.; EL AMM, J. Role of chemotherapy in prostate cancer. **Asian journal of andrology**, v. 20, n. 3, p. 221, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5952475/>. Acesso em novembro de 2023.
- BABAJIDE, R. *et al.* Performance of prostate health index in biopsy naïve black men. **The journal of urology**, v. 205, n. 3, p. 718–724, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8320068/>. Acesso em: setembro de 2022.
- BARADHI, K. M. *et al.* Benign Prostatic Hyperplasia. **StatPearls Publishing**, 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558920/>. Acesso em outubro de 2022.
- BARATA, P. C.; SARTOR, A. O. Metastatic castration-sensitive prostate cancer: Abiraterone, docetaxel, or Cancer. **American Cancer Society**, v. 125, n. 11, p. 1777–1788, 2019. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.32039>. Acesso em: outubro de 2022.
- BARSOUK, A. *et al.* **Epidemiology, staging and management of prostate cancer. Medical sciences**, v. 8, n. 3, p. 28, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7565452/>. Acesso em: novembro de 2022.
- BJERRE, M. T. *et al.* Epigenetic analysis of circulating tumor DNA in localized and metastatic prostate cancer: Evaluation of clinical biomarker potential. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1362, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7349912/>. Acesso em: março de 2022.

BOEHM, B. E. *et al.* Biomarkers of aggressive prostate cancer at diagnosis. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 3, p. 2185, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9916581/>. Acesso em: setembro de 2022.

BOZGEYIK, E. *et al.* miR-19a and miR-421 target PCA3 long non-coding RNA and restore PRUNE2 tumor suppressor activity in prostate cancer. **Molecular biology reports**, v. 49, n. 7, p. 6803–6815, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34839449/>. Acesso em: novembro de 2023.

BRADY, L. *et al.* Inter- and intra-tumor heterogeneity of metastatic prostate cancer determined by digital spatial gene expression profiling. **Nature communications**, v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7930198/>. Acesso em: outubro de 2023.

BRAY, F. *et al.* Global Cancer Statistics: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancer in 185 countries. **American Cancer Society**, v. 68, n. 6, 2018. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21663>. Acesso em: janeiro de 2023.

BROWN, G. Oncogenes, proto-oncogenes, and lineage restriction of cancer stem cells. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 18, p. 9667, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8470404/>.

CARDOSO, M. *et al.* Exome sequencing of affected duos and trios uncovers PRUNE2 as a novel prostate cancer predisposition gene. **British journal of cancer**, v. 128, n. 6, p. 1077–1085, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10006409/>. Acesso em: março de 2024.

CARLSSON, S. V.; VICKERS, A. J. Screening for prostate cancer. **The Medical clinics of North America**, v. 104, n. 6, p. 1051–1062, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8287565/>. Acesso em: maio de 2024.

CHEN, J.-Y. *et al.* Biomarkers for prostate cancer: From diagnosis to treatment. **Diagnostics** v. 13, n. 21, p. 3350, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10649216/>. Acesso em: outubro de 2022.

CHEN, L.; LIU, S.; TAO, Y. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 5, n. 1, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7293209/>. Acesso em: novembro de 2022.

COSTA, G. J. *et al.* Tumor-node-metastasis staging and treatment patterns of 73,167 patients with lung cancer in Brazil. **Jornal brasileiro de pneumologia**: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, v. 46, n. 1, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/vdG7KT48XhB6DLjHGh5fZWm/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: novembro de 2022.

CRAWFORD, E. D. *et al.* Androgen-targeted therapy in men with prostate cancer: evolving practice and future considerations. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 22, n. 1, p. 24–38, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30131604/>. Acesso em: janeiro de 2023.

CULIG, Z.; PUHR, M.; *et al.* Androgen Receptor: interacting proteins in prostate cancer development and therapy resistance. **The American Journal of Pathology**, v. 194, n. 3, 2024. Disponível em: <https://ajp.amjpathol.org/action/showPdf?pii=S0002-9440%2823%2900461-3>. Acesso em: janeiro de 2022.

DANGELO, J. G; FATTINI, C. A. Anatomia humana sistêmica e segmentar. 3ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. Acesso em: outubro de 2022.

DARST, B. F. *et al.* The Four-Kallikrein Panel is Effective in Identifying Aggressive Prostate Cancer in a Multiethnic Population. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7334056/>. Outubro de 2023.

DE UROLOGIA, A. S. B. Câncer de Próstata: Marcadores Tumorais. Disponível em: <<https://www.saudedireta.com.br/docsupload/133132802709-CancerMar.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2024. Acesso em: fevereiro de 2024.

DIAO, B. *et al.* The use of 3D digital anatomy model improves the communication with patients presenting with prostate disease: The first experience in Senegal. **PloS one**, v. 17, n. 12, p. e0277397, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9714841/>. Acesso em julho de 2024.

DROST, F.-J. H. *et al.* Prostate MRI, with or without MRI-targeted biopsy, and systematic biopsy for detecting prostate cancer. **The Cochrane library**, v. 2019, n. 4, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6483565/>

DUFFY, M. J. Biomarkers for prostate cancer: prostate-specific antigen and beyond. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, v. 58, n. 3, p. 326–339, 2020. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2019-0693/html>. Acesso em: junho de 2024.

Estatísticas de câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 20 jul. 2024.

FANTI, S. *et al.* Consensus statements on PSMA PET/CT response assessment criteria in prostate cancer. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 48, n. 2, p. 469–476, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7835167/>

FEDOROVA, M. S. *et al.* NETO2 is deregulated in breast, prostate, and colorectal cancer and participates in cellular signaling. **Frontiers in genetics**, v. 11, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7758476/>. Acesso em: julho de 2024

FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. Entendendo os testes diagnósticos. Parte 1. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 43, n. 5, p. 330–330, [s.d.]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/rHy8WhCg5cWVWypdf4phDXj/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: agosto de 2023.

FERRO, M. *et al.* Biomarkers in localized prostate cancer. **Future oncology**, v. 12, n. 3, p. 399–411, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5549774/>. Acesso em: agosto de 2023.

GALLI, F. *et al.* N staging system: tumor-node-metastasis and future perspectives. **Translational gastroenterology and hepatology**, v. 2, p. 4–4, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5313289/>. Acesso em: novembro de 2023.

GIAMPIETRI, C. *et al.* Analysis of gene expression levels and their impact on survival in 31 cancer-types patients identifies novel prognostic markers and suggests unexplored immunotherapy treatment options in a wide range of malignancies. **Journal of translational medicine**, v. 20, n. 1, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9559014/>. Acesso em: julho de 2024.

GOULART, A. E. Impactos do silenciamento do RNA não codificante PCA3 em células de cancer de próstata. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, 2014. Acesso em: agosto de 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(11\)00127-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867411001279%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(11)00127-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867411001279%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: julho de 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(00\)81683-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400816839%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(00)81683-9?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867400816839%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: junho de 2022.

HENDRIKS, R. J. *et al.* Clinical use of the SelectMDx urinary-biomarker test with or without mpMRI in prostate cancer diagnosis: a prospective, multicenter study in biopsy-naïve men. **Prostate cancer and prostatic diseases**, v. 24, n. 4, p. 1110–1119, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8616754/>. Acesso em: maio de 2023.

HOLT, S. K. *et al.* Association of *hepsin* gene variants with prostate cancer risk and prognosis. **The prostate**, v. 70, n. 9, p. 1012–1019, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2875316/>. Acesso em: junho de 2023.

HONG, S. K. Kallikreins as biomarkers for prostate cancer. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3997884/>. Acesso em: junho de 2023.

HU, J.-R. *et al.* Cardiovascular effects of androgen deprivation therapy in prostate cancer: Contemporary meta-analyses. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 40, n. 3, p. e55, 2020. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7047549/>. Acesso em setembro de 2022.

HUANG, H. *et al.* The influence of lncRNAs on the prognosis of prostate cancer based on TCGA database. **Translational andrology and urology**, v. 10, n. 3, p. 1302–1313, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8039585/>. Acesso em: setembro de 2023.

ILIC, D. *et al.* Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test: a systematic review and meta-analysis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 362, p. k3519, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6283370/>. Acesso em: julho de 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Detecção precoce do câncer / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/deteccao-precoce-do-cancer.pdf>. Acesso em: fevereiro de 2023

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estatística de Câncer. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: maio de 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. 2022. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: maio de 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA..Estimativa 2023: incidência de câncer do Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: maio de 2024.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Programa Nacional de Controle de Câncer de Próstata. Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cancer_da_prostata.pdf. Acesso em: fevereiro de 2023

IRANZO, J.; MARTINCORENA, I.; KOONIN, E. V. Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 26, p. E6010, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6042135/>. Acesso em: agosto de 2022.

ITTMANN, M. Anatomy and histology of the human and Murine prostate. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 8, n. 5, p. a030346, 2018. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5932577/>. Acesso em: julho de 2023.

JANG, J. H. Principal component analysis of hybrid functional and vector data. **Statistics in medicine**, v. 40, n. 24, p. 5152–5173, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9084921/>. Acesso em: fevereiro de 2024.

JAROSZ-BIEJ, M. *et al.* Tumor microenvironment as A “game changer” in cancer radiotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 13, p. 3212, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6650939/>. Acesso em: janeiro de 2024.

JUNG, J. *et al.* Increased HOXC6 mRNA expression is a novel biomarker of gastric cancer. **PloS one**, v. 15, n. 8, p. e0236811, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7398522/>. Acesso em outubro de 2022.

JUNG, J. H. *et al.* Primary cryotherapy for localized or locally advanced prostate cancer. **The Cochrane library**, v. 2018, n. 5, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6494517/>. Acesso em: janeiro de 2023.

KAISER, A. *et al.* The evolving role of diet in prostate cancer risk and progression. **Current opinion in oncology**, v. 31, n. 3, p. 222–229, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7379157/>. Acesso em: novembro de 2022.

KOHAAR, I.; PETROVICS, G.; SRIVASTAVA, S. A rich array of prostate cancer molecular biomarkers: Opportunities and challenges. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 8, p. 1813, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6515282/>. Acesso em: fevereiro de 2023.

KUMAR, V. *et al.* Spatial profiling of the prostate cancer tumor microenvironment reveals multiple differences in gene expression and correlation with recurrence risk. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4923, 2022. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9562240/>. Acesso em: maio de 2022.

LAUER, R. C. *et al.* Dysregulation of the PRUNE2/PCA3 genetic axis in human prostate cancer: from experimental discovery to validation in two independent patient cohorts. **eLife**, v. 12, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9886275/>. Acesso em: fevereiro de 2023.

LEE, J. *et al.* Covariate-specific ROC curve analysis can accommodate differences between covariate subgroups in the evaluation of diagnostic accuracy. **Journal of clinical epidemiology**, v. 160, p. 14–23, 2023. Disponível em: [https://www.jclinepi.com/article/S0895-4356\(23\)00142-7/fulltext](https://www.jclinepi.com/article/S0895-4356(23)00142-7/fulltext). Acesso em: março de 2024.

LESLIE, S. W. *et al.* Prostate cancer: Advancements in the pathogenesis, diagnosis and personalized therapy. 1. ed. Cham, Switzerland: **Springer International Publishing**, 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470550/>. Acesso em: fevereiro de 2023.

LI, H. *et al.* Association of gene polymorphisms of KLK3 and prostate cancer: A meta-analysis. **Advances in clinical and experimental medicine**: official organ Wroclaw Medical University, v. 29, n. 8, p. 1001–1009, 2020. Disponível em: <https://advances.umw.edu.pl/pdf/2020/29/8/1001.pdf>. Acesso em: agosto de 2023.

LI, R. *et al.* Hepsin promotes epithelial–mesenchymal transition and cell invasion through the miR-222/PPP2R2A/AKT axis in prostate cancer. **OncoTargets and therapy**, v. 13, p. 12141–12149, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7701367/>. Acesso em: agosto de 2022.

LIN, H.-Y. *et al.* KLK3 SNP–SNP interactions for prediction of prostate cancer aggressiveness. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8084951/>. Acesso em: agosto de 2023.

LU, L. *et al.* Clinical significance of hepsin and underlying signaling pathways in prostate cancer. **Biomolecules**, v. 12, n. 2, p. 203, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8961580/>. Acesso em: setembro de 2023.

LUO, Z.; FARNHAM, P. J. Genome-wide analysis of HOXC4 and HOXC6 regulated genes and binding sites in prostate cancer cells. **PloS one**, v. 15, n. 2, p. e0228590, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6996832/>. Acesso em: setembro de 2023.

MARTINS, T. D. *et al.* Principal component analysis on recurrent venous thromboembolism. **Clinical and applied thrombosis/hemostasis**, v. 25, p. 107602961989532, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7058370/>. Acesso em: junho de 2024.

MATUSZCZAK, M.; SCHALKEN, J. A.; SALAGIERSKI, M. Prostate cancer liquid biopsy biomarkers' clinical utility in diagnosis and prognosis. **Cancers**, v. 13, n. 13, p. 3373, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8268859/>. Acesso em: novembro de 2022.

MENSAH, B. O; *et al.* Urinary PCA3 a superior diagnostic biomarker for prostate cancer among Ghanaian men. **Disease markers**, v. 2022, p. 1–10, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9568348/>. Acesso em: julho de 2024.

MOREIRA, J. *et al.* Systematic review on the applicability of principal component analysis for the study of movement in the older adult population. **Sensors**, v. 23, n. 1, p. 205, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9823400/>. Acesso em: abril de 2024.

MORTAZAVI, A. *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature methods**, v. 5, n. 7, p. 621–628, 2008. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nmeth.1226>. Acesso em: janeiro de 2024.

NAHM, F. S. Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians. **Korean journal of anesthesiology**, v. 75, n. 1, p. 25–36, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8831439/>. Acesso em: fevereiro de 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diagnóstico de laboratório de enfermidades infecciosas: princípios e prática. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789243514594>. Acesso em novembro de 2023.

ÖZTURAN, D.; MOROVA, T.; LACK, N. A. Androgen receptor-mediated transcription in prostate cancer. **Cells**, v. 11, n. 5, p. 898, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35269520/>. Acesso em junho de 2024.

PERDANA, N. R. *et al.* The risk factors of prostate cancer and its prevention: A literature review. Disponível em: <http://www.inaactamedica.org/archives/2016/27840359.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2024. Acesso em: janeiro de 2023.

RAJKUMAR, A. P. *et al.* Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4515013/>. Acesso em setembro de 2023.

RITCH, C.; COOKSON, M. Recent trends in the management of advanced prostate cancer. **F1000Research**, v. 7, p. 1513, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30345007>. Acesso em: novembro de 2022.

SALAMEH, A. *et al.* PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA *PCA3*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 27, p. 8403–8408, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4500257/>. Acesso em: janeiro de 2024.

SALCICCIA, S. *et al.* Biomarkers in prostate cancer diagnosis: From current knowledge to the role of metabolomics and exosomes. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 4367, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8122596/>. Acesso em: outubro de 2023.

SAOUD, R. *et al.* Incorporating prognostic biomarkers into risk assessment models and TNM staging for prostate cancer. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2116, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7564222/>. Acesso em: fevereiro de 2023.

SAYAR, E. *et al.* Reversible epigenetic alterations mediate PSMA expression heterogeneity in advanced metastatic prostate cancer. **JCI insight**, v. 8, n. 7, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10132157/>. Acesso em: maio de 2024.

SENGA, S. S.; GROSE, R. P. Hallmarks of cancer—the new testament. **Open biology**, v. 11, n. 1, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7881179/>. Acesso em: outubro de 2022.

SHEEHAN, B. *et al.* Prostate-specific membrane antigen biology in lethal prostate cancer and its therapeutic implications. **European urology focus**, v. 8, n. 5, p. 1157–1168, 2022.

Disponível em: [https://www.eu-focus.europeanurology.com/article/S2405-4569\(21\)00168-1/fulltext](https://www.eu-focus.europeanurology.com/article/S2405-4569(21)00168-1/fulltext). Acesso em: novembro de 2023.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2021. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, 2021. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21654>. Acesso em: fevereiro de 2022.

SIEGEL, R. L. *et al.* Cancer statistics, 2022. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 72, n. 1, p. 7–33, 2022. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21708>. Acesso em: fevereiro de 2022.

SIEGEL, R. L.; *et al.* Cancer Statistics, 2028. **CA Cancer Journal Clinic**. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.32039>.

SIMON, S. D. Understanding the odds ratio and the relative risk. **Journal of andrology**, v. 22, n. 4, p. 533–536, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11451349/>. Acesso em: fevereiro de 2024.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. Câncer de Próstata: Marcadores tumorais. 23 de jun de 2006. Disponível em: <https://www.saudedireta.com.br/docsupload/133132802709-CancerMar.pdf>. Acesso em: janeiro de 2023.

STARK, J. R. *et al.* Gleason score and lethal prostate cancer: Does $3 + 4 = 4 + 3$? **Journal of clinical oncology**: official journal of the American Society of Clinical Oncology, v. 27, n. 21, p. 3459–3464, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2717753/>. Acesso em: janeiro de 2023.

SUN, Z. *et al.* Identification of ARHGEF38, NETO2, GOLM1, and SAPCD2 associated with prostate cancer progression by bioinformatic analysis and experimental validation. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8440839/>. Acesso em: novembro de 2022.

SUNG, H.; *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**. 2021. 71:209–249. Acesso em: outubro de 2022.

TAN, G.-G. *et al.* miR-184 delays cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by directly suppressing DLX1. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 22, n. 4, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8393589/>. Acesso em: outubro de 2022.

The Cancer Genome Atlas program (TCGA). Disponível em: <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>. Acesso em: fevereiro de 2024.

TIAN, Y. *et al.* Prostatic Anatomical Parameters Correlate with Clinical Characteristics Suggestive of Benign Prostatic Hyperplasia. **Asian Journal of Andrology**, v. 23, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7831844/>. Acesso em: agosto de 2022.

TIMAR, J.; KASHOFER, K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 39, n. 4, p. 1029–1038, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7680318/>. Acesso em: outubro de 2022.

TRACEY, A. T. *et al.* Focal therapy for primary and salvage prostate cancer treatment: a narrative review. **Translational andrology and urology**, v. 10, n. 7, p. 3144–3154, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8350247/>. Acesso em: outubro de 2023.

TRACEY, A. T. *et al.* Focal therapy for primary and salvage prostate cancer treatment: a narrative review. **Translational andrology and urology**, v. 10, n. 7, p. 3144–3154, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8350247/>. Acesso em: novembro de 2023.

TUCCI, M. *et al.* Hormonal treatment and quality of life of prostate cancer patients: new evidence. **Minerva urology and nephrology**, v. 70, n. 2, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29241313/>. Acesso em novembro de 2023.

UHR, A. *et al.* An Overview of Biomarkers in the Diagnosis and Management of Prostate Cancer. **The Canadian Journal of Urology**, v. 27, n. 43, 2020. Disponível em: <https://www.canjurol.com/abstract.php?ArticleID=&version=1.0&PMID=32875999>. Acesso em: novembro de 2022.

UIJEN, M. J. M. *et al.* PSMA radioligand therapy for solid tumors other than prostate cancer: background, opportunities, challenges, and first clinical reports. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 48, n. 13, p. 4350–4368, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8566635/>. Acesso em: novembro de 2023.

VAN LEENDERS, G. J. L. H.; VERHOEF, E. I.; HOLLEMANS, E. Prostate cancer growth patterns beyond the Gleason score: entering a new era of comprehensive tumour grading. **Histopathology**, v. 77, n. 6, p. 850–861, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7756302/>. Acesso em: novembro de 2023.

WAHAB, N. A. *et al.* Silencing of hepsin and inosine 5-monophosphate dehydrogenase 2 by siRNA reduces prostate cancer cells proliferation. **Malays J Pathol** Disponível em: <http://www.mjpath.org.my/2022/v44n1/prostate-cancer.pdf>. Acesso em: outubro. 2020.

WANG, S. *et al.* GSTM3 function and polymorphism in cancer: Emerging but promising. *Cancer management and research*, v. 12, p. 10377–10388, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33116892/>. Acesso em: janeiro de 2024.

WANG, Z. *et al.* Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer. **Molecular medicine reports**, v. 16, n. 4, p. 5450–5458, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5647090/>. Acesso em: novembro de 2022.

WATANABE, R. *et al.* Spatial gene expression analysis reveals characteristic gene expression patterns of DE Novo neuroendocrine prostate cancer coexisting with androgen receptor pathway prostate cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 10, p. 8955, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10219300/>. Acesso em: outubro de 2023.

WEBSITE, N. H. S. **NHS screening**. Disponível em: <https://www.nhs.uk/conditions/nhs-screening/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

XIA, S.-J. *et al.* Prostatic anatomical parameters correlate with clinical characteristics suggestive of benign prostatic hyperplasia. **Asian journal of andrology**, v. 23, n. 1, p. 64, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7831844/>. Acesso em: fevereiro de 2023.

XU, J.-C. *et al.* NETO2 promotes esophageal cancer progression by inducing proliferation and metastasis via PI3K/AKT and ERK pathway. **International journal of biological sciences**, v. 17, n. 1, p. 259–270, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33390848/>. Acesso em: novembro de 2023.

YAMKAMON, V. *et al.* Urinary PCA3 detection in prostate cancer by magnetic nanoparticles coupled with colorimetric enzyme-linked oligonucleotide assay. **EXCLI Journal** **fADo - Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.17179/EXCLI2020-1036>. Acesso em: julho de 2023.

YAMOAH, K. *et al.* *TMPRSS2-ERG* fusion impacts anterior tumor location in men with prostate cancer. **The prostate**, v. 81, n. 2, p. 109–117, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7810127/>. Acesso em novembro de 2022.

ZHANG, J. *et al.* Interpretable principal component analysis for multilevel multivariate functional data. **Biostatistics** v. 24, n. 2, p. 227–243, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10102903/>. Acesso em: junho de 2024.