

**A.C. CAMARGO CANCER CENTER
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE**

LUCAS FORNAZIERI

**AVALIAÇÃO PROTEÔMICA DA URINA PÓS-EJACULATÓRIA E
SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DO PAINEL GÊNICO ONCOMINE
FOCUS FUSION PANEL PARA IDENTIFICAÇÃO DA FUSÃO TMPRSS2-ERG EM
PACIENTES SUSPEITOS PARA CÂNCER DE PRÓSTATA**

Tese de Doutorado, apresentada à Fundação Antônio Prudente como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde. Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Stênio de Cássio Zequi

Co-orientadora: Giovana Tardin Torrezan

**São Paulo
2025**

FICHA CATALOGRÁFICA

Fornazieri, Lucas.

Avaliação proteômica da urina pós-ejaculatória e sequenciamento de nova geração do painel gênico oncomine focus fusion panel para identificação da fusão TMPRSS2-ERG em pacientes suspeitos para câncer de próstata. / Lucas Fornazieri. São Paulo, 2025.

90f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Stênio de Cássio Zequi.

1. Câncer de próstata, 2. Proteômica, 3. TMPRSS2-ERG

CDU 616

Elaboração eletrônica pela Biblioteca A.C.Camargo - Fundação Antônio Prudente.

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

DEDICATÓRIA

À Carolina, pelo amor, pela leveza no dia a dia e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos dessa trajetória.

Aos meus amados pais e irmãos — Alberto, Marineide, Marco e Vinícius — pelos exemplos de integridade, afeto e dedicação que moldaram quem sou.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Stênio de Cássio Zequi, meu orientador e chefe do Centro de Referência em Tumores Urológicos do A.C. Camargo Cancer Center, pelos ensinamentos valiosos e, sobretudo, pelo exemplo de dedicação à prática clínica, à pesquisa e à formação de profissionais. Sua confiança e apoio constante foram essenciais para a concretização deste projeto e para meu amadurecimento acadêmico.

À Dra. Giovana Tardin Torrezan, Pesquisadora Científica do Grupo de Genômica e Biologia Molecular do Centro Internacional de Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center e co-orientadora deste trabalho, pela orientação precisa, dedicação e expertise determinante para a condução das análises genômicas.

À Dra. Paula Intasqui Lopes, Orientadora Permanente e Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Medicina da UNIFESP, pela dedicação, paciência e generosidade com que compartilhou seu conhecimento.

À Prof.^a Dra. Graziella Eliza Ronsein, Professora Associada do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela contribuição essencial no acesso à infraestrutura e na condução das análises proteômicas.

Ao Dr. Giuseppe Leite, pela excelência nas análises estatísticas e pela prontidão em compartilhar seu conhecimento de forma clara e acessível.

À Dra. Fernanda Orellana, parceira de pós-graduação, por sua presença generosa em todas as etapas da jornada, por dividir comigo os desafios, as dúvidas e as conquistas desta jornada.

Ao Dr. Maurício Murce, parceiro profissional e amigo leal, por ser exemplo de ética e responsabilidade no exercício da medicina, além de referência de integridade e dedicação à família.

Aos colegas urologistas com quem compartilho o dia a dia no A.C. Camargo Cancer Center — Dr. Rodrigo Madeira, Dr. Walter da Costa, Dr. Thiago Santana, Dr. Éder Brazão, Dr. Victor Espinheira, Dr. Thiago Mourão, Dr. Jayme Nobre, Dr. Rafael Zanotti, Dr. Daniel Coser, Dr. Plínio Pinto, Dr. Bruno Lebani e Dr. Felipe Glina — pela parceria, pelo apoio constante e por contribuírem para um ambiente profissional leve e colaborativo.

A todos os colegas do Centro de Referência em Tumores Urológicos do A.C. Camargo Cancer Center — oncologistas clínicos, radioterapeutas, patologistas, radiologistas, médicos nucleares, enfermeiros e demais profissionais da equipe multiprofissional — pela convivência diária e colaboração imprescindível.

À enfermeira de pesquisa Cássia da Silva, pela dedicação, organização e generosidade ao colaborar com a coleta de dados clínicos e com as demandas administrativas deste projeto.

A todos os pacientes que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa e confiaram em mim para seu cuidado. São eles a verdadeira razão de nossos esforços em prol do avanço científico, e é com gratidão e respeito que dedico a eles cada resultado aqui apresentado.

RESUMO

Fornazier, L. **[Avaliação Proteômica da Urina Pós-Ejaculatória e Sequenciamento de Nova Geração do Painel Gênico Oncomine Focus Fusion Panel para Identificação da Fusão TMPRSS2-ERG em Pacientes Suspeitos para Câncer de Próstata]**. [Tese – Doutorado] São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2025.

INTRODUÇÃO: O câncer de próstata é uma neoplasia de alta prevalência e com comportamento clínico heterogêneo. As estratégias diagnósticas atualmente utilizadas apresentam limitações em sensibilidade e especificidade, o que pode resultar na realização de procedimentos diagnósticos desnecessários e no tratamento de neoplasias indolentes. Nesse contexto, a identificação de biomarcadores moleculares com maior acurácia diagnóstica e valor prognóstico tem sido alvo de intensa investigação. A análise proteômica e transcriptômica de matrizes biológicas representa uma abordagem promissora nesse campo. A urina pós-ejaculatória, por conter secreções originadas de múltiplas zonas prostáticas e componentes seminais, configura-se como uma matriz potencialmente mais representativa do microambiente tumoral. Com base nessa hipótese, este estudo empregou a urina pós-ejaculatória como matriz para investigação molecular em pacientes com suspeita clínica de CP.

MATERIAIS E MÉTODOS: Foram analisadas 46 amostras de urina pós-ejaculatória por espectrometria de massas com aquisição dependente de dados (LC-MS/MS DDA): 24 de pacientes com biópsia positiva para CP (CP+), 15 com biópsia negativa (CP-) e 7 controles. Em paralelo, foi realizada a análise da fusão gênica TMPRSS2-ERG por sequenciamento de nova geração (NGS) com o painel Oncomine Focus Fusion, em amostras pareadas de urina e tecido prostático de 26 pacientes com CP confirmado.

RESULTADOS: Foram identificadas 51 proteínas diferencialmente abundantes entre CP+ e controles, 28 entre CP+ e CP-, e 51 entre tumores ISUP ≥ 2 e ISUP 1. Na comparação entre grupos de risco clínico alto/intermediário-desfavorável versus baixo risco, foram observadas 114 proteínas diferencialmente abundantes. As

análises funcionais revelaram enriquecimento de vias associadas à inflamação, remodelamento da matriz extracelular e sinalização intracelular. A análise por NGS demonstrou viabilidade técnica na urina pós-ejaculatória, com detecção da fusão TMPRSS2-ERG em 43% das amostras com RNA viável, e concordância perfeita com o tecido prostático nas amostras pareadas ($\kappa = 1,0$).

CONCLUSÃO: A análise integrada de dados proteômicos e transcriptômicos obtidos a partir da urina pós-ejaculatória demonstrou potencial para caracterização não invasiva de alterações funcionais associadas ao câncer de próstata. A matriz utilizada se mostrou promissora como fonte de biomarcadores, refletindo aspectos relevantes da biologia tumoral prostática, com viabilidade técnica para aplicações futuras em estratégias de diagnóstico e estratificação da doença.

PALAVRAS CHAVE: Câncer de próstata. Proteômica. TMPRSS2-ERG. Sequenciamento de nova geração. Urina pós-ejaculatória.

ABSTRACT

Fornazieri, L. **[Proteomic Analysis of Post-Ejaculatory Urine and Next-Generation Sequencing Using the Oncomine Focus Fusion Panel for Detection of TMPRSS2–ERG Fusion in Patients Suspected of Prostate Cancer]**. [Doctoral Thesis] São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2025.

Introduction: Prostate cancer is a highly prevalent malignancy with heterogeneous clinical behavior. Current diagnostic strategies present limited sensitivity and specificity, which may lead to unnecessary diagnostic procedures and overtreatment of indolent tumors. In this context, the identification of molecular biomarkers with greater diagnostic accuracy and prognostic value has been the focus of intense investigation. Proteomic and transcriptomic analyses of biological matrices represent a promising approach in this field. Post-ejaculatory urine, due to its content of secretions originating from multiple prostatic zones and seminal components, is considered a potentially more representative matrix of the prostatic tumor microenvironment. Based on this premise, the present study employed post-ejaculatory urine as the matrix for molecular investigation in patients with clinical suspicion of PCa.

Materials and Methods: A total of 46 post-ejaculatory urine samples were analyzed by data-dependent acquisition mass spectrometry (LC-MS/MS DDA): 24 from patients with biopsy-confirmed PCa (PCa+), 15 with negative biopsy (PCa–), and 7 from asymptomatic controls. In parallel, TMPRSS2–ERG gene fusion analysis was performed by next-generation sequencing (NGS) using the Oncomine Focus Fusion Panel, in paired urine and prostate tissue samples from 26 patients with confirmed PCa.

Results: A total of 51 differentially abundant proteins were identified between PCa+ and control samples, 28 between PCa+ and PCa–, and 51 between ISUP grade ≥ 2 and ISUP 1 tumors. In the comparison between high/intermediate-unfavorable and low clinical risk groups, 114 differentially abundant proteins were observed. Functional annotation analyses revealed enrichment of pathways related to inflammation, extracellular matrix remodeling, and intracellular signaling. NGS analysis demonstrated technical feasibility in post-ejaculatory urine, with TMPRSS2–ERG detection in 43% of samples with viable RNA and perfect concordance with

prostate tissue results in paired samples ($\kappa = 1.0$).

Conclusion: The integrated proteomic and transcriptomic analysis of post-ejaculatory urine demonstrated its potential for the non-invasive characterization of functional alterations associated with prostate cancer. This matrix proved to be a promising source of biomarkers, reflecting relevant aspects of prostatic tumor biology, with technical feasibility for future applications in diagnostic and prognostic stratification strategies.

Keywords: Prostate cancer. Proteomics. TMPRSS2–ERG. Next-generation sequencing. Post-ejaculatory urine.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 - Alterações Proteômicas nos Grupos com Biópsia Positiva, Biópsia Negativa e Controle	43
Figure 2 - Alterações Proteômicas e Funcionais no Câncer de Próstata Clinicamente Significativo (ISUP ≥ 2) vs. Clinicamente Insignificante (ISUP 1).....	44
Figure 3 - Alterações Proteômicas em Casos com Biópsia Positiva Estratificados por Grupo de Risco	47
Figure 4 - Redes de Interação Proteína-Proteína nos Grupos de Risco do Câncer de Próstata.....	48
Figure 5 - Efetividade da análise da fusão TMPRSS2–ERG em amostras de urina pós-ejaculatória, segundo o grau ISUP	50
Figure 6 - Detecção da fusão gênica TMPRSS2–ERG por NGS segundo o grau ISUP.....	51

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Características clínicas, demográficas e exames de imagem dos pacientes controles, com biópsia positiva e negativa	41
Table 2 - Características Clínicas, de Imagem e Histopatológicas dos Pacientes com Biópsia Positiva Estratificados por Grupo de Risco de D'Amico	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCCC	A.C. Camargo Cancer Center
BP	Biópsia de próstata
cfDNA	DNA livre de células
CP	Câncer de próstata
CP+	Biópsia de próstata positiva
CP-	Biópsia de próstata negativa
DAPs	Proteínas diferencialmente abundantes
EDR	Exame dígito retal
EG	Escore de Gleason
ERG	<i>ETS-related gene</i>
ERSPC	<i>European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDR	Taxa de descoberta falsa
FFPE	Tecido fixado em formalina e emblocado em parafina
GO	Ontologia genética
HPB	Hiperplasia prostática benigna
IQR	Intervalo interquartil
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
MPS	<i>MyProstateScore</i>
MPS2	<i>MyProstateScore 2.0</i>
MS	Espectrometria de massas
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NGS	Sequenciamento de nova geração
PCA3	Antígeno prostático 3
PC	Câncer de próstata
PHI	Índice de saúde da próstata
PI-RADS	<i>Prostate Imaging-Reporting and Data System</i>
PPI	Rede de interação proteína–proteína
PSA	Antígeno prostático específico
PSAD	Densidade do PSA (<i>PSA Density</i>)
RMP	Ressonância magnética multiparamétrica

STHLM3	Modelo de risco Stockholm-3
TMPRSS2	Protease transmembrana de serina 2
TNM	Classificação de tumores malignos (<i>Tumor, Node, Metastasis</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 CÂNCER DE PRÓSTATA	15
1.1.1 <i>Etiopatogenia e Anatomia patológica</i>	16
1.1.2 <i>Classificação e estadiamento</i>	16
1.1.3 <i>Diagnóstico</i>	17
1.1.4 <i>Tratamento</i>	18
1.2 BIOMARCADORES DO CÂNCER DE PRÓSTATA	18
1.2.1 <i>Antígeno prostático específico</i>	18
1.2.2 <i>Novos testes</i>	20
1.2.3 <i>Marcadores séricos</i>	20
1.2.4 <i>Marcadores urinários</i>	21
1.2.5 <i>Marcadores seminais</i>	24
1.3 AVALIAÇÃO PROTEÔMICA	25
1.4 JUSTIFICATIVA DO PROJETO	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	29
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	29
3.2.1 <i>Grupo suspeito para câncer de próstata</i>	29
3.2.2 <i>Grupo controle</i>	30
3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	30
3.4 VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E PATOLÓGICAS	30
3.5 COLETA DO MATERIAL.....	31
3.5.1 <i>Urina pós-ejaculatória</i>	31
3.5.2 <i>Biópsia de próstata</i>	31
3.6 ANÁLISE PROTEÔMICA DA URINA PÓS EJACULAÇÃO	32
3.6.1 <i>Coleta, preparo e armazenamento das amostras</i>	32

3.6.2	Quantificação e digestão das proteínas	32
3.6.3	Espectrometria de massas	33
3.6.4	Identificação e quantificação de proteínas rotuladas.....	34
3.6.5	Análise diferencial da abundância de proteínas.....	35
3.6.6	Análise de anotação funcional.....	36
3.6.7	Construção e análise da rede de interação proteína-proteína (PPI)	36
3.7	ANÁLISE DA FUSÃO <i>TMPRSS2-ERG</i> POR NGS	36
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
3.8.1	Análise estatística dos dados proteômicos.....	38
3.8.2	Análise estatística do NGS.....	38
3.9	FINANCIAMENTO.....	39
4	RESULTADOS	40
4.1	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	40
4.2	ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS NOS GRUPOS COM BIÓPSIA POSITIVA, BIÓPSIA NEGATIVA E CONTROLE.....	40
4.3	ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS ENTRE CÂNCER DE PRÓSTATA CLINICAMENTE SIGNIFICATIVO (ISUP ≥ 2) VS. CLINICAMENTE INSIGNIFICANTE (ISUP 1).....	44
4.4	ALTERAÇÕES PROTEÔMICAS EM CASOS COM BIÓPSIA POSITIVA ESTRATIFICADOS POR GRUPO DE RISCO	45
4.5	FUSÃO <i>TMPRSS2-ERG</i> POR NGS	49
5	DISCUSSÃO.....	52
5.1	ANÁLISE PROTEÔMICA DA URINA PÓS-EJACULATÓRIA	52
5.2	DETECÇÃO DA FUSÃO <i>TMPRSS2-ERG</i> POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)	59
6	CONCLUSÃO.....	62
7	REFERÊNCIAS	63
	APÊNDICES	70
	ANEXO	80

1 INTRODUÇÃO

Este estudo integra um projeto de pesquisa colaborativo interinstitucional entre o A.C. Camargo Cancer Center e a Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo, submetido e aprovado na Plataforma Brasil sob o título: Avaliação proteômica de sêmen e urina pós-ejaculação e sequenciamento de nova geração do painel gênico Oncomine Focus Fusion Panel para identificação da fusão TMPRSS2-ERG em pacientes suspeitos para câncer de próstata.

Essa colaboração visa reunir a expertise de instituições de referência em assistência e pesquisa nas áreas de oncologia, reprodução humana e análise seminal. Haverá também a participação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, como serviço terceirizado.

O projeto resultará em duas teses de doutorado, uma por cada instituição envolvida. Ambas abordarão a análise proteômica em pacientes com suspeita de câncer de próstata e caracterizam-se como estudos exploratórios e de viabilidade, com perspectiva de ampliação futura da casuística. O tipo de matriz biológica analisada diferenciará os projetos.

O plasma seminal será avaliado por Fernanda Monteiro Orellana, aluna de pós-graduação da EPM/UNIFESP, enquanto esta tese se concentrará na análise proteômica da urina pós-ejaculação e no sequenciamento de painel gênico de nova geração para identificação da fusão TMPRSS2-ERG.

1.1 Câncer de próstata

O câncer de próstata (CP) é a segunda neoplasia maligna mais comum entre os homens, com estimativa de 313.780 novos casos e 35.770 mortes nos Estados Unidos em 2025 (1). No Brasil, são esperados 71.730 casos no mesmo ano, ocupando a segunda posição em mortalidade masculina por neoplasias malignas, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão (2). A idade média ao diagnóstico é de 66 anos, sendo raros os casos em pacientes com menos de 40 anos. Apesar da elevada mortalidade absoluta, a maioria dos casos encontra-se localizada ao diagnóstico, com sobrevida câncer-específica de aproximadamente 99% em cinco anos (1).

1.1.1 Etiopatogenia e Anatomia patológica

O processo de carcinogênese da próstata é complexo e ainda não completamente compreendido. Fatores constitucionais, comportamentais, moleculares e ambientais interagem com múltiplos processos que ocorrem durante o envelhecimento resultando no desenvolvimento do CP. Pacientes com história familiar positiva e afrodescendentes apresentam maior risco para a doença, sugerindo predisposição genética (3). Mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *HOXB13* estão associadas a um risco aumentado de CP (4,5).

Processos inflamatórios crônicos, que induzem hiperproliferação celular para reparo tecidual, podem estar implicados na carcinogênese da próstata. Achados histológicos de atrofia inflamatória proliferativa são frequentemente observados adjacentes à neoplasia intraepitelial de alto grau (*high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*, HGPIN) e a tumores iniciais (6).

Diversos fatores exógenos e ambientais parecem influenciar a incidência e progressão do CP. Entretanto, inexiste evidências de causalidade suficientes que justifiquem a implementação de estratégias preventivas efetivas (6).

1.1.2 Classificação e estadiamento

A avaliação histológica é realizada através da classificação de Gleason, na qual padrões arquiteturais glandulares são identificados e atribuídos graus que variam de 1 a 5, em ordem crescente de desdiferenciação. O grau mais comum e o mais elevado são somados, resultando no escore de Gleason (EG), sendo que um $EG \leq 5$ não deve ser emitido baseado apenas em biópsias (7,8). A classificação atualizada pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica, em 2014 (ISUP) limitou os graus do CP entre 1 e 5, permitindo melhor compreensão, alinhamento da classificação de outros carcinomas e distinção clínica entre os subgrupos EG 7(3+4) e 7(4+3) (9).

As diretrizes do sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos e a classificação de risco de D'Amico são amplamente utilizadas com intuito de estratificar pacientes com prognósticos oncológicos semelhantes, facilitar o delineamento de estudos e a comparação de dados entre diferentes instituições,

além de subsidiar o desenvolvimento de recomendações específicas para cada grupo de risco (10,11).

1.1.3 Diagnóstico

A investigação é realizada por meio de anamnese, do exame dígito retal (EDR) e a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA). O EDR apresenta baixa sensibilidade e especificidade, especialmente quando realizado por examinadores pouco experientes (12,13). O PSA possui diversas limitações, que serão discutidas ao longo do texto.

A biópsia de próstata (BP) guiada por ultrassonografia, transretal ou perineal, é indicada na suspeita de malignidade e permite o diagnóstico definitivo do CP. Apesar de ser considerada o padrão-ouro para o diagnóstico, pode apresentar até 20% de resultados falso-negativos, geralmente atribuídos à amostragem inadequada (14). Além disso, trata-se de um procedimento invasivo, que pode acarretar complicações como hematúria, sangramento retal, retenção urinária, prostatite aguda e urosepse, com necessidade de internação em até 6% dos casos, podendo evoluir para óbito em uma minoria dos casos (15).

A ressonância multiparamétrica da próstata (RMP) é outro recurso importante na investigação de pacientes com suspeita CP. A RMP se popularizou rapidamente nos últimos anos e já possui laudos padronizados, sendo o sistema mais amplamente utilizado o PI-RADS (*Prostate Imaging Reporting and Data System*) (16). Apresenta boa sensibilidade para detecção e localização de doença clinicamente significativa (17) e pode orientar a BP. Além da coleta sistemática de fragmentos prostáticos das áreas mais comumente afetadas pelo CP (zona periférica e regiões pósterio laterais), a BP com fusão de imagens da RMP permite amostragem de adicional de áreas suspeitas, aumentando a sensibilidade para detecção de tumores clinicamente significativos. Contudo, a BP guiada por RMP mantém as taxas de complicações e não elimina a possibilidade de realização de biópsias desnecessárias (18). A RMP apresenta sensibilidade reduzida para a identificação de tumores menores de 5mm e de neoplasias clinicamente insignificantes, além de apresentar reprodutibilidade limitada entre os examinadores (17,19). Fatores como custo elevado, baixa disponibilidade e cobertura restrita por fontes pagadoras dificultam sua implementação em países em desenvolvimento.

1.1.4 Tratamento

O tratamento do câncer de próstata varia conforme o estágio da doença. Em casos localizados, a vigilância ativa é uma estratégia válida para pacientes com tumores de baixo risco de progressão. No entanto, mais de um terço destes pacientes serão submetidos a tratamento curativo no decorrer do seguimento (20).

A prostatectomia radical, a radioterapia e as terapias ablativas são abordagens com finalidade curativa, podendo ser empregadas isoladamente ou em associação ao bloqueio androgênico em estágios avançados. Os efeitos adversos relacionados a essas intervenções são frequentes e incluem a incontinência urinária, disfunção erétil, anejaculação, climatúria, cistite e retite actínica. Essas complicações podem ser transitórias ou permanentes, comprometendo significativamente a qualidade de vida (21,22).

Com a introdução do PSA como marcador diagnóstico e a intensificação das campanhas de rastreamento populacional, estima-se que 20 a 50% dos diagnósticos ocorram de forma muito precoce ou correspondam a tumores indolentes. Consequentemente, muitos pacientes são submetidos a tratamentos desnecessários, passando a conviver com disfunções sexuais e urinárias atribuídas às terapias instituídas (23).

Nos casos metastáticos, a abordagem é baseada no bloqueio androgênico – por castração medicamentosa ou cirúrgica –, eventualmente associada à quimioterapia. A supressão androgênica acarreta múltiplos efeitos colaterais, de natureza metabólica, cardiovascular e óssea, os quais, além de mórbidos, podem contribuir para o aumento da mortalidade (24). A eficácia da castração é inicialmente satisfatória, mas, com o tempo, surgem mecanismos adaptativos tumorais, incluindo alterações nos receptores de andrógenos, culminando na transição para a fase de resistência à castração. Nesse cenário, outras terapias podem ser indicadas, como os novos agentes hormonais, radiofármacos e a quimioterapia (25).

1.2 Biomarcadores do câncer de próstata

1.2.1 Antígeno prostático específico

A utilização do PSA como marcador sérico revolucionou o diagnóstico do CP. O PSA é uma serina-protease sintetizada pelas células epiteliais prostáticas, cuja

principal função é liquefazer o sêmen após a ejaculação, contribuindo para o processo de fecundação (26). Embora esteja presente em altas concentrações no sêmen, é detectado em níveis séricos reduzidos, sob as formas conjugada e livre.

A elevação do PSA sérico está relacionada a alterações da arquitetura histológica prostática, e não necessariamente à maior produção pela célula tumoral. Assim, embora seja órgão-específico, o PSA não é marcador específico para CP. Condições benignas como prostatite, hiperplasia prostática benigna (HPB) e diversos processos que induzem inflamação da glândula – incluindo biópsia, infecção urinária, trauma perineal – podem aumentar a permeabilidade capilar e favorecer o extravasamento do marcador para a circulação, elevando seus níveis séricos (27–29).

A definição de um valor máximo de normalidade para o PSA permanece controverso. O seu uso deve ser interpretado como parâmetro contínuo, em que elevações indicam aumento da probabilidade de CP. Considerando o ponto de corte de 3,0 ng/ml para indicação de biópsia, o valor preditivo para positividade da biópsia é de 29%, implicando que cerca de 71% das biópsias podem ser desnecessárias (30). Entretanto, níveis séricos baixos não excluem malignidade: estima-se que 15% dos pacientes com CP, inclusive com histologias agressivas (Gleason > 7), apresentem PSA abaixo de 4,0 ng/ml (31).

Diante do caráter invasivo da biópsia e de suas possíveis complicações, diversos derivados do PSA foram desenvolvidos com objetivo de melhorar a especificidade e auxiliar no diagnóstico diferencial entre CP e HPB.

A densidade do PSA (PSAD) é calculada pela razão entre o PSA e volume prostático, estimado por ultrassonografia. Valores acima de 0,15 estão associados a maior risco de neoplasia (32). A velocidade de elevação do PSA (PSAV) também foi associada ao risco de CP quando $\geq 0,75$ ng/ml/ano, especialmente em pacientes níveis entre 4 e 10 ng/ml (33). A razão da forma livre do PSA (%fPSA) mostrou-se útil para distinguir CP e HPB em pacientes com PSA intermediário. Em indivíduos com PSA entre 4 e 10 ng/ml e EDR normal, essa razão aumenta a especificidade e reduz em até 20% a realização de biópsias desnecessárias (34). Contudo, seu desempenho é incerto em pacientes com PSA ≤ 4 ng/ml. Apesar de contribuírem para a investigação diagnóstica, a eficácia dos derivados do PSA permanece controversa (35,36).

1.2.2 Novos testes

Nos últimos anos, avanços na avaliação do PSA resultaram em maior acurácia diagnóstica e no desenvolvimento de testes séricos e urinários para triagem pré-biópsia.

1.2.3 Marcadores séricos

Diversos testes séricos foram desenvolvidos com base em painéis de calicreínas, utilizando modelos matemáticos para aprimorar a detecção do câncer de próstata. Entre eles, destacam-se o Índice de Saúde da Próstata (PHI, *Prostate Health Index*) e o 4Kscore.

O PHI é calculado por meio de uma equação que combina PSA total, PSA livre e [-2]proPSA medidos no soro, permitindo estimar a agressividade tumoral com maior precisão do que o PSA isolado. Estudos indicam que o PHI pode evitar até 40% das biópsias desnecessárias e detectar a progressão tumoral em pacientes sob vigilância ativa (37–39).

O 4Kscore, por sua vez, integra PSA total, PSA livre, PSA intacto e calicreína humana 2, além de considerar variáveis clínicas como toque retal e o histórico de biópsias anteriores. Com base nesses dados, gera-se um escore de risco percentual para doença clinicamente significativa, a partir de um modelo calibrado por idade e população de referência (40,41). Valores $\geq 10\%$ sugerem risco elevado e indicam a necessidade de biópsia. Assim como o PHI, o 4Kscore é considerado um teste de segunda linha e pode auxiliar na decisão pela realização de biópsia (41). Ambos os testes foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), com indicação restrita a pacientes PSA entre 2 e 10 ng/dL (42,43).

O IsoPSA baseia-se em uma tecnologia de separação de fase aquosa bifásica, em que diferentes isoformas do PSA são distribuídas conforme suas propriedades estruturais. Estudos clínicos demonstraram desempenho superior ao PSA total e à razão PSA livre/total na diferenciação entre tumores de alto grau e alterações benignas ou de baixo grau. Quando incorporado a algoritmos preditivos — incluindo PSAD, 4Kscore, histórico familiar e ressonância magnética negativa —, o IsoPSA contribui para a estratificação do risco clínico, reduzindo substancialmente

o número de biópsias desnecessárias e a detecção de tumores ISUP 1, com perdas limitadas de casos clinicamente significativos (44).

O Stockholm3 (STHLM3) é um teste sanguíneo que integra biomarcadores plasmáticos, marcadores genéticos e variáveis clínicas, como idade, histórico familiar, biópsias anteriores e EDR. Proposto como modelo preditivo para doença clinicamente significativa, o STHLM3 demonstrou desempenho superior ao PSA isolado, especialmente em pacientes com PSA baixo e escore de Gleason elevado. Essa abordagem permitiu reduzir o número de biópsias desnecessárias, mantendo a sensibilidade diagnóstica para tumores clinicamente significativos (45,46). Além disso, o STHLM3 tem potencial para otimizar o rastreamento do câncer de próstata, contribuindo para a redução da indicação de exames de ressonância magnética multiparamétrica (47). No entanto, até o momento, sua validação clínica foi realizada apenas em coortes escandinavas, o que pode limitar sua aplicabilidade em populações com características distintas.

O Proclarix® é um teste sanguíneo recente que combina trombospondina-1, cathepsina D, PSA total, PSA livre e a idade do paciente para calcular um escore de risco para câncer clinicamente significativo. Evidências indicam que esse teste pode contribuir para melhorar a acurácia diagnóstica em cenários de maior incerteza clínica, como em pacientes com valores intermediários de PSA e ressonância magnética indeterminada (48,49).

1.2.4 Marcadores urinários

O Prostate Cancer Antigen 3 (PCA3) é um gene específico da próstata, classificado como um RNA não codificante, altamente expresso em tecidos tumorais prostáticos e detectável na urina coletada após massagem prostática. Diversos estudos demonstram que o PCA3 apresenta maior acurácia diagnóstica do que o PSA total e a razão PSA livre/total, especialmente em situações de biópsia de repetição (50). A associação entre PCA3 e ressonância magnética multiparamétrica tem mostrado valor complementar na triagem de pacientes com suspeita persistente de câncer de próstata, aumentando o valor preditivo negativo da combinação, em comparação ao uso isolado de cada método (51). No entanto, os resultados sobre sua correlação com tumores clinicamente significativos e sua utilidade no seguimento de pacientes sob vigilância ativa ainda são conflitantes (52,53). O teste

comercialmente disponível ProgenSA PCA3®, aprovado pelo FDA, é indicado como ferramenta auxiliar na decisão sobre a necessidade de rebiópsia em casos com biópsia inicial negativa, mas suspeita clínica mantida. Apesar do potencial diagnóstico, limitações como o alto custo e a exigência de massagem prostática vigorosa para obtenção adequada da amostra restringem seu uso rotineiro.

O MyProstateScore (MPS) é um exame que combina a expressão urinária de *PCA3* e da fusão gênica *TMPRSS2:ERG*, com os níveis séricos de PSA, fornecendo uma estimativa do risco de câncer clinicamente significativo. O gene *TMPRSS2* (protease transmembrana de serina 2) é expresso em células epiteliais prostáticas normais e neoplásicas, enquanto o gene *ERG* (*ETS-related gene*) pertence à família de fatores de transcrição ETS, que atuam na regulação de processos celulares como diferenciação, proliferação e transformação oncogênica (54). As fusões dos genes da família ETS são alterações somáticas recorrentes, identificadas em aproximadamente 50% dos casos de câncer de próstata, sendo a fusão *TMPRSS2:ERG* a mais prevalente (55,56). Sua frequência varia entre grupos étnicos, sendo quase duas vezes mais comum em indivíduos caucasianos do que em afro-americanos (57,58).

O MPS é realizado a partir de amostra urinária coletada após exame dígito-retal e gera uma pontuação associada à probabilidade de neoplasia com escore de Gleason ≥ 7 . Estudos multicêntricos demonstraram desempenho superior do MPS em relação ao PSA isolado, ao PSA combinado com *PCA3* ou com *TMPRSS2:ERG*, indicando maior capacidade discriminatória para doença clinicamente significativa (59).

Além disso, o MPS demonstrou boa correlação com achados de imagem em pacientes com lesões classificadas como PI-RADS 3, superando o desempenho do PSA total e da densidade de PSA na predição de câncer clinicamente significativo. A adoção de pontos de corte específicos tem sido associada à redução na necessidade de biópsias, com baixa taxa de tumores significativos não detectados (60).

Uma versão aprimorada, o MyProstateScore 2.0 (MPS2), foi recentemente validada para uso em amostras urinárias coletadas sem necessidade de massagem prostática (61). Esse novo ensaio avalia a expressão de 18 genes, incluindo alvos associados ao câncer de alto grau, genes relacionados ao câncer de próstata e um gene de referência. Dados de validação indicam desempenho superior do MPS2 em

relação ao PSA, PHI e ao modelo MPS original, com maior acurácia na predição de tumores clinicamente relevantes e redução significativa nas taxas de biópsias desnecessárias (62).

O SelectMDx é um teste urinário não invasivo baseado na análise de mRNA coletado após exame dígito-retal. Avalia a expressão dos genes *DLX1* e *HOXC6*, em conjunto com variáveis clínicas como idade, PSA, volume prostático e EDR, para estimar o risco de câncer de próstata e a probabilidade de doença clinicamente significativa. O teste está incluído nas diretrizes do National Comprehensive Cancer Network (NCCN), mas ainda não foi aprovado pelo FDA. Estudos demonstraram potencial para reduzir o número de biópsias desnecessárias, embora sua aplicabilidade em populações racialmente diversas e seu papel na era da ressonância magnética inicial e das biópsias por fusão ainda necessitem de validação adicional (63,64). Em diferentes coortes, o SelectMDx mostrou desempenho variável na predição de neoplasias com escore de Gleason ≥ 7 . Dados indicam que sua combinação com a ressonância magnética pode melhorar a acurácia diagnóstica, embora haja divergências quanto à superioridade em relação a outras estratégias. Estudos comparativos revelaram que, quando utilizado isoladamente, o SelectMDx apresentou menor desempenho que abordagens baseadas em ressonância magnética, e que a associação de ambos os métodos pode aumentar a detecção de tumores clinicamente insignificantes e o número de biópsias realizadas (65,66).

Comparações diretas com o 4Kscore também demonstraram maior taxa de discordância na indicação de biópsia e desempenho inferior na detecção de tumores clinicamente relevantes, indicando a necessidade de estudos prospectivos adicionais para definição do seu papel na prática clínica (67).

O ExoDx é um teste urinário que analisa a expressão dos biomarcadores *PCA3* e *ERG*, normalizados por *SPDEF* (fator de transcrição da família ETS). Diferentemente de outros testes, o ExoDx não requer exame dígito-retal prévio nem utiliza variáveis clínicas em seu escore. A pontuação gerada, em escala de 0 a 100, é utilizada para estimar o risco de câncer com ISUP ≥ 2 . Embora ainda não aprovado pelo FDA, o teste é recomendado em diretrizes do NCCN. Estudos com pacientes submetidos à biópsia inicial ou repetida demonstraram desempenho promissor do ExoDx na detecção de doença clinicamente significativa, com destaque para sua elevada sensibilidade e bom valor preditivo negativo. No entanto,

foram observadas variações no desempenho diagnóstico entre os diferentes contextos clínicos, o que evidencia a necessidade de validação adicional (68,69).

1.2.5 Marcadores seminais

O plasma seminal apresenta características técnicas relevantes como matriz biológica na análise molecular do câncer de próstata. Por ser um fluido diretamente derivado da próstata e das vesículas seminais — com aproximadamente 25% e 65% de contribuição, respectivamente —, contém elevada concentração de proteínas específicas do trato geniturinário, refletindo de forma mais direta a fisiologia e alterações patológicas da glândula. Apesar dessa vantagem teórica, sua aplicação clínica permanece limitada. Trata-se de uma matriz biologicamente complexa e viscosa, com alta variabilidade interindividual e susceptível a fatores como tempo de abstinência, infecções subclínicas e volume prostático. Essas características dificultam a padronização dos protocolos analíticos e tornam os processos de extração, purificação e quantificação proteica mais desafiadores em comparação a outras matrizes mais acessíveis e tecnicamente manejáveis, como a urina (70).

Investigações moleculares têm demonstrado resultados relevantes na caracterização do plasma seminal de pacientes com câncer de próstata. A quantificação de DNA livre de células (cfDNA) nesse fluido revelou concentrações significativamente elevadas em indivíduos com a neoplasia, ultrapassando 2200 ng/μl, em contraste com cerca de 58 ng/μl em indivíduos sem a doença. Ademais, padrões específicos de fragmentação do cfDNA mostraram potencial discriminatório, sugerindo seu uso como biomarcador não invasivo (71). De forma complementar, a análise de microRNAs — pequenas moléculas envolvidas na regulação pós-transcricional — evidenciou níveis aumentados de miR-200b, miR-200c, miR-30a, miR-375 e miR-99a no plasma seminal de pacientes com câncer, os quais também se encontram superexpressos nos tecidos tumorais, reforçando sua relevância biológica e potencial papel diagnóstico (72).

No campo da proteômica, a análise do plasma seminal tem se mostrado promissora na identificação de perfis moleculares associados ao câncer de próstata. Avaliações baseadas em espectrometria de massas identificaram painéis peptídicos com capacidade discriminatória para a detecção da doença e estratificação por escore de Gleason, sugerindo aplicabilidade potencial na avaliação da agressividade

tumoral (73). Adicionalmente, a proteína transglutaminase 4 (TGM4) foi encontrada em níveis aumentados no plasma seminal de pacientes com câncer de próstata, apresentando desempenho diagnóstico potencialmente superior ao do PSA (74).

1.3 Avaliação proteômica

A proteômica tem se consolidado como uma abordagem promissora na investigação do câncer de próstata, ao possibilitar a caracterização direta das proteínas expressas pelas células tumorais e suas modificações pós-traducionais. Complementando os dados transcriptômicos e genômicos, essa técnica oferece uma representação funcional mais precisa do estado biológico celular, sendo promissora na identificação de biomarcadores com potencial diagnóstico, prognóstico e terapêutico.

Entre suas principais vantagens, destaca-se a capacidade de analisar simultaneamente centenas de proteínas em diferentes tipos de amostras clínicas, como tecidos, sangue, urina e sêmen. Essa característica favorece a identificação de assinaturas moleculares específicas do câncer de próstata e contribui para o desenvolvimento da medicina personalizada. No entanto, a aplicação clínica da proteômica ainda enfrenta limitações importantes, incluindo a heterogeneidade metodológica entre os estudos, a baixa reprodutibilidade dos achados e a escassez de validações clínicas em coortes independentes. Muitos trabalhos permanecem em caráter exploratório, frequentemente sem hipóteses biológicas bem definidas, o que dificulta a translação dos resultados para a prática clínica (75).

As matrizes biológicas utilizadas nas pesquisas incluem predominantemente tecido prostático obtido por biópsia ou prostatectomia, urina — frequentemente coletada após massagem prostática —, plasma e, em menor proporção, sêmen (76). A urina tem se destacado como uma das fontes mais promissoras, devido à facilidade de coleta, ao caráter não invasivo e à proximidade com o microambiente prostático. Embora o plasma sérico seja amplamente utilizado, apresenta limitações em razão da baixa concentração de proteínas relacionadas à doença, quando comparadas à concentração total de proteínas circulantes. Além disso, considerando que o câncer de próstata geralmente se origina na zona periférica da glândula e permanece confinado em estágios iniciais, é provável que biomarcadores séricos só sejam detectáveis em fases mais avançadas da doença, o que limita seu uso como

ferramenta de detecção precoce, em comparação com matrizes como o sêmen e a urina.

Em estudos que analisaram urina de pacientes com câncer de próstata, observaram-se níveis aumentados de proteínas como Precursora da alfa-1-microglobulina/bicunina (AMP), Glicoproteína CD59 (CD59) e Prostaglandina-H2 D-isomerase (PTGDS), associadas a processos inflamatórios e mecanismos de evasão imune (76). Em vesículas extracelulares urinárias, identificaram-se alterações em proteínas como a Ligadora epidérmica a ácidos graxos (FABP5) e de Corpo multivesicular carregada 4C (CHMP4C), implicadas na progressão tumoral e no tráfego intracelular de proteínas (77). No microambiente estromal tumoral, também foram detectadas modificações em proteínas relacionadas à contração da musculatura lisa e reorganização da matriz extracelular, como a Caldesmon (CALD1), Cadeia leve 6 da miosina (MYL6) e Cadeia alfa-4 de tropomiosina (TPM4), sugerindo seu envolvimento em processos de invasividade e remodelação tecidual (78).

Adicionalmente, foi desenvolvido um painel de peptídeos urinários com capacidade discriminatória entre tumores de baixo e intermediário grau (ISUP 1 vs. ISUP 2), o qual demonstrou desempenho superior a ferramentas tradicionais, como o PSA e o escore de risco ERSPC, em coorte de validação independente (79).

Coletivamente, os achados reforçam o potencial da proteômica como ferramenta para a compreensão molecular e o aprimoramento diagnóstico do câncer de próstata. O avanço na padronização dos métodos, aliado à validação clínica dos biomarcadores identificados, é determinante para a consolidação dessa tecnologia e sua futura incorporação à prática assistencial.

1.4 Justificativa do projeto

O câncer de próstata apresenta elevada incidência e prevalência, comportamento biológico heterogêneo, deficiências diagnósticas e tratamentos frequentemente mórbidos. A concomitância com a hiperplasia prostática benigna, que também cursa com elevação de marcadores como o PSA, motiva a realização de biópsias desnecessárias. Mesmo testes mais modernos, descritos anteriormente, podem sofrer interferência de condições benignas como a HPB. A identificação de biomarcadores sensíveis e específicos expressos no CP pode contribuir para a

elucidação da fisiopatologia, o aprimoramento da acurácia diagnóstica e o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas ou preventivas.

A avaliação proteômica tem sido empregada em diversas matrizes com o objetivo de esclarecer aspectos relacionados à fisiopatologia, agressividade e progressão do CP. Contudo, os estudos disponíveis apresentam baixa reprodutibilidade, e são necessários trabalhos com coortes independentes para validação dos achados.

A maioria dos estudos com marcadores urinários utiliza amostras obtidas por micção espontânea ou após massagem prostática. No entanto, além de invasiva, a massagem não alcança regiões como as zonas ânterolaterais, parauretrais e, possivelmente, a zona central da próstata. Também não promove a secreção de material biológico proveniente das vesículas seminais e dos ductos deferentes. Acreditamos que a urina coletada após a ejaculação represente uma alternativa viável à coleta pós-massagem prostática, com menor custo e desconforto, além de maior reprodutibilidade no contexto nacional. Durante a ejaculação, o estímulo simpático induz contrações propulsivas da musculatura lisa prostática, dos vasos deferentes e das vesículas seminais, promovendo a liberação do sêmen e da secreção prostática na uretra (80). Por provocar contração vigorosa de toda a glândula, a ejaculação tende a liberar maior volume de secreção, incluindo porções provenientes de regiões prostáticas não atingidas pela massagem, além do fluido seminal. Assim, estima-se que essa amostra seja mais representativa do microambiente prostático. Tal como o plasma seminal, a urina pós-ejaculatória poderia ser utilizada como fonte para análises proteômicas e transcriptômicas, com elevado potencial para identificação de biomarcadores do CP.

Dessa forma, este projeto propõe a avaliação proteômica da urina coletada após ejaculação em paciente submetidos a biópsia prostática por suspeita de câncer de próstata, bem como em indivíduos saudáveis sem afecções prostáticas. Adicionalmente, foi realizado o sequenciamento de nova geração (NGS) com o painel gênico Oncomine Focus Fusion Panel para identificação da fusão *TMPRSS2-ERG* em amostras de pacientes com biópsia positiva para adenocarcinoma da próstata.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) na urina pós-ejaculatória de pacientes submetidos à biópsia prostática, estratificados por presença ou ausência de câncer, grupo de risco clínico e grau histológico.

2.2 Objetivos específicos

Caracterizar os processos biológicos e vias moleculares associadas às proteínas diferencialmente abundantes por meio de análise funcional com base em termos do Gene Ontology (GO) e vias Reactome.

Avaliar, de forma exploratória, a presença da fusão *TMPRSS2-ERG* em amostras de urina pós-ejaculatória e tecido prostático de pacientes com biópsia positiva para câncer de próstata, utilizando sequenciamento de nova geração com o painel Oncomine Focus Fusion Panel (Thermo Scientific).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População de estudo

Foram recrutados, entre janeiro de 2023 e maio de 2024, 213 indivíduos para participação no estudo, sendo 201 pacientes com suspeita clínica de câncer de próstata, acompanhados no Núcleo de Urologia do A.C. Camargo Cancer Center, e 12 indivíduos do grupo controle, sem sintomas do trato urinário inferior, provenientes do Ambulatório de Disfunção Miccional da Disciplina de Urologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP).

Do grupo com suspeita de câncer, 43 pacientes consentiram e compareceram para coleta de urina pós-ejaculatória. Dois foram excluídos: um por não ter conseguido ejacular e outro por não ter realizado biópsia prostática devido à mudança na conduta clínica. Adicionalmente, duas amostras coletadas foram desconsideradas na análise proteômica por preparo inadequado, totalizando 39 amostras válidas desse grupo. Entre os controles, 7 dos 12 convidados realizaram a coleta adequadamente, compondo o grupo controle final.

Assim, a análise proteômica foi conduzida em 46 amostras: 24 de pacientes com biópsia positiva para câncer de próstata, 15 com biópsia negativa e 7 de indivíduos controles.

Todos os 26 pacientes submetidos à biópsia de próstata e que apresentaram resultado positivo para câncer de próstata foram selecionados para análise da fusão TMPRSS2-ERG por NGS.

3.2 Critérios de inclusão

3.2.1 Grupo suspeito para câncer de próstata

Foram incluídos pacientes do sexo masculino, com idade entre 40 e 70 anos, que apresentavam suspeita clínica de câncer de próstata e indicação de biópsia prostática a critério do urologista assistente. A indicação foi baseada em um ou mais dos seguintes critérios: elevação do PSA total ($> 2,5$ ng/mL), exame digital retal com achado nodular, resultado suspeito para lesão clinicamente significativa na

ressonância magnética multiparamétrica (PI-RADS ≥ 4) ou diagnóstico histológico prévio confirmado de câncer de próstata.

3.2.2 Grupo controle

Foram selecionados homens assintomáticos, com idade entre 40 e 60 anos, em acompanhamento ambulatorial de rotina. Os critérios obrigatórios para inclusão nesse grupo foram: exame digital retal sem alterações, nível sérico de PSA inferior a 1,0 ng/mL e ausência de queixas urinárias sugestivas de disfunção do trato urinário inferior.

3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos indivíduos com histórico de procedimentos cirúrgicos prostáticos, uso recente (últimos 30 dias) de bloqueadores alfa-adrenérgicos, inibidores da 5-alfa-redutase, antiandrogênicos, estrógenos ou agonistas/antagonistas do LHRH. Também foram excluídos pacientes com sintomas sugestivos de prostatite aguda ou infecção urinária ativa, diagnóstico atual ou prévio de outro tumor maligno (exceto carcinoma basocelular ou espinocelular de pele), portadores de distúrbios da ejaculação de origem neurológica, cirúrgica, farmacológica ou idiopática, bem como indivíduos com transtornos cognitivos e/ou psiquiátricos. Adicionalmente, foram excluídos pacientes com incapacidade de realizar a masturbação ou de fornecer amostra adequada de sêmen em até duas tentativas, bem como aqueles com estenose uretral que comprometesse a emissão do sêmen em volume suficiente para coleta e posterior análise.

3.4 Variáveis demográficas, clínicas e patológicas

Além da anamnese e do exame físico, foram coletadas as seguintes informações dos participantes: idade, data de nascimento, grau de escolaridade, etnia, histórico médico pregresso, comorbidades, uso atual de medicações, hábitos de vida (como tabagismo e etilismo), antecedentes familiares de câncer de próstata e antecedentes pessoais relevantes, com atenção especial à história de infecções sexualmente transmissíveis e infecções do trato urinário.

Quando disponível, foi registrada a classificação da ressonância magnética multiparamétrica conforme o sistema PI-RADS.

Foram também analisados os dados anatomopatológicos das biópsias prostáticas, com base na classificação da ISUP 2014 (8,11) Nos casos confirmados de câncer de próstata, foram incluídas informações complementares, como estadiamento clínico, escore de Gleason e estratificação de risco clínico segundo a classificação de D'Amico modificada pelas diretrizes da AUA/ASCO/SUO (8,81).

3.5 Coleta do material

3.5.1 Urina pós-ejaculatória

A coleta de urina pós-ejaculatória foi realizada no Laboratório de Andrologia e Reprodução Humana da Disciplina de Urologia Escola Paulista de Medicina / Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP), em ambiente apropriado e reservado. Os participantes foram previamente orientados quanto à sequência do procedimento, com esclarecimento de eventuais dúvidas.

3.5.2 Biópsia de próstata

As biópsias de próstata foram realizadas posteriormente à coleta da urina. Os procedimentos foram conduzidos pela equipe de Radiologia Intervencionista do A.C. Camargo Cancer Center, sob sedação, com orientação por ultrassonografia transretal ou transperineal. A coleta foi sistemática, com retirada de fragmentos por sextantes — mínimo de 12 amostras — complementada por fragmentos adicionais obtidos de áreas suspeitas identificadas na ressonância magnética multiparamétrica — por meio da técnica de fusão de imagens — ou ao exame digital retal.

A análise histopatológica foi conduzida por patologistas especializados em Uropatologia da mesma instituição, seguindo os critérios da Classificação de ISUP 2014 (8,11).

3.6 Análise proteômica da urina pós ejaculação

3.6.1 Coleta, preparo e armazenamento das amostras

A urina foi coletada em recipiente estéril, proveniente do primeiro jato urinário de micção espontânea ocorrida após a ejaculação. As amostras foram encaminhadas ao Centro de Pesquisa em Urologia da Unifesp, e processada de acordo com Lindén et al., 2012. Aproximadamente 50mL de urina foram centrifugados a 1.000 xg por 10 minutos para remoção de debris celulares. O sobrenadante foi então transferido para filtros Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units de 3 kDa (Millipore, MA, EUA) e novamente centrifugado a 4.000 xg por 45 minutos a 10 °C. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 14,7mL de PBS contendo inibidor de protease, com centrifugação a 4.000 xg por 45 minutos a 10°C, até obtenção de um volume final de aproximadamente 300 µL, armazenado a – 80 °C. Antes de sua utilização, o concentrado de proteínas urinárias foi descongelado à temperatura ambiente e centrifugado a 16.100 xg por uma hora a 4°C para remoção de debris celulares.

3.6.2 Quantificação e digestão das proteínas

Primeiramente, foi realizada a quantificação das proteínas totais na urina pós ejaculação de cada participante, por meio do espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), conforme as instruções do fabricante, utilizando comprimento de onda de 280 nm. Cada amostra foi analisada em triplicata, sendo que aquelas com coeficiente de variação superior a 5% foram submetidas a nova quantificação para assegurar maior precisão nos resultados.

A partir da quantificação das proteínas, um volume correspondente a 50 µg de proteína de cada amostra foi diluído em água Milli-Q até um volume final de 50 µL, ao qual foram adicionados 10 µL de solução de 50 mM de NH_4HCO_3 . As proteínas foram então desnaturadas pela adição de 25 µL de uma solução de 2 mg/mL do surfactante RapiGest SF em água (Waters, Massachusetts, EUA). Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 80°C por 15 minutos, seguidas de centrifugação. Para otimizar a ação da tripsina, as pontes dissulfeto dos resíduos contendo enxofre nas proteínas foram reduzidas pela adição de 2,5 µL de uma

solução de 100 mM de DTT, com incubação por 30 minutos a 60 °C. Após nova centrifugação, foram adicionados 2,5 µL de uma solução de 300 mM de iodoacetamida (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) para alquilação dos resíduos sulfurados das proteínas, e as amostras foram mantidas no escuro à temperatura ambiente por 30 minutos.

A digestão das proteínas foi realizada com a adição de 10 µL de uma solução contendo 50 µg/mL de tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, Wisconsin, EUA) preparada em 50 mM de NH_4HCO_3 , na proporção de 1:100 (enzima/proteína). As amostras foram incubadas a 37 °C em banho-maria por 16 horas.

Após a digestão, a hidrólise do RapiGest SF foi promovida pela adição de 10 µL de solução contendo 5% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Alemanha) em água, resultando em uma concentração final de TFA de 649 mM. Em seguida, as amostras foram incubadas novamente a 37 °C por 90 minutos e, posteriormente, centrifugadas a 16.100 ×G por 30 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi então transferido para um novo tubo e submetido à centrifugação em um evaporador centrífugo CentriVap® (Labconco, Missouri, EUA), reduzindo o volume para aproximadamente 25 µL. Por fim, as amostras foram dessalinizadas utilizando ponteiros Ziptip® acopladas a colunas C18 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), conforme as recomendações do fabricante.

3.6.3 Espectometria de massas

A etapa de espectrometria de massas foi realizada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Inicialmente, um sistema Easy-nLC 1200 UHPLC (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) foi utilizado para a separação dos peptídeos, empregando um gradiente linear do solvente A (0,1% de ácido fórmico) e do solvente B (80% de acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico).

Cada amostra foi ressuspensa em 0,1% de ácido fórmico até atingir uma concentração final de 0,1 µg de proteínas digeridas por µL. Em seguida, 10 µL dessa solução foram carregados em uma coluna de pré-concentração (Acclaim PepMap 100, C18, 3 µm, 75 µm × 2 cm, nanoViper, Thermo Scientific) com 22 µL do solvente A, sob pressão de 500 bar. Após essa etapa, os peptídeos retidos foram eluídos

para uma coluna C18 (Acclaim PepMap RSLC, C18, 2 μ m, 75 μ m $\times$ 15 cm, nanoViper, Thermo Scientific) a uma vazão de 300 nL/min. A eluição dos peptídeos ocorreu por meio de um gradiente linear de 5–28% do solvente B por 80 minutos, seguido por um gradiente linear de 28–40% do solvente B por 10 minutos. Posteriormente, a proporção do solvente B foi aumentada para 95% em 2 minutos, e a coluna foi lavada por 12 minutos com essa mesma proporção. Antes de cada injeção, o sistema foi reequilibrado com 100% do solvente A.

As amostras foram analisadas em um espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha), utilizando uma fonte de ionização nanospray Flex NG (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha) e operando no modo de ionização por eletrospray positivo (ESI+), com temperatura do capilar ajustada para 300°C e nível de RF do S-Lens configurado em 30%.

Após a aquisição do espectro de massas (MS) completo, foram realizadas análises MS2 dependentes de dados, com um tempo de ciclo de 3 segundos. Tanto os espectros MS quanto MS2 foram obtidos no analisador Orbitrap. Íons precursores selecionados para análise MS2 foram excluídos de análises subsequentes por 40 segundos. O algoritmo Advanced Peak Determination (APD) foi aplicado para aprimorar a identificação dos precursores. Os íons precursores foram fragmentados por dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD), com energia de colisão normalizada em 30%. A resolução do modo de varredura total foi ajustada para 120.000 (em m/z 200), com um alvo de controle automático de ganho (AGC) de 5×10^5 . A faixa de varredura monitorada foi de m/z 350–1550.

Para medições de massa precisas, a opção RunStart EASY-IC™ foi ativada para calibração de massa antes de cada análise. Cada varredura total foi seguida por uma aquisição MS2 dependente de dados, com resolução de 30.000 (em m/z 200), tempo máximo de preenchimento de 54 ms e janela de isolamento de 1,2 m/z.

3.6.4 Identificação e quantificação de proteínas rotuladas

Os dados brutos gerados pelo espectrômetro de massas Orbitrap Fusion Lumos foram processados utilizando o software Thermo Scientific Proteome Discoverer (versão 3.0). Os espectros MS2 foram analisados com o motor de busca Sequest HT, utilizando o proteoma de referência de *Homo sapiens* (ID do proteoma UniProt: UP000005640, 23 de janeiro de 2025; 20.329 sequências), complementado

com 245 contaminantes comuns
(http://www.coxdocs.org/doku.php?id=maxquant:start_downloads.htm). A busca no banco de dados foi realizada com especificidade para a tripsina, permitindo até duas falhas na clivagem, e considerando a carbamidometilação da cisteína (+57,02 Da) como modificação fixa. A oxidação dos resíduos de metionina (+15,99 Da) e a acetilação N-terminal foram tratadas como modificações variáveis. A tolerância de massa do precursor foi ajustada para 10 ppm, enquanto a tolerância de massa dos fragmentos foi definida como 0,02 Da. As identificações das proteínas foram validadas utilizando o módulo Protein FDR Validator no Proteome Discoverer, aplicando uma taxa de descoberta falsa (FDR) rigorosa de 1% e uma FDR mais flexível de 5%. As proteínas que passaram no limite de 1% foram consideradas de alta confiança, enquanto aquelas que passaram apenas o limite de 5% foram classificadas como de confiança média; as correspondências com FDR superior a 5% foram excluídas de análises subsequentes. A quantificação sem rótulo foi realizada utilizando o fluxo de trabalho quantitativo do PD, que normaliza as abundâncias dos peptídeos pela quantidade total de peptídeos presente em cada amostra. O fator de normalização foi calculado para cada amostra somando as abundâncias dos peptídeos e comparando com a soma máxima observada entre todas as amostras. Os valores de abundância normalizada das proteínas foram então exportados do PD para análises estatísticas posteriores (82).

3.6.5 Análise diferencial da abundância de proteínas

Os valores de abundância das proteínas foram incluídos na análise somente quando cada proteína fosse identificada por pelo menos um peptídeo único e quantificada em pelo menos 60% das amostras. Para as ausências de dados, foi realizada imputação, assumindo que essas proteínas estavam próximas ao limite de detecção, utilizando uma distribuição normal (largura = 0,3, deslocamento = 1,8). A análise de abundância diferencial das proteínas foi conduzida utilizando o pacote limma (versão 4.4.2) do R/Bioconductor, com t-estatísticas moderadas por Bayes empírico e ajustando para a idade como covariável. Os valores de p foram corrigidos para múltiplas comparações pelo método de Benjamini–Hochberg, a fim de controlar as taxas de descoberta falsa (FDR). As proteínas foram consideradas

diferencialmente abundantes quando atingiram o critério de significância de $p < 0,05$ e apresentaram variação $\log_2$ do fold change $< -0,26$ ou $> 0,26$ (83).

3.6.6 Análise de anotação funcional

A lista de proteínas diferencialmente abundantes foi submetida à análise de enriquecimento utilizando o STRING (versão 12.0). A análise incluiu termos de Gene Ontology (processo biológico) e vias do Reactome. Uma via ou processo foi considerado significativo quando apresentava um valor de p ajustado pela FDR $< 0,05$.

3.6.7 Construção e análise da rede de interação proteína-proteína (PPI)

A Rede de Interação Proteína-Proteína (PPIN) das proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) foi construída utilizando dados de interação da base de dados STRING, acessada por meio do aplicativo Cytoscape stringApp (v. 2.1.1). A análise foi limitada a *Homo sapiens*, com um valor de corte de confiança estabelecido em 0,4, e nenhum interator adicional foi incluído. A visualização da rede e as análises subsequentes foram realizadas com o software Cytoscape (v. 3.10.2). A análise da estrutura topológica da PPIN foi realizada utilizando o plugin NetworkAnalyzer no Cytoscape (84). Os nós principais foram identificados aplicando-se um valor de corte com base no grau de conectividade de cada nó. Especificamente, nós com grau superior à média + (2*desvio padrão) foram considerados nós chave. Nós com maior conectividade foram interpretados como hubs potenciais, representando alvos-chave dos compostos devido à sua conectividade significativa na rede (85).

3.7 Análise da fusão *TPRSS2-ERG* por NGS

Todos os 26 pacientes submetidos à biópsia de próstata e que apresentaram resultado positivo para câncer de próstata foram selecionados para análise. A urina pós ejaculação, colhida previamente, e o tecido obtido por biópsia foram submetidos ao sequenciamento de nova geração (NGS) de um painel gênico comercial (Oncomine Focus Fusion Panel – ThermoScientific) para identificação da fusão *TPRSS2-ERG*. Este painel avalia 24 pontos de quebras descritos para fusões de

TMPRSS2, incluindo as fusões mais comuns com o gene *ERG* e outros genes menos comuns (*ETV1*, *ETV4*, *ETV5* e *BRAF*).

Resumidamente, as amostras de urina foram coletadas em um tubo cônico de 50 ml e depois centrifugadas a 3000 g durante 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante da urina será transferido para outro tubo cônico de 50 ml. O sedimento celular (juntamente com um volume residual de urina de aproximadamente 100 µl) foi transferido para um tubo de 1,5 ml. Ambos foram congelados imediatamente a -80 °C. O sedimento da urina foi armazenado para possíveis estudos futuros. O sobrenadante da urina foi utilizado para extração de RNA.

Os tecidos tumorais congelados ou fixados em formalina e emblocados em parafina (FFPE) armazenados no Biobanco ou no Departamento de Anatomia Patológica do ACCCC foram submetidos à análise histológica por um patologista qualificado para avaliar a porcentagem do tecido de interesse. Amostras com pelo menos 20% de células malignas são incluídas no estudo e selecionadas para extração do RNA.

Os RNAs das amostras de sobrenadante de urina e de tecido tumoral foram extraídos utilizando o protocolo operacional padrão do Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, utilizando o kit MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (ThermoFisher) para a urina e o kit QIAasympphony RNA Kit (Qiagen) para o tecido tumoral. A quantidade e integridade dos RNAs obtidos foram avaliadas no equipamento TapeStation (Agilent Technologies). A etapa de NGS foi realizada pelo grupo de Genômica e Biologia Molecular, do A.C. Camargo Cancer Center, sob supervisão da Dra. Giovana Torrezan. O método consiste em uma reação de RT-PCR (*reverse-transcriptase* PCR) a partir de pequena quantidade de RNA total (1-100 ng) de cada amostra. Posteriormente as regiões alvo das regiões controles e das fusões avaliadas no painel são amplificadas em reações de PCR multiplex utilizando o kit Oncomine Focus Fusion Panel, segundo as especificações do fabricante (ThermoScientific). Em seguida, são adicionados adaptadores contendo identificadores únicos (*barcodes*) para cada amostra permitindo o sequenciamento paralelo de diferentes pacientes. Os sequenciamentos foram realizados na plataforma IonS5 (ThermoScientific), seguindo as instruções do fabricante. Para o mapeamento e chamada de variantes de sequências geradas na plataforma Ion Proton foram utilizados os softwares TMAP - Mapping Alignment Program e o Ion

Reporter, desenvolvidos pelo próprio fabricante dos sequenciadores da Life Technologies. A presença/ausência das fusões investigadas foi avaliada no software Ion Reporter, seguindo os *pipelines* de análise próprios deste software.

3.8 Análise estatística

3.8.1 Análise estatística dos dados proteômicos

As análises dos dados foram realizadas no ambiente R (versão 4.4.0) para Windows. A normalidade das variáveis contínuas foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk, e os resultados foram visualizados por gráficos Quantil-Quantil (Q-Q) e histogramas. Esses gráficos foram utilizados como ferramentas complementares para detectar desvios da normalidade, fornecendo tanto avaliações numéricas quanto gráficas. Para os dados com distribuição não normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste pós-hoc de Dunn para comparações entre os grupos. As variáveis categóricas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado, com o teste exato de Fisher utilizado quando as frequências esperadas eram inferiores a 5. As estatísticas descritivas foram expressas como medianas, acompanhadas de intervalos interquartis (IQR) para dados não normais. A significância estatística foi considerada para valores de $p \leq 0,05$.

3.8.2 Análise estatística do NGS

As análises estatísticas referentes à fusão TMPRSS2–ERG foram conduzidas com enfoque exclusivamente descritivo, em consonância com o delineamento exploratório do estudo e com o número restrito de amostras disponíveis. As frequências absolutas e relativas (%) de detecção da fusão foram apresentadas separadamente para as amostras de tecido tumoral e de urina pós-ejaculatória, com estratificação conforme os grupos histológicos definidos pelo grau de ISUP. Para os casos com análise técnica viável em ambas as matrizes, foi estimado o coeficiente kappa de Cohen, com o intuito de avaliar a concordância entre os achados obtidos na urina e no tecido prostático. Não foram aplicados testes de significância estatística inferencial.

3.9 Financiamento

O presente estudo foi viabilizado com recursos destinados à pesquisa científica recebidos pelo orientador, por meio do projeto Mutographs – IARC, Lyon, França. O apoio institucional apresentou natureza não vinculante e sem interferência nas etapas de concepção, condução, análise ou interpretação dos resultados. Não houve financiamento direto por agências públicas ou privadas com potencial conflito de interesses, e os demais custos operacionais foram arcados pelos próprios pesquisadores.

4 RESULTADOS

4.1 Características clínicas

A análise proteômica foi realizada em 46 amostras, sendo 39 do grupo suspeito para câncer de próstata e 7 controles. Entre os pacientes do grupo suspeito, 24 apresentaram biópsia positiva para CP e 15 biópsia negativa. (Tabela 1). A idade mediana foi ligeiramente maior no grupo com biópsia positiva (61 anos, IQR: 59–64) em comparação com os grupos de controle (56 anos, IQR: 48–58) e biópsia negativa (56 anos, IQR: 52–66). A distribuição dos escores PI-RADS variou entre os casos com biópsia positiva e negativa, com 67% dos casos com biópsia negativa classificados como PI-RADS ≥ 4 .

As comorbidades, incluindo hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia (43%–46%), estavam distribuídas de forma semelhante entre os grupos. No entanto, o consumo de álcool foi significativamente menor no grupo com biópsia positiva (8,3%) em comparação com o grupo controle (71%, $p = 0,006$).

4.2 Alterações Proteômicas nos Grupos com Biópsia Positiva, Biópsia Negativa e Controle

Um total de 1.831 proteínas foram identificadas no conjunto de dados. Após a aplicação de rigorosos critérios de controle de qualidade — que exigiam detecção em pelo menos 60% das amostras e a presença de pelo menos um peptídeo único — o conjunto de dados foi refinado para 859 proteínas.

A análise comparativa revelou perfis proteômicos distintos entre os grupos. Na comparação entre biópsia positiva (N=24) e controle (N=7), foram identificadas 51 proteínas diferencialmente abundantes (DAPs), sendo 21 com abundância aumentada e 30 com abundância diminuída (Fig. 1A). Na comparação entre biópsia negativa (N=15) e controle (N=7), foram detectadas 29 DAPs, compostas por 13 proteínas com abundância aumentada e 16 com abundância diminuída (Fig. 1B). A comparação entre biópsia positiva (N=24) e biópsia negativa (N=15) revelou 21 DAPs, das quais 12 apresentaram aumento e 9 diminuição na abundância (Fig. 1C; Apêndices A, B e C).

Table 1 - Características clínicas, demográficas e exames de imagem dos pacientes controles, com biópsia positiva e negativa

Características dos Pacientes	Controle (N = 7)	Biópsia Positiva (N = 24)	Biópsia Negativa (N = 15)	p-valor
Idade em anos, mediana (IQR)	56 (48, 58)	61 (59, 64)	56 (52, 66)	0,06
Etnia				0,5
Amarelo	1 (14%)	0 (0%)	1 (6.7%)	
Branca	5 (71%)	20 (83%)	11 (73%)	
Pardo	1 (14%)	4 (17%)	3 (20%)	
Comorbidades				
Hipertensão arterial	4 (57%)	11 (46%)	7 (47%)	>0.9
Diabetes Mellitus tipo 2	1 (14%)	6 (25%)	2 (13%)	0,7
Obesidade	1 (14%)	3 (13%)	4 (27%)	0,7
Dislipidemia	3 (43%)	11 (46%)	6 (40%)	>0.9
Tabagismo	0 (0%)	2 (8.3%)	0 (0%)	0,7
Consumo de álcool	5 (71%) ^a	2 (8.3%) ^b	3 (20%) ^{a,b}	0,006
Sedentarismo	3 (43%)	7 (29%)	8 (53%)	0,12
Vasectomia Prévia	0 (0%)	4 (17%)	4 (27%)	0,4
História de Infecções Sexualmente Transmissíveis	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NA
História de Infecção Urinária	0 (0%)	2 (8.3%)	4 (27%)	0,2
História Familiar de CP	2 (29%)	6 (25%)	3 (20%)	>0.9
Biópsia de Próstata Prévia				0,3
1 biópsia	0 (0%)	8 (33%)	3 (20%)	
> 1 biópsia	0 (0%)	3 (13%)	1 (6.7%)	
Sem biópsia prévia	7 (100%)	13 (54%)	11 (73%)	
PSA Total				<0.001
< 1.0 ng/mL	7 (100%)	0 (0%)	2 (13%)	
2.6 to 4.0 ng/mL	0 (0%)	6 (25%)	5 (33%)	
4.1 to 10.0 ng/mL	0 (0%)	15 (63%)	5 (33%)	
10.1 to 20.0 ng/mL	0 (0%)	2 (8.3%)	0 (0%)	
> 20.0 ng/mL	0 (0%)	1 (4.2%)	0 (0%)	
Classificação de PI-RADS				0,14
PI-RADS 2	NA	5 (21%)	2 (13%)	
PI-RADS 3	NA	9 (38%)	2 (13%)	
PI-RADS 4	NA	7 (29%)	10 (67%)	
PI-RADS 5	NA	2 (8.3%)	0 (0%)	
Biópsia com Fusão	NA	16 (67%)	10 (67%)	>0.9
Achados Histopatológicos				
Proliferação Atípica de Pequenos Ácinos (ASAP)	NA	2 (8.3%)	1 (6.7%)	0,7
Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN)	NA	1 (4.2%)	1 (6.7%)	0,5
Adenocarcinoma Ductal	NA	0 (0%)	0 (0%)	>0.9
Tumor Neuroendócrino	NA	0 (0%)	0 (0%)	0,4
Padrão Cribiforme	NA	4 (17%)	0 (0%)	0,12
Incasão Perineural	NA	4 (17%)	0 (0%)	0,12
Invasão Angiolinfática	NA	0 (0%)	0 (0%)	0,4
ISUP (International Society of Urological Pathology)				
Grau 1	NA	9 (38%)	NA	NA
Grau 2	NA	10 (42%)	NA	NA
Grau 3	NA	3 (13%)	NA	NA
Grau 4	NA	2 (8.3%)	NA	NA
Grupo de risco				
Alto/intermediário desfavorável	NA	6 (25%)	NA	NA
Intermediário favorável	NA	9 (38%)	NA	NA
Baixo	NA	9 (38%)	NA	NA

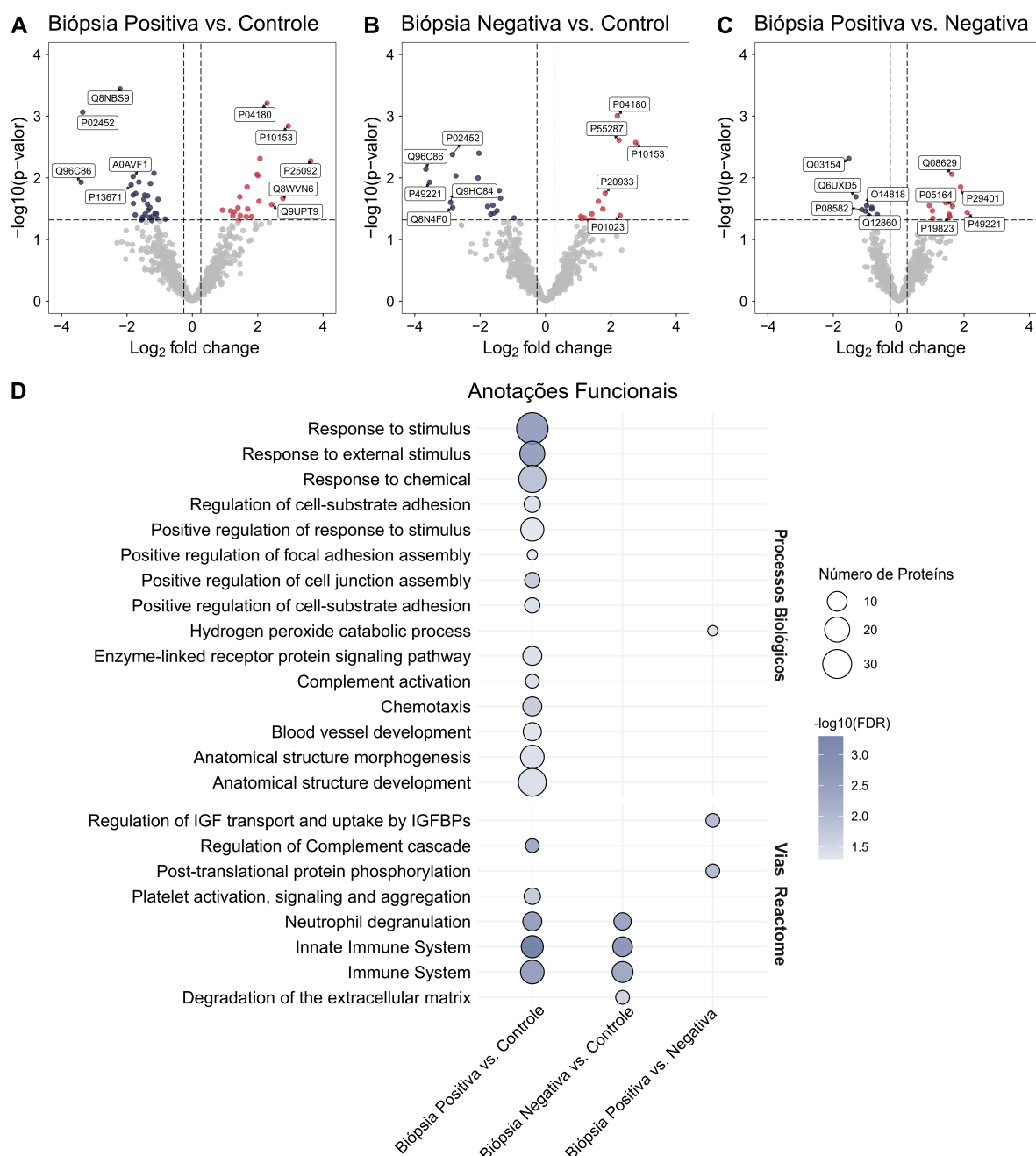
Fonte: Elaboração própria

Destacam-se seis proteínas ausentes no grupo controle, mas detectadas em pelo menos 60% das amostras de um ou ambos os grupos de biópsia, sugerindo sua relevância potencial na patologia da doença. Estas proteínas incluem Miosina-9 (P35579), Fosfo-histidina fosfatase de 14 kDa (Q9NRX4), Protease de lectina ligadora de manose 1 (P48740), Sintase de espermina (P52788), Fator de crescimento semelhante à EGF ligado a heparina (Q99075) e Beta-defensina 121 (Q5J5C9).

Para elucidar os processos biológicos subjacentes a essas alterações proteômicas, foram realizadas análises de anotação funcional, incorporando enriquecimento de vias do Reactome e análises de processos biológicos do Gene Ontology (GO). A análise funcional da comparação entre biópsia positiva e controle identificou 19 anotações significativamente enriquecidas, incluindo 14 Processos Biológicos e cinco vias do Reactome. Em contraste, a comparação entre biópsia negativa e controle revelou o enriquecimento de quatro vias do Reactome, indicando uma divergência funcional menos extensa. A comparação entre biópsia positiva e biópsia negativa exibiu três anotações significativamente enriquecidas, incluindo um Processo Biológico e duas vias do Reactome (Fig. 1D).

Para delinear mais detalhadamente as distinções moleculares entre os casos com biópsia positiva e os casos sem biópsia positiva, comparamos as amostras com biópsia positiva (N = 24) com uma coorte combinada de amostras de biópsia negativa (N = 15) e controle (N = 7). Esta análise identificou 14 proteínas com abundância aumentada e 14 com abundância diminuída nos casos com biópsia positiva (Apêndice D). A análise de enriquecimento funcional revelou seis vias do Reactome significativamente enriquecidas, destacando as principais alterações moleculares associadas à biópsia positiva.

Figure 1 - Alterações Proteômicas nos Grupos com Biópsia Positiva, Biópsia Negativa e Controle



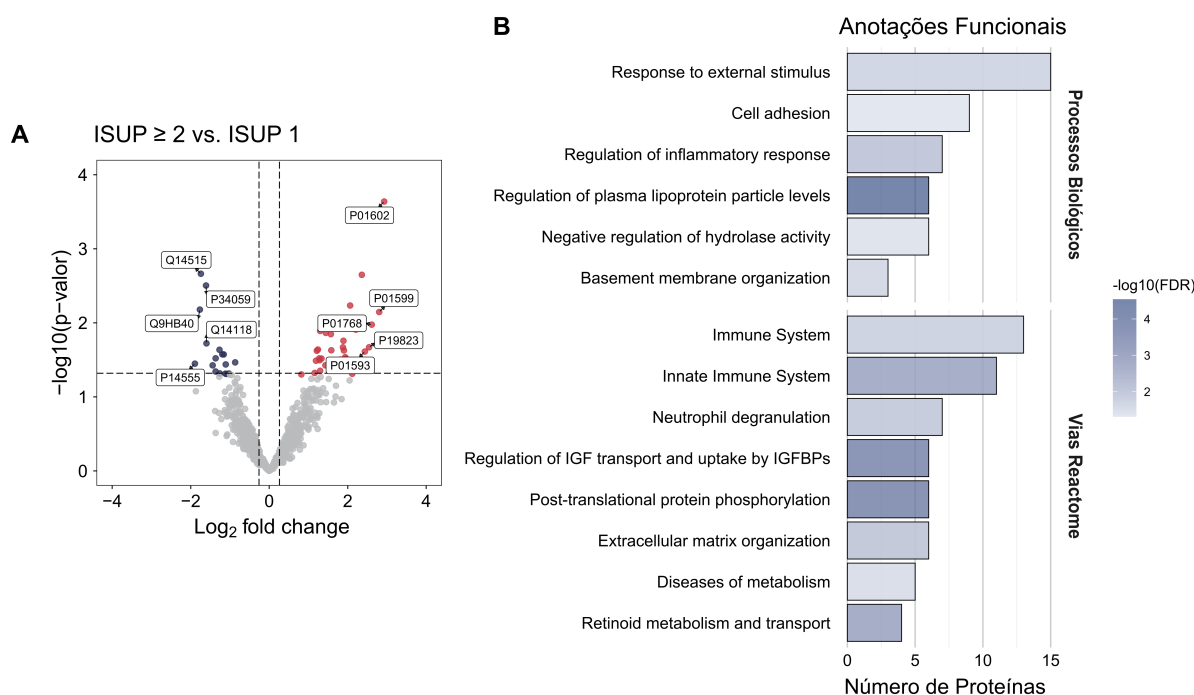
Fonte: Elaboração própria

Legenda: (A–C) Volcano plots ilustrando proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) nas comparações realizadas. As proteínas com abundância significativamente aumentada estão destacadas em vermelho, enquanto aquelas com abundância significativamente diminuída são representadas em azul (valor de $p < 0,05$ e $\log_2\text{FC} < -0,26$ ou $> 0,26$). (A) Biópsia positiva (N=24) vs. controle (N=7): foram identificadas 51 DAPs, sendo 21 com abundância aumentada e 30 com abundância diminuída. (B) Biópsia negativa (N=15) vs. controle (N=7): 29 DAPs, incluindo 13 proteínas com abundância aumentada e 16 com abundância diminuída. (C) Biópsia positiva (N=24) vs. biópsia negativa (N=15): 21 DAPs, com 12 proteínas aumentadas e 9 diminuídas. As cinco proteínas mais aumentadas e as cinco mais diminuídas estão rotuladas. (D) Análise de anotação funcional dos processos biológicos enriquecidos (termos GO) e vias do Reactome nas comparações. O tamanho dos círculos representa o número de proteínas associadas a cada termo, e a intensidade da cor indica a significância estatística ($-\log_{10}\text{FDR}$).

4.3 Alterações Proteômicas entre Câncer de Próstata Clinicamente Significativo (ISUP ≥ 2) vs. Clinicamente Insignificante (ISUP 1)

Nos pacientes com biópsia positiva, uma estratificação adicional com base no sistema de classificação da International Society of Urological Pathology (ISUP) revelou alterações proteômicas entre o câncer de próstata clinicamente significativo (ISUP ≥ 2 , N = 15) e o câncer de próstata clinicamente insignificante (ISUP 1, N = 9). A análise proteômica identificou 33 proteínas com abundância aumentada e 18 com abundância diminuída, diferenciando os casos de câncer de próstata clinicamente significativo dos clinicamente insignificantes (Fig. 2A, Apêndice E). A análise de enriquecimento funcional revelou oito vias do Reactome e seis processos biológicos enriquecidos (Fig. 2B).

Figure 2 - Alterações Proteômicas e Funcionais no Câncer de Próstata Clinicamente Significativo (ISUP ≥ 2) vs. Clinicamente Insignificante (ISUP 1)



Fonte: Elaboração própria

Legenda: (A) Volcano plot exibindo proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) entre casos de câncer de próstata clinicamente significativo (ISUP ≥ 2 , N = 15) e câncer de próstata clinicamente insignificante (ISUP 1, N = 9). As proteínas com abundância significativamente aumentada no ISUP ≥ 2 estão destacadas em vermelho, enquanto aquelas com abundância significativamente diminuída estão representadas em azul (valor de $p < 0,05$ e $\log_2\text{FC} < -0,26$ ou $> 0,26$). As cinco proteínas com maior aumento e as cinco com maior diminuição estão rotuladas. (B) Análise de anotação funcional ilustrando os processos biológicos (termos GO) e as vias do Reactome significativamente enriquecidos nos casos de ISUP ≥ 2 . O eixo x representa o número de proteínas associadas a cada via, enquanto a intensidade da cor indica a significância estatística ($-\log_{10}\text{FDR}$).

4.4 Alterações Proteômicas em Casos com Biópsia Positiva Estratificados por Grupo de Risco

Para investigar mais profundamente as diferenças proteômicas entre os casos com biópsia positiva, os pacientes foram estratificados de acordo com a classificação de risco de D'Amico atualizada — baixo risco, intermediário-favorável, intermediário-desfavorável e alto risco. As características clínicas, de imagem e histopatológicas detalhadas para esses grupos estão fornecidas na Tabela 2.

Table 2 - Características Clínicas, de Imagem e Histopatológicas dos Pacientes com Biópsia Positiva Estratificados por Grupo de Risco de D'Amico Atualizada

Características dos Pacientes	Total (N = 24)	Alto risco e intermediário desfavorável (N = 6)	Intermediário favorável (N = 9)	Baixo risco (N = 9)	p-valor
Idade em anos, mediana (IQR)	61 (59, 64)	65 (57, 69)	60 (59, 63)	61 (59, 62)	0,6
História Familiar de CP	6 (25%)	2 (33%)	1 (11%)	3 (33%)	0,6
Etnia					>0,9
Branco	20 (83%)	5 (83%)	8 (89%)	7 (78%)	
Pardo	4 (17%)	1 (17%)	1 (11%)	2 (22%)	
Comorbidades	11 (46%)	4 (67%)	5 (56%)	2 (22%)	0,3
Hipertensão arterial	6 (25%)	2 (33%)	2 (22%)	2 (22%)	>0,9
Diabetes Mellitus tipo 2	3 (13%)	2 (33%)	1 (11%)	0 (0%)	0,2
Obesidade	11 (46%)	4 (67%)	4 (44%)	3 (33%)	0,5
Dislipidemia	2 (8,3%)	1 (17%)	1 (11%)	0 (0%)	0,7
Tabagismo	2 (8,3%)	1 (17%)	1 (11%)	0 (0%)	0,5
Consumo de álcool	7 (29%)	2 (33%)	2 (22%)	3 (33%)	>0,9
Sedentarismo	6 (25%)	2 (33%)	1 (11%)	3 (33%)	0,6
História de Vasectomia	4 (17%)	1 (17%)	2 (22%)	1 (11%)	>0,9
História de Infecções Sexualmente Transmissíveis	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NA
História de Infecção Urinária	2 (8,3%)	1 (17%)	1 (11%)	0 (0%)	0,7
História Familiar de CP	6 (25%)	2 (33%)	1 (11%)	3 (33%)	0,6
Biópsia de Próstata Prévia					0,12
1 biópsia	8 (33%)	1 (17%)	2 (22%)	5 (56%)	
> 1 biópsia	3 (13%)	1 (17%)	0 (0%)	2 (22%)	
Sem biópsia prévia	13 (54%)	4 (67%)	7 (78%)	2 (22%)	
PSA Total					0,003
2,6 to 4,0 ng/mL	6 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (67%)	
4,1 to 10,0 ng/mL	15 (63%)	4 (67%)	8 (89%)	3 (33%)	
10,1 to 20,0 ng/mL	2 (8,3%)	1 (17%)	1 (11%)	0 (0%)	
> 20,0 ng/mL	1 (4,2%)	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	
Ressonância Magnética					0,06
PI-RADS 2	5 (21%)	0 (0%)	1 (11%)	4 (44%)	
PI-RADS 3	9 (38%)	3 (50%)	2 (22%)	4 (44%)	
PI-RADS 4	7 (29%)	1 (17%)	5 (56%)	1 (11%)	
PI-RADS 5	2 (8,3%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	
Biópsia com Fusão	16 (67%)	4 (67%)	7 (78%)	5 (56%)	0,5
Achados Histopatológicos					
Proliferação Atípica de Pequenos Ácinos (ASAP)	2 (8,3%)	0 (0%)	1 (11%)	1 (11%)	>0,9
Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN)	1 (4,2%)	0 (0%)	1 (11%)	0 (0%)	>0,9
Adenocarcinoma Ductal	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NA
Tumor Neuroendócrino	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NA
Padrão Cribiforme	4 (17%)	4 (67%)	0 (0%)	0 (0%)	0,001
Incasão Perineural	4 (17%)	2 (33%)	2 (22%)	0 (0%)	0,3
Invasão Angiolinfática	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	NA
ISUP (International Society of Urological Pathology)					<0,001
Grau 1	9 (38%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (100%)	
Grau 2	10 (42%)	1 (17%)	9 (100%)	0 (0%)	
Grau 3	3 (13%)	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	
Grau 4	2 (8,3%)	2 (33%)	0 (0%)	0 (0%)	

Fonte: Elaboração própria

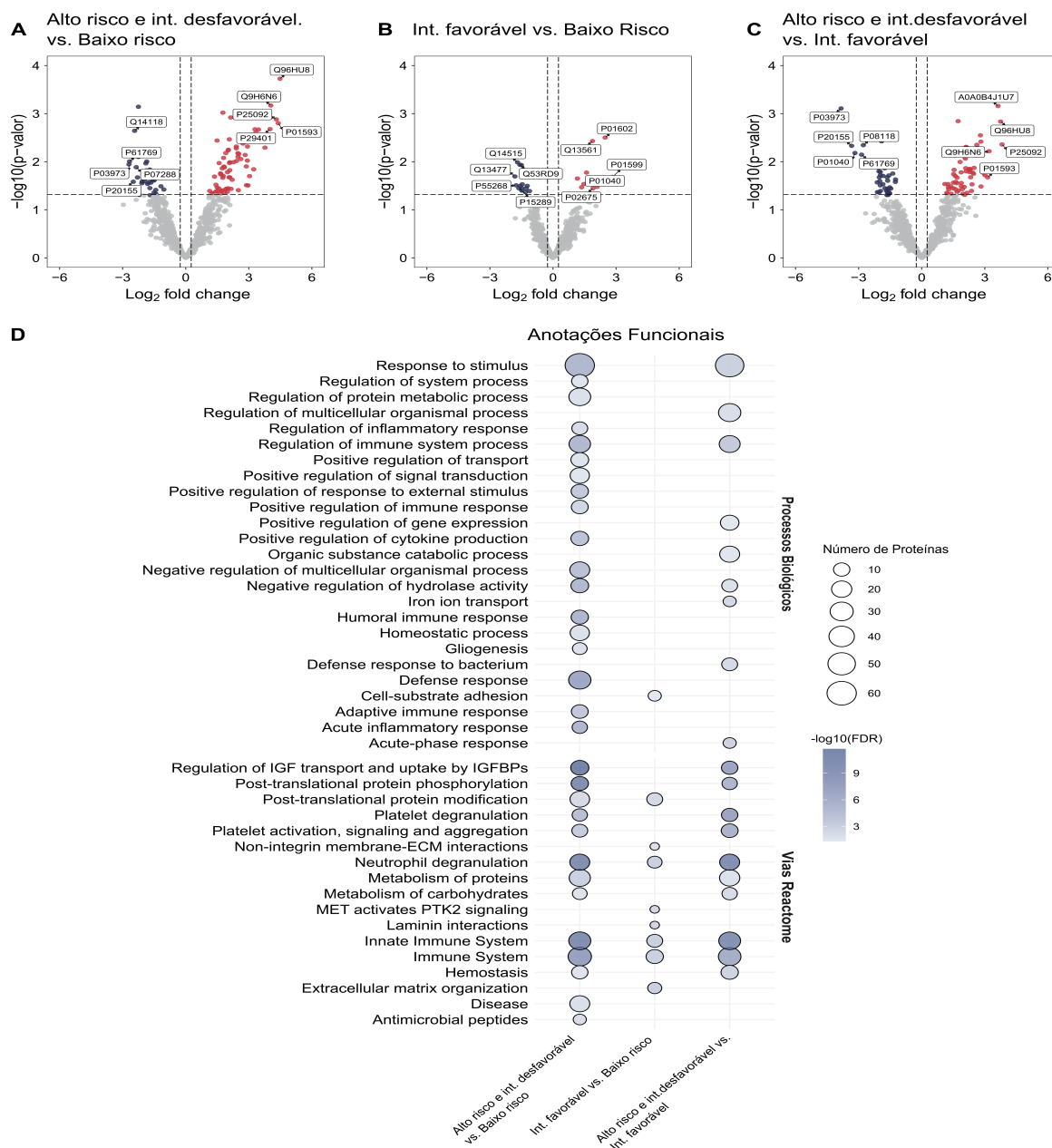
As análises proteômicas comparativas revelaram assinaturas moleculares distintas associadas à gravidade da doença. Na comparação entre alto risco e intermediário-desfavorável versus baixo risco, 76 proteínas exibiram abundância aumentada, enquanto 38 apresentaram diminuição na abundância (Fig. 3A; Apêndice F). A análise de enriquecimento funcional identificou 18 processos biológicos significativamente enriquecidos e 13 vias do Reactome.

A comparação entre intermediário-favorável e baixo risco revelou uma divergência proteômica mais restrita, com 11 proteínas de abundância aumentada e 15 com abundância diminuída (Fig. 3B; Apêndice G). A análise de anotação funcional destacou um processo biológico enriquecido e sete vias do Reactome, indicando uma mudança funcional menos extensa.

Uma alteração proteômica mais ampla foi observada na comparação entre alto risco e intermediário-desfavorável versus intermediário-favorável, com 59 proteínas exibindo abundância aumentada e 40 mostrando diminuição na abundância (Fig. 3C; Apêndice H). A análise de enriquecimento identificou 10 processos biológicos e 10 vias do Reactome significativamente enriquecidos, enfatizando as diferenças moleculares entre os casos de maior risco e intermediário.

As anotações para todas as vias e processos biológicos enriquecidos estão apresentadas na Figura 3D, fornecendo uma visão abrangente das alterações proteômicas nos diferentes grupos de risco.

Figure 3 - Alterações Proteômicas em Casos com Biópsia Positiva Estratificados por Grupo de Risco



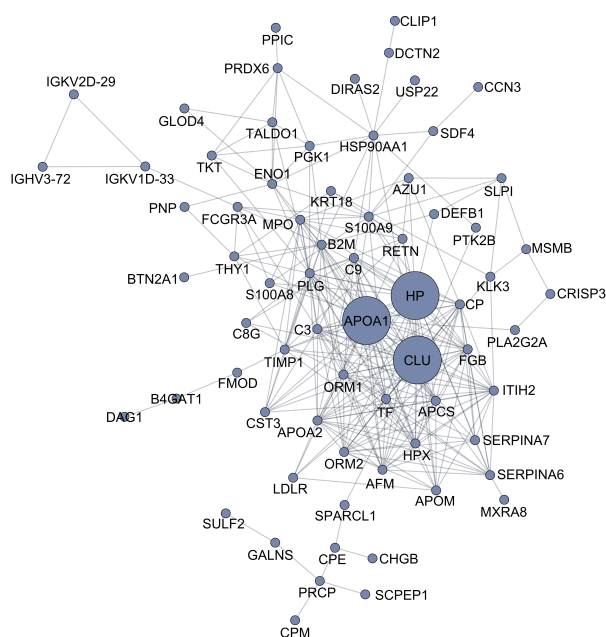
Fonte: Elaboração própria

Legenda: (A–C) Volcano plots ilustrando proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) nas comparações entre grupos de risco. As proteínas com abundância significativamente aumentada estão destacadas em vermelho, enquanto aquelas com abundância significativamente diminuída são representadas em azul (valor de $p < 0,05$ e $\log_2\text{FC} < -0,26$ ou $> 0,26$). As cinco proteínas com maior aumento e as cinco com maior diminuição em cada comparação estão rotuladas. (A) Alto risco e intermediário-desfavorável vs. baixo risco: 76 proteínas exibiram aumento na abundância, enquanto 38 apresentaram diminuição. (B) Intermediário-favorável vs. baixo risco: 11 proteínas apresentaram aumento e 15 diminuição. (C) Alto risco e intermediário-desfavorável vs. intermediário-favorável: 59 proteínas mostraram aumento na abundância, enquanto 40 apresentaram diminuição. As cinco proteínas com maior aumento e as cinco com maior diminuição estão rotuladas. (D) Análise de anotação funcional dos processos biológicos enriquecidos (termos GO) e vias do Reactome nas comparações entre grupos de risco. O tamanho dos círculos representa o número de proteínas associadas a cada termo, enquanto a intensidade da cor indica a significância estatística ($-\log_{10}\text{FDR}$).

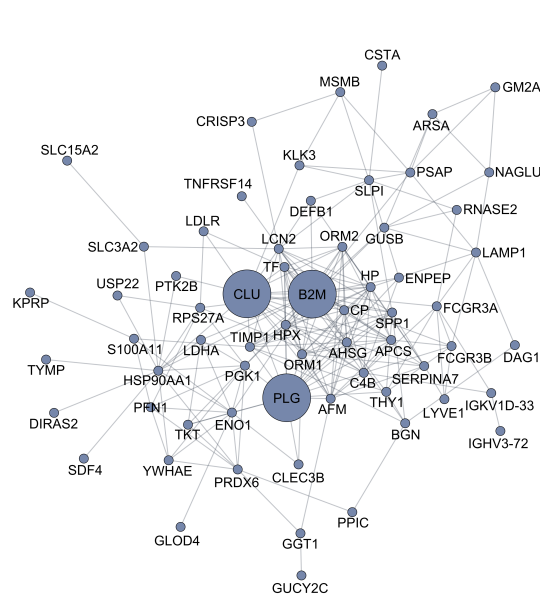
Para explorar mais detalhadamente as interações moleculares subjacentes a essas alterações proteômicas, foram construídas redes de interação proteína-proteína (PPI) para as comparações com um número suficiente de DAPs. Na comparação entre alto risco e intermediário-desfavorável versus baixo risco, a rede consistiu em 70 nós e 288 interações (Fig. 4A). Proteínas-chave foram identificadas com base em um corte de grau > 23, significando que os nós com valores de conectividade acima desse limite foram considerados reguladores centrais dentro da rede. Aaptoglobina (HP, P00738, grau = 27, $\log_2FC = 2,88$), Apolipoproteína A-I (APOA1, P02647, grau = 26, $\log_2FC = 1,65$) e Clustina (CLU, P10909, grau = 26, $\log_2FC = -1,88$) surgiram como proteínas hub principais, sugerindo seu potencial papel na progressão da doença de alto risco.

Figure 4 - Redes de Interação Proteína-Proteína nos Grupos de Risco do Câncer de Próstata

A Alto risco e intermediário desfavorável vs. Baixo risco



B Alto risco e intermediário desfavorável vs. Intermediário favorável



Fonte: Elaboração própria

Legenda: (A) Rede de interação proteína-proteína (PPI) para a comparação entre alto risco e intermediário-desfavorável vs. baixo risco, mostrando proteínas centrais com alta conectividade. (B) Rede PPI para a comparação entre alto risco e intermediário-desfavorável vs. intermediário-favorável, destacando proteínas com papéis regulatórios centrais. Os nós representam proteínas, e as arestas indicam interações. O tamanho dos nós corresponde ao grau de conectividade, com as proteínas altamente conectadas atuando como potenciais reguladores centrais na progressão do câncer de próstata.

Na comparação entre intermediário-favorável e baixo risco, nenhuma rede de interação significativa foi formada devido ao baixo número de DAPs, indicando uma divergência proteômica mais sutil entre esses grupos de risco. Para a comparação entre alto risco e intermediário-desfavorável versus intermediário-favorável, a rede consistiu em 64 nós e 219 interações (Fig. 4B). As proteínas hub principais foram identificadas com base em um corte de grau > 17 , selecionando nós com valores de conectividade acima desse limite. Os principais nós incluíram Beta-2-microglobulina (B2M, P61769, grau = 22, $\log_2FC = -2,86$), Clustina (CLU, P10909, grau = 19, $\log_2FC = -2,03$) e Plasminogênio (PLG, P00747, grau = 18, $\log_2FC = 2,07$).

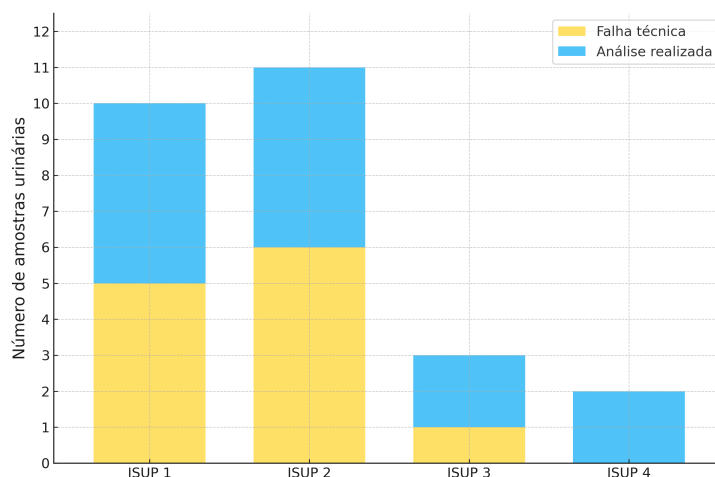
4.5 Fusão *TMPRSS2-ERG* por NGS

As amostras de urina pós-ejaculatória e de tecido tumoral de 26 participantes com diagnóstico confirmado de adenocarcinoma de próstata por biópsia foram incluídas para investigação da presença da fusão gênica *TMPRSS2-ERG* por sequenciamento de nova geração.

A análise do tecido tumoral foi concluída em 16 dos 26 pacientes (62%). Nos 10 casos restantes (38%), não foi possível realizar a avaliação devido à inadequação ou indisponibilidade das amostras arquivadas em bloco de parafina para extração de RNA. Entre os 16 casos analisados, a fusão *TMPRSS2-ERG* foi detectada em 5 pacientes (31%).

Foram processadas amostras de urina pós-ejaculatória de todos os 26 pacientes incluídos no estudo. Em 12 casos (46%), não foi possível concluir a análise devido a falhas na extração do RNA (Fig. 5). Nas 14 amostras com processamento bem-sucedido (54%), a fusão *TMPRSS2-ERG* foi detectada em 6 pacientes (43%).

Figure 5 - Efetividade da análise da fusão *TMPRSS2-ERG* em amostras de urina pós-ejaculatória, segundo o grau ISUP

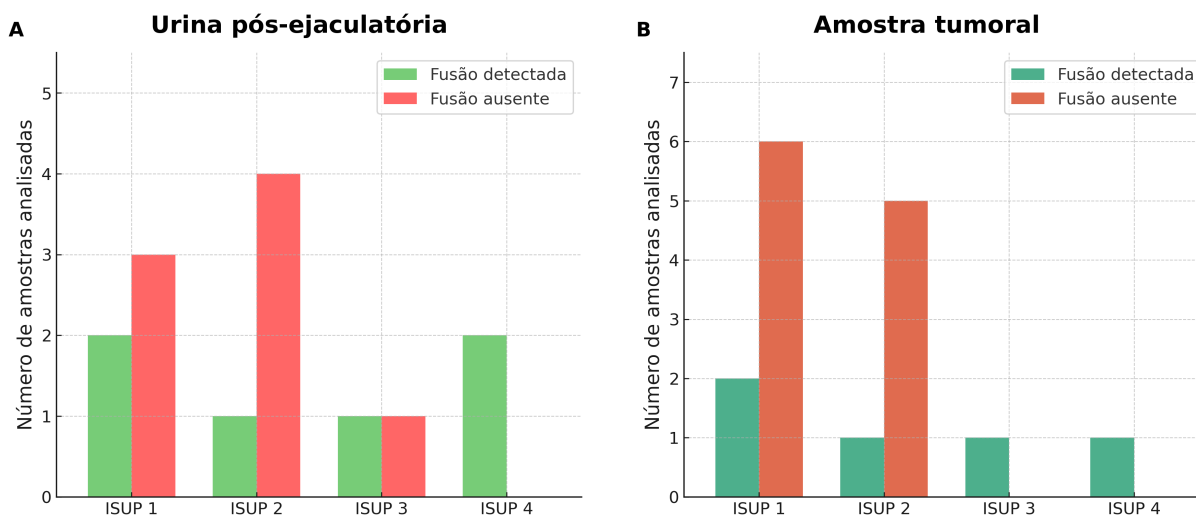


Fonte: Elaboração própria

Legenda: Distribuição do número de amostras urinárias coletadas por grupo de escore ISUP, discriminando os casos em que a análise molecular foi realizada com sucesso (em azul) daqueles em que houve falha técnica na detecção da fusão gênica (em amarelo).

Quando estratificados de acordo com o escore de graduação ISUP, observou-se maior frequência de detecção da fusão *TMPRSS2-ERG* nos grupos de maior grau. No grupo ISUP 1, a fusão foi identificada em 2 de 8 amostras tumorais analisadas (25%) e em 2 de 5 amostras urinárias válidas (40%). Entre os pacientes com ISUP 2, a fusão foi observada em 1 de 6 amostras tumorais (16,7%) e em 1 de 5 urinárias (20%). No grupo ISUP 3, a fusão foi observada em 1 de 1 amostra tumoral (100%) e em 1 de 2 urinárias (50%). Já no grupo ISUP 4, a detecção ocorreu em 1 de 1 amostra tumoral (100%) e em 2 de 2 urinárias (100%) (Fig. 6).

Figure 6 - Detecção da fusão gênica *TMPRSS2-ERG* por NGS segundo o grau ISUP



Fonte: Elaboração própria

Legenda: Distribuição do número de amostras com fusão detectada (em verde) e fusão ausente (em vermelho), de acordo com o escore ISUP, nas análises realizadas por sequenciamento de nova geração (NGS) em (A) urina pós-ejaculatória e (B) tecido tumoral.

Entre os 9 pacientes com análise técnica viável em ambas as matrizes, observou-se concordância total entre os resultados. A fusão *TMPRSS2-ERG* foi detectada simultaneamente em 4 pacientes, enquanto os demais 5 apresentaram resultados negativos em ambas as amostras. O coeficiente kappa estimado para essa comparação foi de 1,0, indicando concordância perfeita entre as matrizes avaliadas.

5 DISCUSSÃO

A presente tese investigou o câncer de próstata por meio da urina pós-ejaculatória, proposta aqui como matriz alternativa para caracterização molecular da doença. Foram conduzidas duas abordagens independentes: a análise proteômica por espectrometria de massas com aquisição dependente de dados e a detecção da fusão gênica TMPRSS2–ERG por sequenciamento de nova geração. Até onde se tem conhecimento, trata-se do primeiro estudo a aplicar essas metodologias à urina pós-ejaculatória, contribuindo com dados originais sobre a viabilidade técnica e a relevância exploratória dessa matriz.

5.1 Análise proteômica da urina pós-ejaculatória

Para a etapa proteômica, utilizou-se espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida de alta resolução (LC-MS/MS), com aquisição dependente de dados (DDA), aplicada à urina pós-ejaculatória. Essa combinação permitiu a identificação e quantificação de centenas de proteínas, com ampla cobertura do proteoma urinário, compatível com estudos de alta complexidade.

Estudos anteriores com amostras urinárias em câncer de próstata utilizaram metodologias variadas e, na maioria dos casos, envolveram tamanhos amostrais semelhantes e menor cobertura proteômica global. Davaliev et al., por exemplo, aplicaram 2D-DIGE acoplado a LC-MS/MS em urina pós-toque retal, com análise de 36 casos (76). Fujita et al. analisaram vesículas extracelulares urinárias por iTRAQ-LC-MS/MS, com apenas 18 amostras na fase de descoberta (87). De forma semelhante, Bergamini et al. investigaram 37 pacientes com câncer de próstata, utilizando pools de urina espontânea submetidos à análise por 2D-E acoplada à espectrometria de massas, com abordagem limitada pelo uso de amostras agrupadas (88). Já Frantzi et al. avaliaram uma coorte maior, de 543 pacientes, porém com foco restrito a peptídeos de baixo peso molecular por CE-MS, sem explorar o proteoma completo (89). Considerando esses aspectos, o presente estudo reuniu não apenas um número amostral competitivo no contexto de investigações proteômicas urinárias, como também adotou delineamento individualizado e abordagem analítica de maior abrangência.

A análise da urina pós-ejaculatória identificou 51 DAPs entre pacientes com biópsia positiva para câncer de próstata (CP+) e indivíduos controle, das quais 21 apresentaram abundância aumentada e 30 reduzida. Esse total supera o observado em estudos anteriores com matriz urinária. Davaliev et al., por exemplo, identificaram 23 DAPs em urina pós-toque retal utilizando 2D-DIGE seguido de LC-MS/MS (76). Já Fujita et al., embora tenham quantificado mais de 3.500 proteínas em vesículas extracelulares urinárias, selecionaram apenas 11 como diferencialmente expressas entre pacientes com câncer e biópsia negativa (87). Apesar das diferenças metodológicas, esses dados reforçam que a abordagem utilizada nesta tese foi capaz de capturar um número expressivo de alterações proteômicas.

Além da comparação entre CP+ e controle, o presente estudo revelou diferenças relevantes em subgrupos com características prognósticas distintas. Foram identificadas 114 DAPs entre pacientes de risco clínico baixo versus intermediário-desfavorável ou alto, e 51 DAPs entre tumores ISUP 1 e ISUP ≥ 2 . Comparações urinárias com estratificação clínica e histológica são raras na literatura.

Um dos poucos estudos com essa proposta foi conduzido por Bergamini et al., que analisaram pools de urina espontânea por espectrometria 2D-E/MS com o objetivo de distinguir grupos com diferentes riscos clínicos de progressão tumoral (88). Embora o estudo não tenha quantificado o número total de DAPs, os autores relataram alterações qualitativas no perfil proteômico entre os grupos, validadas parcialmente por Western blot. Apesar de limitações metodológicas, como o uso de amostras agrupadas e tamanho amostral reduzido, o estudo forneceu evidências preliminares de que a urina pode ser útil para diferenciação prognóstica. A presente análise, ao adotar delineamento individualizado e comparações estratificadas, amplia esse escopo e oferece uma abordagem complementar.

Estratégias similares de estratificação proteômica têm sido aplicadas a tecidos prostáticos. Zhong et al., por exemplo, identificaram 143 DAPs entre tumores com diferentes graus histológicos, das quais 35 foram selecionadas com base em consistência e relevância biológica. A partir desse subconjunto, os autores desenvolveram uma assinatura de 18 proteínas com valor prognóstico para recorrência bioquímica (90). Embora baseada em tecido, tal achado reforça o potencial das assinaturas moleculares derivadas da estratificação proteômica.

Em síntese, embora o número de DAPs varie conforme a metodologia e o delineamento dos estudos, os achados desta tese se destacam pela combinação entre tecnologia de alta cobertura (LC-MS/MS com DDA), uso inovador da urina pós-ejaculatória e análises estratificadas por critérios clínicos e histológicos.

Revisões da literatura têm alertado para a elevada frequência de identificações proteômicas sem relevância clínica comprovada, muitas vezes relacionadas a proteínas de função inespecífica, envolvidas em processos inflamatórios ou metabólicos, ou ainda representando artefatos decorrentes das matrizes biológicas analisadas (75,91,92). Esse cenário reforça a necessidade de uma abordagem seletiva e crítica na escolha dos alvos discutidos em maior profundidade. Desta forma, optou-se por restringir a discussão a proteínas diferencialmente abundantes selecionadas com base em maior magnitude de variação ($\log_2FC$) e/ou maior frequência de detecção em um dos grupos. A partir desse recorte, foram incluídas na discussão apenas as proteínas que atendiam a pelo menos um dos seguintes critérios: exclusividade de detecção; evidência funcional prévia de envolvimento no câncer de próstata; ou achado potencialmente inédito, com plausibilidade biológica e interesse exploratório.

Seis proteínas foram identificadas exclusivamente nos grupos com indicação clínica de biópsia, sem qualquer detecção nas amostras do grupo controle: Miosina-9 (MYH9), Fator de crescimento semelhante à EGF ligado a heparina (HBEGF), Sintase de espermina (SMS), Protease de lectina ligadora de manose 1 (LMAN1), Fosfo-histidina fosfatase de 14 kDa (PHPT1) e Beta-defensina 121 (DEFB121).

Entre elas, MYH9, HBEGF e SMS já foram associadas ao câncer de próstata em estudos prévios, estando envolvidas em processos como adesão celular, ativação do receptor androgênico, proliferação tumoral e vias de transição epitélio-mesenquimal (93–95). Já LMAN1 e PHPT1, apesar de não relacionadas diretamente à próstata, foram descritas em neoplasias como cólon, rim e pulmão, com possíveis papéis na instabilidade genômica ou agressividade tumoral (96,97). A DEFB121, por sua vez, é predominantemente expressa no epidídimo humano, com provável função na imunidade local, sem vínculos estabelecidos com carcinogênese (98). A detecção restrita dessas proteínas aos grupos com suspeita clínica reforça seu potencial como alvos exploratórios.

Diversas DAPs identificadas neste estudo já foram previamente associadas ao câncer de próstata, reforçando a validade biológica da matriz analisada. No grupo

CP+ em comparação ao controle, observou-se aumento da Hidrolase de ubiquitina C-terminal 22 (USP22), desubiquitinase ligada à progressão tumoral e resistência terapêutica (99). A tiorredoxina 5 (TXNDC5), por outro lado, apresentou abundância reduzida, em contraste com dados teciduais que descrevem sua superexpressão em doença resistente à castração (100). A Caderina 11 (CDH11), relacionada à metástase óssea em modelos experimentais, também esteve aumentada neste grupo (101,102).

Na comparação CP+ vs. CP–, destacou-se a Testicana-1 (SPOCK1), proteína da matriz extracelular associada à transição epitélio-mesenquimal e invasividade tumoral, aqui identificada com abundância aumentada na urina pós-ejaculatória (103). Entre os pacientes com ISUP ≥ 2 , observou-se abundância reduzida de Proteína semelhante à SPARC 1 (SPARCL1), Fosfolipase A2 do grupo IIA (PLA2G2A) e Distroglicano 1 (DAG1), proteínas associadas à preservação da integridade epitelial e à regulação de vias antiproliferativas, cuja perda tem sido relacionada a maior agressividade e pior prognóstico no câncer de próstata (104–107). No grupo de maior risco clínico, observou-se aumento da Transcetolase (TKT), associada à reprogramação metabólica tumoral, e abundância diminuída de Caliceína-3 (KLK3), Proteassoma subunidade alfa tipo 7 (PSMA7), Aminopeptidase Xaa-Pro 2 (XPNPEP2) e Beta-microglobulina 2 (B2M). Essas proteínas participam de vias relevantes na biologia do câncer de próstata, incluindo sinalização androgênica, proteólise, modulação imune e progressão metastática, sendo previamente relacionadas a fenótipos clínicos mais agressivos (108–112).

Outras DAPs neste estudo, embora não associadas diretamente ao câncer de próstata, já foram implicadas em neoplasias de diferentes origens, incluindo rim, pulmão, fígado, cólon e bexiga. Entre elas, destacam-se Fosfo-histidina fosfatase 1 (PHPT1), Endo-alfa-manosidase (MAN1B1), Glicoproteína rica em histidina (HRG), Aminoacilase-1 (ACY1) e Proteína semelhante à Seizure 6 tipo 2 (SEZ6L2), cujos papéis descritos incluem regulação de vias de sinalização celular, metabolismo de aminoácidos, modulação imune e angiogênese (96,113–117). A identificação dessas proteínas relacionadas a outras neoplasias reforça a plausibilidade biológica da matriz analisada e sua capacidade de refletir alterações moleculares associadas à oncogênese.

A análise funcional das proteínas diferencialmente expressas revelou ativação recorrente de processos biológicos relacionados à imunidade inata, inflamação,

remodelamento da matriz extracelular, metabolismo e sinalização celular. Esses padrões foram especialmente evidentes na comparação entre pacientes com biópsia positiva para câncer de próstata e controles, assim como nas comparações grau histológico e entre grupos de maior risco clínico – alto e intermediário-desfavorável – em relação ao baixo risco. Embora os perfis proteômicos tenham variado entre os grupos analisados, o conjunto das vias enriquecidas aponta para eixos funcionais convergentes, compatíveis com a biologia tumoral prostática. A interpretação funcional foi conduzida com base na combinação de bases complementares (GO e Reactome), o que ampliou a abrangência descritiva e a especificidade bioquímica da análise, permitindo comparações integradas entre diferentes grupos clínicos e histológicos.

O enriquecimento funcional das vias relacionadas ao sistema imune, à imunidade inata e à degranulação de neutrófilos obtiveram destaque na comparação entre pacientes com câncer de próstata ISUP ≥ 2 e aqueles com ISUP 1. Esse padrão pode refletir ativação de componentes inflamatórios e imunológicos em tumores de maior grau histológico, compatível com estados funcionais mais pronunciados. Embora estudos prévios tenham apontado modulação imunológica em perfis urinários de pacientes com câncer de próstata, a presente análise amplia esse achado ao demonstrar sua associação com a estratificação histológica da doença (87,118).

A identificação de vias relacionadas à organização e degradação da matriz extracelular aponta para o envolvimento de mecanismos de remodelamento tecidual no microambiente tumoral. O predomínio de proteínas associadas a esses processos nos grupos com câncer pode refletir fenômenos de proteólise e reorganização estromal — previamente descritos em análises de urina espontânea e de tecido prostático no contexto da progressão neoplásica (89,119,120).

Vias relacionadas à sinalização intracelular, modificação pós-traducional e síntese proteica — como fosforilação, tradução e transporte de fatores de crescimento — também se destacaram entre os processos enriquecidos, sobretudo nas comparações entre tumores ISUP ≥ 2 e ISUP 1 e entre grupos de maior risco clínico em relação ao baixo risco. Esse padrão sugere maior atividade funcional em tumores mais agressivos, com aumento da tradução e da modificação covalente de proteínas. Estudos anteriores conduzidos com tecido tumoral e urina espontânea

também demonstraram o enriquecimento de proteínas ribossomais e vias biossintéticas em casos de câncer de próstata de alto grau (89,119).

Apesar dos resultados obtidos refletirem aspectos relevantes da biologia tumoral prostática, é importante reconhecer que as análises de enriquecimento funcional baseadas em GO e Reactome apresentam limitações. Entre elas, destacam-se a redundância semântica entre termos, a curadoria desigual entre processos bem descritos e vias pouco exploradas, e a ausência de anotação funcional para proteínas ainda não caracterizadas experimentalmente, o que pode comprometer a interpretação de determinados achados.

A análise das redes de interação proteína-proteína (PPI) revelou arquiteturas moleculares progressivamente mais organizadas e interconectadas quando os grupos de risco clínico foram comparados, especialmente entre tumores de maior e menor agressividade. Essas redes foram compostas por DAPs com elevado grau de conectividade funcional. Esse padrão indica uma reconfiguração gradual da rede proteica ao longo do espectro de risco clínico do câncer de próstata, acessível por meio da urina pós-ejaculatória.

Na comparação entre pacientes de alto risco e intermediário-desfavorável versus baixo risco clínico, a rede gerada (70 nós e 288 interações) destacou a haptoglobina (HP), Apolipoproteína A1 (APOA1) e Clusterina (CLU) como os principais hubs. Essas proteínas já foram previamente reportadas como diferencialmente abundantes na urina de pacientes com câncer de próstata por estudos como os de Davaliev et al. (HP e APOA1) e Dong et al. (CLU) (118,121). No entanto, sua caracterização como elementos centrais em redes de interação proteína-proteína, associadas a grupos de maior risco clínico, representa um aspecto adicional e inédito.

Na comparação entre alto risco e intermediário-desfavorável versus intermediário-favorável, a rede (64 nós e 219 interações) novamente apontou a CLU como elemento central, juntamente com a Beta-microglobulina 2 (B2M) e Plasminogênio (PLG). A B2M já foi associada, tanto em soro quanto em urina, a formas mais agressivas, avançadas e metastáticas do câncer de próstata, incluindo evidências de regulação por andrógenos em modelos celulares (112,122,123). Em uma coorte de pacientes com metástases ósseas, níveis urinários elevados de B2M também se correlacionaram com menor sobrevida global (124). Sua posição central nas redes de interação proteína-proteína observadas reforça sua participação na

organização molecular associada à progressão tumoral prostática. O PLG, por sua vez, foi previamente associado à suscetibilidade genética ao câncer de próstata, e seu achado nesta matriz contribui para ampliar o conhecimento sobre esse eixo biológico (125).

Esses achados se alinham aos princípios estruturais da biologia de redes descritos por Barabási et al. e Jeong et al., segundo os quais proteínas com alta conectividade (hubs) tendem a desempenhar funções essenciais, reguladoras e sensíveis a perturbações funcionais. Redes PPI com essa arquitetura refletem uma organização modular e hierárquica que responde ao estado fisiopatológico do sistema biológico analisado (126,127). De forma complementar, conforme demonstrado por Yu et al., os hubs atuam como pontos de convergência entre diferentes módulos funcionais em redes biológicas (128). Essa propriedade estrutural é compatível com a integração de vias inflamatórias, metabólicas e imunológicas, processos amplamente implicados na biologia do câncer de próstata e corroborados pelo presente estudo.

Entre as limitações da avaliação proteômica realizada nesta tese, destaca-se o número reduzido do grupo controle, dos subgrupos clínicos e histológicos, o que compromete a realização de inferências estatísticas mais robustas. Houve dificuldade no recrutamento e na adesão dos pacientes à coleta pós-ejaculatória, possivelmente relacionada a barreiras pessoais ou constrangimentos associados à coleta da matriz. Tais fatores podem restringir a aplicabilidade ampla da técnica em etapas subsequentes de validação, cenários de rastreamento populacional ou prática clínica cotidiana. Cabe ainda destacar a ausência de pacientes negros na amostra, o que limita a representatividade em relação à população brasileira e reflete predominantemente o perfil da saúde suplementar. Adicionalmente, a ausência de análise paralela com urina espontânea restringe a interpretação sobre o impacto específico da ejaculação no perfil proteômico. Ainda assim, os resultados obtidos oferecem base experimental sólida e original, com potencial para orientar futuras validações funcionais e o desenvolvimento de estratégias não invasivas de caracterização molecular no câncer de próstata.

5.2 Detecção da fusão *TMPRSS2-ERG* por sequenciamento de nova geração (NGS)

A fusão gênica *TMPRSS2-ERG* é um dos eventos moleculares mais frequentes no câncer de próstata, descrita inicialmente por Tomlins et al. (2005) em aproximadamente 50% dos casos. Sua relevância biológica decorre da ativação transcricional do oncogene ERG sob o controle do promotor do gene *TMPRSS2*, induzida por estímulo androgênico, resultando em alterações na diferenciação epitelial, aumento da invasividade e progressão tumoral (129,130). A avaliação dessa fusão vem sendo explorada tanto em tecido tumoral quanto em amostras não invasivas, como urina e plasma, com potenciais aplicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas. No presente estudo, utilizou-se a plataforma de sequenciamento de nova geração, com o painel Oncomine Focus Fusion, para investigar a presença da fusão *TMPRSS2-ERG* em amostras pareadas de tecido prostático e urina pós-ejaculatória, com o objetivo de explorar a viabilidade técnica e a frequência de detecção em ambas as matrizes.

A análise da fusão *TMPRSS2-ERG* por NGS foi realizada com sucesso em todas as amostras de tecido tumoral disponíveis, sendo a exclusão de alguns casos decorrente exclusivamente da indisponibilidade de material parafinado, limitação comum em estudos com amostras arquivadas.

Em contrapartida, a análise em urina foi comprometida por falhas técnicas em 12 dos 26 pacientes (46%), principalmente durante as etapas de extração ou amplificação do RNA, impactando negativamente o desempenho global do método nesta matriz. A ausência de estabilizante de RNA no momento da coleta pode ter favorecido a degradação enzimática precoce, especialmente diante do intervalo entre coleta, centrifugação e congelamento, configurando uma limitação metodológica que pode ter contribuído para esse resultado.

A fusão *TMPRSS2-ERG* foi detectada em 5 de 16 casos (31%) na matriz tumoral. Já nas amostras de urina pós-ejaculatória com processamento bem-sucedido, a detecção ocorreu em 6 de 14 pacientes (43%). Esses resultados são comparáveis às taxas relatadas por Tomlins et al., que detectaram a fusão *TMPRSS2-ERG* em 46% a 72% das amostras urinárias com RNA informativo, utilizando RT-qPCR padronizado em urina pós-toque retal, com controle interno baseado na expressão de PSA (132). Embora a metodologia empregada no

presente estudo seja distinta, os achados reforçam a viabilidade da urina pós-ejaculatória como fonte não invasiva para análise transcricional da fusão gênica, desde que condições pré-analíticas adequadas sejam asseguradas.

A fusão *TMPRSS2-ERG* foi detectada em amostras tumorais e urinárias de pacientes com diferentes graus histológicos, com frequência crescente nos grupos ISUP mais elevados, sugerindo uma possível associação entre a presença da fusão e tumores mais agressivos. Esse padrão foi descrito por Hägglöf et al., que identificaram maior frequência da fusão em tecidos tumorais de neoplasias prostáticas agressivas (133). Os achados do presente estudo contribuem para o entendimento preliminar do comportamento da fusão *TMPRSS2-ERG* ao longo do espectro histológico do câncer de próstata, com base em uma matriz não invasiva.

Foi observada concordância total entre os resultados obtidos nas nove amostras com análise técnica viável em ambas as matrizes: a fusão *TMPRSS2-ERG* foi simultaneamente detectada em quatro casos e ausente em cinco. O coeficiente kappa estimado foi de 1,0, indicando concordância perfeita entre urina pós-ejaculatória e tecido tumoral na detecção da fusão gênica. Esse achado sugere que, sob condições técnicas adequadas, o sequenciamento de nova geração da urina pós-ejaculatória pode refletir com fidelidade a presença da fusão gênica observada no tecido prostático.

A etapa de avaliação da fusão *TMPRSS2-ERG* por NGS nesta tese apresenta limitações. O tamanho amostral reduzido, especialmente após a exclusão de casos inviáveis por limitações técnicas ou logísticas, restringe o poder estatístico e a possibilidade de generalização dos resultados. Além disso, a inclusão exclusiva de pacientes com biópsia positiva para adenocarcinoma da próstata introduz viés de seleção e impede a avaliação da especificidade da técnica frente a indivíduos sem neoplasia. Adicionalmente, a detecção da fusão não foi acompanhada de validação com métodos alternativos previamente consolidados, como FISH, RT-qPCR ou imuno-histoquímica, o que limita a comparação direta com plataformas convencionais. Também não foram realizadas coletas de urina basal ou pós-toque retal, impossibilitando avaliar isoladamente o impacto da ejaculação sobre a liberação urinária do RNA prostático.

Apesar dessas restrições, as dificuldades técnicas enfrentadas ao longo do processo — especialmente na manipulação do RNA urinário — proporcionaram aprendizado prático relevante, contribuindo para o aperfeiçoamento de protocolos

laboratoriais e para o acúmulo de expertise institucional na condução de análises moleculares em matrizes biológicas alternativas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados desta tese demonstram que a urina pós-ejaculatória pode refletir alterações funcionais e moleculares associadas ao câncer de próstata. Trata-se de um estudo inédito ao aplicar espectrometria de massas e NGS a essa matriz, com delineamento individualizado e comparações estratificadas. A análise proteômica por LC-MS/MS com aquisição dependente de dados (DDA) revelou um conjunto expressivo de proteínas diferencialmente abundantes, enquanto a detecção da fusão *TMPRSS2-ERG* por NGS mostrou viabilidade técnica e alta concordância com o tecido tumoral. Apesar das limitações amostrais e logísticas, os achados fornecem base experimental sólida e inovadora para futuras validações e para o desenvolvimento de estratégias não invasivas de caracterização molecular no câncer de próstata.

7 REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Kratzer TB, Giaquinto AN, Sung H, Jemal A. Cancer statistics, 2025. *CA Cancer J Clin.* janeiro de 2025;75(1):10–45.
2. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer. 2023.
3. Hemminki K. Familial risk and familial survival in prostate cancer. Vol. 30, *World Journal of Urology*. 2012. p. 143–8.
4. Ewing CM, Ray AM, Lange EM, Zuhlke KA, Robbins CM, Tembe WD, et al. Germline Mutations in HOXB13 and Prostate-Cancer Risk A b s t r a c t. Vol. 366, *n engl j med*. 2012.
5. Lynch HT, Kosoko-Lasaki O, Leslie SW, Rendell M, Shaw T, Snyder C, et al. Screening for familial and hereditary prostate cancer. Vol. 138, *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc.; 2016. p. 2579–91.
6. Bergengren O, Pekala KR, Matsoukas K, Fainberg J, Mungovan SF, Bratt O, et al. 2022 Update on Prostate Cancer Epidemiology and Risk Factors—A Systematic Review. Vol. 84, *European Urology*. Elsevier B.V.; 2023. p. 191–206.
7. Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma.
8. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. 2015.
9. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *Eur Urol*. 1º de março de 2016;69(3):428–35.
10. D'amico A V, Whittington R, Malkowicz SB, Fondurulia J, Chen MH, Kaplan I, et al. Pretreatment Nomogram for Prostate-Specific Antigen Recurrence After Radical Prostatectomy or External-Beam Radiation Therapy for Clinically Localized Prostate Cancer. Vol. 17, *J Clin Oncol*. 2019.
11. Brierley JD et al. TNM classification of malignant tumors. 8º ed. 2017.
12. Naji L, Randhawa H, Sohani Z, Dennis B, Lautenbach D, Kavanagh O, et al. Digital rectal examination for prostate cancer screening in primary care: A systematic review and meta-analysis. Vol. 16, *Annals of Family Medicine*. Annals of Family Medicine, Inc; 2018. p. 149–54.
13. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: Results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *Journal of Urology*. 1994;151(5):1283–90.
14. Wolters T, Van Der Kwast TH, Vissers CJ, Bangma CH, Roobol M, Schroder FH, et al. False-negative Prostate Needle Biopsies: Frequency, Histopathologic Features, and Follow-up. 2009.
15. Loeb S, Vellekoop A, Ahmed HU, Catto J, Emberton M, Nam R, et al. Systematic review of complications of prostate biopsy. Vol. 64, *European Urology*. 2013. p. 876–92.
16. PI-RADS® Prostate Imaging – Reporting and Data System 2019 Version 2.1 [Internet]. 2019. Disponível em: <https://www.acr.org/-/media/ACR/Files/RADS/Pi-RADS/PIRADS-V2-1.pdf?la=en>
17. Bratan F, Niaf E, Melodelima C, Chesnais AL, Souchon R, Mège-Lechevallier F, et al. Influence of imaging and histological factors on prostate cancer detection and localisation on multiparametric MRI: A prospective study. *Eur Radiol*. julho de 2013;23(7):2019–29.
18. Kasivisvanathan V, Rannikko AS, Borghi M, Panebianco V, Mynderse LA, Vaarala MH, et al. MRI-targeted or standard biopsy for prostate-cancer diagnosis. *New England Journal of Medicine*. 10 de maio de 2018;378(19):1767–77.
19. Sonn GA, Fan RE, Ghanouni P, Wang NN, Brooks JD, Loening AM, et al. Prostate Magnetic Resonance Imaging Interpretation Varies Substantially Across Radiologists. *Eur Urol Focus*. 1º de julho de 2019;5(4):592–9.
20. Klotz L, Vesprini D, Sethukavalan P, Jethava V, Zhang L, Jain S, et al. Long-term follow-up of a large active surveillance cohort of patients with prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(3):272–7.

21. Haglind E, Carlsson S, Stranne J, Wallerstedt A, Wilderäng U, Thorsteinsdottir T, et al. Urinary Incontinence and Erectile Dysfunction after Robotic Versus Open Radical Prostatectomy: A Prospective, Controlled, Nonrandomised Trial. *Eur Urol.* 1º de agosto de 2015;68(2):216–25.
22. Wilt TJ, MacDonald R, Rutks I, Shamliyan TA, Taylor BC, Kane RL. Systematic review: Comparative effectiveness and harms of treatments for clinically localized prostate cancer. *Ann Intern Med.* 2008;148(6):435–48.
23. Fenton JJ, Weyrich MS, Durbin S, Liu Y, Bang H, Melnikow J. Prostate-specific antigen-based screening for prostate cancer evidence report and systematic review for the us preventive services task force. *JAMA - Journal of the American Medical Association.* 2018;319(18):1914–31.
24. Pagliarulo V, Bracarda S, Eisenberger MA, Mottet N, Schröder FH, Sternberg CN, et al. Contemporary role of androgen deprivation therapy for prostate cancer. Vol. 61, *European Urology.* 2012. p. 11–25.
25. Crawford ED, Higano CS, Shore ND, Hussain M, Petrylak DP. Treating patients with metastatic castration resistant prostate cancer: A comprehensive review of available therapies. *Journal of Urology.* 2015;194(6):1537–47.
26. Christensson A, Laurell CB, Lilja H. Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. Vol. 194, *Eur. J. Biochem.* 1990.
27. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. *New England Journal of Medicine.* 1987;317(15):909–16.
28. Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ, Catalona W. EFFECT OF EJACULATION ON SERUM TOTAL AND FREE PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN CONCENTRATIONS.
29. Yuan JJJ, Coplen DE, Petros JA, Figenschau RS, Ratliff TL, Smith DS, et al. Effects of rectal examination, prostatic massage, ultrasonography and needle biopsy on serum prostate specific antigen levels. *Journal of Urology.* 1992;147(3 II):810–4.
30. Roobol MJ, Steyerberg EW, Kranse R, Wolters T, van den Bergh RCN, Bangma CH, et al. A Risk-Based Strategy Improves Prostate-Specific Antigen-Driven Detection of Prostate Cancer. *Eur Urol.* janeiro de 2010;57(1):79–85.
31. Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, Tangen CM, Scott Lucia M, Parnes HL, et al. Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. Vol. 22, *n engl j med.* 2004.
32. Bazinet M, Meshref AW, Trudel C, Aronson S, Pélouquin F, Nachabe M, et al. Prospective evaluation of prostate-specific antigen density and systematic biopsies for early detection of prostatic carcinoma. *Urology.* 1994;43(1):44–51.
33. Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, Brant LJ, Chan DW, Andres R, et al. Longitudinal Evaluation of Prostate-Specific Antigen Levels in Men With and Without Prostate Disease.
34. Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM, Brawer MK, Flanigan RC, Patel A, et al. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: A prospective multicenter clinical trial. *J Am Med Assoc.* 1998;279(19):1542–7.
35. Taneja SS, Tran K, Lepor H. Volume-specific cutoffs are necessary for reproducible application of prostate-specific antigen density of the transition zone in prostate cancer detection. *Urology.* 2001;58(2):222–6.
36. Vickers AJ, Savage C, Frank O'Brien M, Lilja H. Systematic review of Pretreatment prostate-specific antigen velocity and doubling time as predictors for prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 20 de janeiro de 2009;27(3):398–403.
37. Filella X, Foj L, Alcover J, Augé JM, Molina R, Jiménez W. The influence of prostate volume in prostate health index performance in patients with total PSA lower than 10µg/L. *Clinica Chimica Acta.* 25 de setembro de 2014;436:303–7.
38. Lopes Vendrami C, McCarthy RJ, Chatterjee A, Casalino D, Schaeffer EM, Catalona WJ, et al. The Utility of Prostate Specific Antigen Density, Prostate Health Index, and Prostate Health Index Density in Predicting Positive Prostate Biopsy Outcome is Dependent on the Prostate Biopsy Methods. *Urology.* 1º de julho de 2019;129:153–9.
39. Nassir AM. A piece in prostate cancer puzzle: Future perspective of novel molecular signatures. Vol. 27, *Saudi Journal of Biological Sciences.* Elsevier B.V.; 2020. p. 1148–54.
40. Olleik G, Kassouf W, Aprikian A, Hu J, Vanhuyse M, Cury F, et al. Evaluation of new tests and interventions for prostate cancer management: A systematic review. Vol. 16, *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* Harborside Press; 2018. p. 1340–51.

41. Loeb S. Biomarkers for Prostate Biopsy and Risk Stratification of Patients with Newly Diagnosed Prostate Cancer. Em: *Urology Practice*. Elsevier Inc.; 2017. p. 315–21.
42. Bryant RJ, Sjöberg DD, Vickers AJ, Robinson MC, Kumar R, Marsden L, et al. Predicting High-Grade Cancer at Ten-Core Prostate Biopsy Using Four Kallikrein Markers Measured in Blood in the ProtecT Study. *J Natl Cancer Inst*. 1º de julho de 2015;107(7).
43. Catalona WJ, Partin AW, Sanda MG, Wei JT, Klee GG, Bangma CH, et al. A multicenter study of [-2]pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/ml prostate specific antigen range. *Journal of Urology*. maio de 2011;185(5):1650–5.
44. Stovsky M, Klein EA, Chait A, Manickam K, Stephenson AJ, Wagner M, et al. Clinical Validation of IsoPSA™, a Single Parameter, Structure Based Assay for Improved Detection of High Grade Prostate Cancer. *Journal of Urology*. 1º de junho de 2019;201(6):1115–20.
45. Eklund M, Nordström T, Aly M, Adolfsson J, Wiklund P, Brandberg Y, et al. The Stockholm-3 (STHLM3) Model can Improve Prostate Cancer Diagnostics in Men Aged 50–69 yr Compared with Current Prostate Cancer Testing. *Eur Urol Focus*. 1º de setembro de 2018;4(5):707–10.
46. Grönberg H, Adolfsson J, Aly M, Nordström T, Wiklund P, Brandberg Y, et al. Prostate cancer screening in men aged 50–69 years (STHLM3): A prospective population-based diagnostic study. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1667–76.
47. Nordström T, Discacciati A, Bergman M, Clements M, Aly M, Annerstedt M, et al. Prostate cancer screening using a combination of risk-prediction, MRI, and targeted prostate biopsies (STHLM3-MRI): a prospective, population-based, randomised, open-label, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 1º de setembro de 2021;22(9):1240–9.
48. Steuber T, Heidegger I, Kafka M, Roeder MA, Chun F, Preisser F, et al. PROPOSE: A Real-life Prospective Study of Proclarix, a Novel Blood-based Test to Support Challenging Biopsy Decision-making in Prostate Cancer. *Eur Urol Oncol*. 1º de junho de 2022;5(3):321–7.
49. Morote J, Campistol M, Triquell M, Celma A, Regis L, de Torres I, et al. Improving the Early Detection of Clinically Significant Prostate Cancer in Men in the Challenging Prostate Imaging-Reporting and Data System 3 Category. *Eur Urol Open Sci*. 1º de março de 2022;37:38–44.
50. Cui Y, Cao W, Li Q, Shen H, Liu C, Deng J, et al. Evaluation of prostate cancer antigen 3 for detecting prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*. 10 de maio de 2016;6.
51. ALKASAB T, Ahmad A, Rechard P, Mohamed A, Garisto J, Fadaak K, et al. MP53-12 THE ROLE OF PROSTATE CANCER ANTIGEN 3 (PCA3) TEST AND MULTI-PARAMETRIC PROSTATIC MAGNETIC RESONANCE IMAGING (MPMRI) AMONG PATIENTS WITH PRIOR NEGATIVE BIOPSY: CORRELATION WITH RADICAL PROSTATECTOMY PATHOLOGY. *Journal of Urology*. abril de 2016;195(4S).
52. Auprich M, Bjartell A, Chun FKH, De La Taille A, Freedland SJ, Haese A, et al. Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer. Vol. 60, *European Urology*. 2011. p. 1045–54.
53. Muñoz Rodríguez SV, García-Perdomo HA. Diagnostic accuracy of prostate cancer antigen 3 (PCA3) prior to first prostate biopsy: A systematic review and meta-analysis. *Canadian Urological Association Journal*. 2020;14(5).
54. Seth A, Watson DK. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41(16):2462–78.
55. Rubin MA, Girelli G, Demichelis F. Genomic correlates to the newly proposed grading prognostic groups for prostate cancer. *Eur Urol*. 1º de abril de 2016;69(4):557–60.
56. Smits M, Mehra N, Sedelaar M, Gerritsen W, Schalken JA. Molecular biomarkers to guide precision medicine in localized prostate cancer. Vol. 17, *Expert Review of Molecular Diagnostics*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 791–804.
57. Koga Y, Song H, Chalmers ZR, Newberg J, Kim E, Carrot-Zhang J, et al. Genomic profiling of prostate cancers from men with African and European ancestry. *Clinical Cancer Research*. 1º de setembro de 2020;26(17):4651–60.
58. Kohaar I, Li Q, Chen Y, Ravindranath L, Young D, Ali A, et al. Association of germline genetic variants with TMPRSS2-ERG fusion status in prostate cancer [Internet]. Vol. 11, *Oncotarget*. 2020. Disponível em: www.oncotarget.com
59. Tomlins SA, Day JR, Lonigro RJ, Hovelson DH, Siddiqui J, Kunju LP, et al. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *Eur Urol*. 1º de julho de 2016;70(1):45–53.

60. Tosoian JJ, Trock BJ, Morgan TM, Salami SS, Tomlins SA, Spratt DE, et al. Use of the MyProstateScore Test to Rule Out Clinically Significant Cancer: Validation of a Straightforward Clinical Testing Approach. *Journal of Urology*. 1º de março de 2021;205(3):732–9.
61. Tosoian JJ, Zhang Y, Meyers JI, Heaton S, Siddiqui J, Xiao L, et al. Clinical Validation of MyProstateScore 2.0 Testing Using First-Catch, Non-DRE Urine. *Journal of Urology*. 2025;
62. Tosoian JJ, Zhang Y, Xiao L, Xie C, Samora NL, Niknafs YS, et al. Development and Validation of an 18-Gene Urine Test for High-Grade Prostate Cancer. *JAMA Oncol*. 20 de junho de 2024;
63. Van Neste L, Hendriks RJ, Dijkstra S, Trooskens G, Cornel EB, Jannink SA, et al. Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker–Based Risk Score. *Eur Urol*. 2016;70(5):740–8.
64. Roumiguié M, Ploussard G, Nogueira L, Bruguère E, Meyrignac O, Lesourd M, et al. Independent evaluation of the respective predictive values for high-grade prostate cancer of clinical information and RNA biomarkers after upfront MRI and image-guided biopsies. *Cancers (Basel)*. 1º de fevereiro de 2020;12(2).
65. Maggi M, Del Giudice F, Falagario UG, Cocci A, Russo GI, Di Mauro M, et al. Selectmdx and multiparametric magnetic resonance imaging of the prostate for men undergoing primary prostate biopsy: A prospective assessment in a multi-institutional study. *Cancers (Basel)*. 1º de maio de 2021;13(9).
66. Hendriks RJ, van der Leest MMG, Dijkstra S, Barentsz JO, Van Criekinge W, Hulsbergen-van de Kaa CA, et al. A urinary biomarker-based risk score correlates with multiparametric MRI for prostate cancer detection. *Prostate*. 1º de outubro de 2017;77(14):1401–7.
67. Wysock JS, Becher E, Persily J, Loeb S, Lepor H. Concordance and Performance of 4Kscore and SelectMDx for Informing Decision to Perform Prostate Biopsy and Detection of Prostate Cancer. *Urology*. 1º de julho de 2020;141:119–24.
68. McKiernan J, Donovan MJ, Margolis E, Partin A, Carter B, Brown G, et al. A Prospective Adaptive Utility Trial to Validate Performance of a Novel Urine Exosome Gene Expression Assay to Predict High-grade Prostate Cancer in Patients with Prostate-specific Antigen 2–10 ng/ml at Initial Biopsy. *Eur Urol*. 1º de dezembro de 2018;74(6):731–8.
69. McKiernan J, Noerholm M, Tadigotla V, Kumar S, Torkler P, Sant G, et al. A urine-based Exosomal gene expression test stratifies risk of high-grade prostate Cancer in men with prior negative prostate biopsy undergoing repeat biopsy. *BMC Urol*. 1º de setembro de 2020;20(1).
70. Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nat Rev Urol*. 8 de maio de 2014;11(5):278–88.
71. Ponti G, Maccaferri M, Mandrioli M, Manfredini M, Micali S, Cotugno M, et al. Seminal Cell-Free DNA Assessment as a Novel Prostate Cancer Biomarker. *Pathology & Oncology Research*. 5 de outubro de 2018;24(4):941–5.
72. Selth LA, Roberts MJ, Chow CWK, Marshall VR, Doi SAR, Vincent AD, et al. Human seminal fluid as a source of prostate cancer-specific microRNA biomarkers. *Endocr Relat Cancer*. agosto de 2014;21(4):L17–21.
73. Neuhaus J, Schiffer E, von Wilcke P, Bauer HW, Leung H, Siwy J, et al. Seminal Plasma as a Source of Prostate Cancer Peptide Biomarker Candidates for Detection of Indolent and Advanced Disease. *PLoS One*. 24 de junho de 2013;8(6):e67514.
74. Drabovich AP, Saraon P, Drabovich M, Karakosta TD, Dimitromanolakis A, Hyndman ME, et al. Multi-omics Biomarker Pipeline Reveals Elevated Levels of Protein-glutamine Gamma-glutamyltransferase 4 in Seminal Plasma of Prostate Cancer Patients. *Molecular & Cellular Proteomics*. setembro de 2019;18(9):1807–23.
75. Intasqui P, Bertolla RP, Sadi MV. Prostate cancer proteomics: clinically useful protein biomarkers and future perspectives. *Expert Rev Proteomics*. 2018;15(1):65–79.
76. Davalieva K, Kiprijanovska S, Maleva Kostovska I, Stavridis S, Stankov O, Komina S, et al. Comparative Proteomics Analysis of Urine Reveals Down-Regulation of Acute Phase Response Signaling and LXR/RXR Activation Pathways in Prostate Cancer. *Proteomes*. 29 de dezembro de 2017;6(1):1.
77. Fujita K, Kume H, Matsuzaki K, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, et al. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. *Sci Rep*. 17 de fevereiro de 2017;7(1):42961.
78. Webber JP, Spary LK, Mason MD, Tabi Z, Brewis IA, Clayton A. Prostate stromal cell proteomics analysis discriminates normal from tumour reactive stromal phenotypes. *Oncotarget*. 12 de abril de 2016;7(15):20124–39.

79. Frantzi M, Gomez Gomez E, Blanca Pedregosa A, Valero Rosa J, Latosinska A, Culig Z, et al. CE–MS-based urinary biomarkers to distinguish non-significant from significant prostate cancer. *Br J Cancer*. 16 de junho de 2019;120(12):1120–8.
80. Giuliano F, Clement P. Neuroanatomy and physiology of ejaculation. *Annu Rev Sex Res*. 2005;(16):190–216.
81. Sanda MG, Cadeddu JA, Kirkby E, Chen RC, Crispino T, Fontanarosa J, et al. Clinically Localized Prostate Cancer: AUA/ASTRO/SUO Guideline. Part I: Risk Stratification, Shared Decision Making, and Care Options. *Journal of Urology*. 2018;199(3):683–90.
82. Figueirêdo Leite GG, Colo Brunialti MK, Peçanha-Pietrobom PM, Abrão Ferreira PR, Ota-Arakaki JS, Cunha-Neto E, et al. Understanding COVID-19 progression with longitudinal peripheral blood mononuclear cell proteomics: Changes in the cellular proteome over time. *iScience*. outubro de 2023;26(10):107824.
83. Leite GGF, Sousa MB, Rodrigues L de OCP, Brunialti MKC, Medina-Pestana J, Butler JM, et al. Proteomic profiling of peripheral blood mononuclear cells reveals immune dysregulation and metabolic alterations in kidney transplant recipients with COVID-19. *Front Immunol*. 16 de dezembro de 2024;15.
84. Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn SE, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*. 15 de janeiro de 2008;24(2):282–4.
85. Farahani M, Robati RM, Rezaei-Tavirani M, Fateminasab F, Shityakov S, Rahmati Roodsari M, et al. Integrating protein interaction and pathway crosstalk network reveals a promising therapeutic approach for psoriasis through apoptosis induction. *Sci Rep*. 27 de setembro de 2024;14(1):22103.
86. Gillet LC, Navarro P, Tate S, Röst H, Selevsek N, Reiter L, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: A new concept for consistent and accurate proteome analysis. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2012;11(6).
87. Fujita K, Kume H, Matsuzaki K, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, et al. Proteomic analysis of urinary extracellular vesicles from high Gleason score prostate cancer. *Sci Rep*. 17 de fevereiro de 2017;7.
88. Bergamini S, Caramaschi S, Monari E, Martorana E, Salviato T, Mangogna A, et al. Urinary proteomic profiles of prostate cancer with different risk of progression and correlation with histopathological features. *Ann Diagn Pathol*. 1º de abril de 2021;51.
89. Frantzi M, Gomez Gomez E, Blanca Pedregosa A, Valero Rosa J, Latosinska A, Culig Z, et al. CE–MS-based urinary biomarkers to distinguish non-significant from significant prostate cancer. *Br J Cancer*. 11 de junho de 2019;120(12):1120–8.
90. Zhong Q, Sun R, Aref AT, Noor Z, Anees A, Zhu Y, et al. Proteomic-based stratification of intermediate-risk prostate cancer patients. *Life Sci Alliance*. 4 de fevereiro de 2024;7(2):e202302146.
91. Tonry C, Finn S, Armstrong J, Pennington SR. Clinical proteomics for prostate cancer: understanding prostate cancer pathology and protein biomarkers for improved disease management. Vol. 17, *Clinical Proteomics*. BioMed Central Ltd; 2020.
92. Khan AA, Al-Mahrouqi N, Al-Yahyaee A, Al-Sayegh H, Al-Harthy M, Al-Zadjali S. Deciphering Urogenital Cancers through Proteomic Biomarkers: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 16, *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
93. Adam RM, Kim J, Lin J, Orsola A, Zhuang L, Rice DC, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates androgen-independent prostate tumor growth and antagonizes androgen receptor function. *Endocrinology*. 1º de dezembro de 2002;143(12):4599–608.
94. Peng Q, Wong CYP, Cheuk IWY, Teoh JYC, Chiu PKF, Ng CF. The emerging clinical role of spermine in prostate cancer. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
95. Liu C, Liao Z, Duan X, Yu P, Kong P, Tao Z, et al. The MYH9 Cytoskeletal Protein Is a Novel Corepressor of Androgen Receptors. *Front Oncol*. 1º de abril de 2021;11.
96. Shen H, Yang P, Liu Q, Tian Y. Nuclear expression and clinical significance of phosphohistidine phosphatase 1 in clear-cell renal cell carcinoma. *Journal of International Medical Research*. 3 de dezembro de 2015;43(6):747–57.
97. Roeckel N, Woerner SM, Kloor M, Yuan YP, Patsos G, Gromes R, et al. High Frequency of *LMAN1* Abnormalities in Colorectal Tumors with Microsatellite Instability. *Cancer Res*. 1º de janeiro de 2009;69(1):292–9.
98. UniProt Consortium. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q5J5C9/entry>. 2024. UniProt entry for DEFB121.

99. McCann JJ, Vasilevskaya IA, Poudel Neupane N, Shafi AA, McNair C, Dylgjeri E, et al. USP22 Functions as an Oncogenic Driver in Prostate Cancer by Regulating Cell Proliferation and DNA Repair. *Cancer Res.* 1º de fevereiro de 2020;80(3):430–43.
100. Wang L, Song G, Chang X, Tan W, Pan J, Zhu X, et al. The role of TXNDC5 in castration-resistant prostate cancer—involvement of androgen receptor signaling pathway. *Oncogene.* 3 de setembro de 2015;34(36):4735–45.
101. Huang CF, Lira C, Chu K, Bilen MA, Lee YC, Ye X, et al. Cadherin-11 Increases Migration and Invasion of Prostate Cancer Cells and Enhances their Interaction with Osteoblasts. *Cancer Res.* 1º de junho de 2010;70(11):4580–9.
102. Chu K, Cheng CJ, Ye X, Lee YC, Zurita AJ, Chen DT, et al. Cadherin-11 Promotes the Metastasis of Prostate Cancer Cells to Bone. *Molecular Cancer Research.* 1º de agosto de 2008;6(8):1259–67.
103. Wang Z, Yao Y ting, Xu H, Chen Y bo, Gu M, Cai Z kang, et al. SPOCK1 promotes tumor growth and metastasis in human prostate cancer. *Drug Des Devel Ther.* julho de 2016;Volume 10:2311–21.
104. Hurley PJ, Hughes RM, Simons BW, Huang J, Miller RM, Shinder B, et al. Androgen-Regulated SPARCL1 in the Tumor Microenvironment Inhibits Metastatic Progression. *Cancer Res.* 15 de outubro de 2015;75(20):4322–34.
105. Hurley PJ, Marchionni L, Simons BW, Ross AE, Peskoe SB, Miller RM, et al. Secreted protein, acidic and rich in cysteine-like 1 (SPARCL1) is down regulated in aggressive prostate cancers and is prognostic for poor clinical outcome. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 11 de setembro de 2012;109(37):14977–82.
106. Ozturk K, Onal MS, Efiloglu O, Nikerel E, Yildirim A, Telci D. Association of 5'UTR polymorphism of secretory phospholipase A2 group IIA (PLA2G2A) gene with prostate cancer metastasis. *Gene.* 5 de junho de 2020;742.
107. Quereda C, Pastor À, Martín-Nieto J. Involvement of abnormal dystroglycan expression and matriglycan levels in cancer pathogenesis. Vol. 22, *Cancer Cell International.* BioMed Central Ltd; 2022.
108. Boldrini L, Bartoletti R, Giordano M, Manassero F, Selli C, Panichi M, et al. C-MYC, HIF-1 α , ERG, TKT, and GSTP1: an Axis in Prostate Cancer? *Pathology & Oncology Research.* 25 de outubro de 2019;25(4):1423–9.
109. Romanuik TL, Ueda T, Le N, Haile S, Yong TMK, Thomson T, et al. Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts. *American Journal of Pathology.* 2009;175(6):2264–76.
110. Koistinen H, Künnapuu J, Jeltsch M. Kik3 in the regulation of angiogenesis—tumorigenic or not? Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI; 2021.
111. Li F, Dai Y, Xu H, Huang K, Zhou Y, Luo D, et al. XPNPEP2 is associated with lymph node metastasis in prostate cancer patients. *Sci Rep.* 1º de dezembro de 2019;9(1).
112. Gross M, Top I, Laux I, Katz J, Curran J, Tindell C, et al. β -2-microglobulin is an androgen-regulated secreted protein elevated in serum of patients with advanced prostate cancer. *Clinical Cancer Research.* 1º de abril de 2007;13(7):1979–86.
113. Rolny C, Mazzone M, Tugues S, Laoui D, Johansson I, Coulon C, et al. HRG Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Inducing Macrophage Polarization and Vessel Normalization through Downregulation of PlGF. *Cancer Cell.* janeiro de 2011;19(1):31–44.
114. Wang X, Chen B, Cao Y, He Y, Chen W. Identification of MAN1B1 as a Novel Marker for Bladder Cancer and Its Relationship with Immune Cell Infiltration. *J Oncol.* 16 de agosto de 2022;2022:1–10.
115. Lin XT, Luo YD, Mao C, Gong Y, Hou Y, Zhang LD, et al. Integrated ubiquitomics characterization of hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* julho de 2025;82(1):42–58.
116. Zheng H, Zheng J, Shen Y. Targeting SEZ6L2 in Colon Cancer: Efficacy of Bexarotene and Implications for Survival. *J Gastrointest Cancer.* 2 de setembro de 2024;55(3):1291–305.
117. Shi H, Hayes MT, Kirana C, Miller RJ, Keating JP, Stubbs RS. Overexpression of aminoacylase 1 is associated with colorectal cancer progression. *Hum Pathol.* junho de 2013;44(6):1089–97.
118. Davalieva K, Kiprijanovska S, Komina S, Petrusevska G, Zografska CC, Polenakovic M. Proteomics analysis of urine reveals acute phase response proteins as candidate diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Proteome Sci.* 29 de janeiro de 2015;13(1).
119. Garbis SD, Tyrizis SI, Roumeliotis T, Zerefos P, Giannopoulou EG, Vlahou A, et al. Search for Potential Markers for Prostate Cancer Diagnosis, Prognosis and Treatment in Clinical Tissue Specimens Using Amine-Specific Isobaric Tagging (iTRAQ) with Two-Dimensional Liquid

- Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 1º de agosto de 2008;7(8):3146–58.
120. Shephard AP, Yeung V, Clayton A, Webber JP. Prostate cancer exosomes as modulators of the tumor microenvironment. *J Cancer Metastasis Treat.* 6 de dezembro de 2017;3(12):288.
 121. Dong M, Lih TSM, Höti N, Chen SY, Ponce S, Partin A, et al. Development of Parallel Reaction Monitoring Assays for the Detection of Aggressive Prostate Cancer Using Urinary Glycoproteins. *J Proteome Res.* 2 de julho de 2021;20(7):3590–9.
 122. Zhang Y xin, Wang L, Ji P yu, Zhao G gang, Zhong G ping, Wang Z ping. Correlation of serum β 2-microglobulin levels with prostate-specific antigen, gleason score, clinical stage, tumor metastasis and therapy efficacy in prostate cancer. *Arch Med Res.* maio de 2013;44(4):259–65.
 123. Nasimi H, Madsen JS, Zedan AH, Malmendal A, Osther PJS, Alatraktchi FAZ. Identification of early stage and metastatic prostate cancer using electrochemical detection of beta-2-microglobulin in urine samples from patients. *Sci Rep.* 1º de dezembro de 2023;13(1).
 124. Abdul M, Hoosein N. Changes in beta-2 microglobulin expression in prostate cancer. Vol. 5, *Urologic Oncology*. 2000.
 125. Hedman ÅK, Dimitriou M, Koprulu M, Figiel S, Yin W, Johansson M, et al. Identifying proteomic risk factors for overall, aggressive and early onset prostate cancer 1 using Mendelian randomization and tumor spatial transcriptomics 2 3 Trishna A Desai. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/2023.09.21.23295864>
 126. Barabási AL, Oltvai ZN. Network biology: Understanding the cell's functional organization. Vol. 5, *Nature Reviews Genetics*. 2004. p. 101–13.
 127. Jeong H, Mason SP, Barabási AL, Oltvai ZN. Lethality and centrality in protein networks. *Nature*. 3 de maio de 2001;411(6833):41–2.
 128. Yu H, Braun P, Yildirim MA, Lemmens I, Venkatesan K, Sahalie J, et al. High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* (1979). 3 de outubro de 2008;322(5898):104–10.
 129. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer [Internet]. Disponível em: www.sciencemag.org
 130. Petrovics G, Liu A, Shaheduzzaman S, Furasato B, Sun C, Chen Y, et al. Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene*. 26 de maio de 2005;24(23):3847–52.
 131. Hendriks RJ, Dijkstra S, Jannink SA, Steffens MG, Van Oort IM, Mulders PFA, et al. Comparative analysis of prostate cancer specific biomarkers PCA3 and ERG in whole urine, urinary sediments and exosomes. *Clin Chem Lab Med.* 1º de março de 2016;54(3):483–92.
 132. Tomlins SA, Aubin SMJ, Siddiqui J, Lonigro RJ, Sefton-Miller L, Miick S, et al. Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci Transl Med.* 3 de agosto de 2011;3(94).
 133. Hägglöf C, Hammarsten P, Strömwall K, Egevad L, Josefsson A, Stattin P, et al. TMPRSS2-ERG expression predicts prostate cancer survival and associates with stromal biomarkers. *PLoS One*. 5 de fevereiro de 2014;9(2).

APÊNDICES

Apêndice A - Lista de DAPs identificadas na comparação entre o grupo com biópsia positiva e o grupo controle

Accession	Gene name	logFC	AveExpr	t	P-Value	Adjusted p-value	B
Q96C86	DCPS	-3,40	19,43	-2,62	0,01	0,80	-2,81
P02452	COL1A1	-3,35	20,27	-3,55	0,00	0,25	-0,89
Q8NBS9	TXNDC5	-2,21	18,18	-3,83	0,00	0,25	-0,25
P13671	C6	-1,87	17,92	-2,58	0,01	0,80	-2,88
A0AVF1	IFT56	-1,81	18,86	-2,70	0,01	0,80	-2,66
Q16849	PTPRN	-1,81	18,59	-2,42	0,02	0,83	-3,16
P81605	DCD	-1,80	21,13	-2,29	0,03	0,83	-3,38
Q86Y38	XYLT1	-1,75	19,36	-2,11	0,04	0,83	-3,68
P14780	MMP9	-1,73	19,07	-2,45	0,02	0,83	-3,11
P33908	MAN1A1	-1,63	21,64	-2,62	0,01	0,80	-2,81
P05783	KRT18	-1,56	22,89	-2,03	0,05	0,83	-3,81
Q9H336	CRISPLD1	-1,53	18,21	-2,04	0,05	0,83	-3,78
P54753	EPHB3	-1,52	18,10	-2,07	0,04	0,83	-3,74
P05060	CHGB	-1,48	22,80	-2,36	0,02	0,83	-3,27
P50502	ST13	-1,45	17,37	-2,43	0,02	0,83	-3,15
A0A087WSY6	IGKV3D-15	-1,44	25,40	-2,13	0,04	0,83	-3,65
P01127	PDGFB	-1,37	18,81	-2,28	0,03	0,83	-3,40
Q6UXI9	NPNT	-1,36	17,73	-2,41	0,02	0,83	-3,17
Q9ULB1	NRXN1	-1,35	19,38	-2,19	0,03	0,83	-3,56
Q03591	CFHR1	-1,31	19,92	-2,07	0,04	0,83	-3,74
P19971	TYMP	-1,30	18,74	-2,23	0,03	0,83	-3,48
Q02224	CENPE	-1,28	17,88	-2,60	0,01	0,80	-2,85
Q5T1S8	NCMAP	-1,24	19,53	-2,02	0,05	0,83	-3,82
P00966	ASS1	-1,23	19,16	-2,08	0,04	0,83	-3,72
Q9BS26	ERP44	-1,17	17,06	-2,75	0,01	0,80	-2,57
Q9UMX5	NENF	-1,14	18,53	-2,14	0,04	0,83	-3,63
Q9Y4C0	NRXN3	-1,10	17,84	-2,13	0,04	0,83	-3,65
P19021	PAM	-1,07	19,66	-2,05	0,05	0,83	-3,78
Q99715	COL12A1	-1,05	21,31	-2,36	0,02	0,83	-3,27
P61970	NUTF2	-0,83	23,33	-2,04	0,05	0,83	-3,78
P62937	PPIA	0,92	21,47	2,19	0,03	0,83	-3,55
O75351	VPS4B	1,17	17,94	2,18	0,03	0,83	-3,57
P63000	RAC1	1,24	19,29	2,10	0,04	0,83	-3,70
Q9Y2E5	MAN2B2	1,28	19,76	2,16	0,04	0,83	-3,60
P08603	CFH	1,40	19,27	2,23	0,03	0,83	-3,49
P04216	THY1	1,41	21,14	2,02	0,05	0,83	-3,83
P06681	C2	1,45	17,79	2,40	0,02	0,83	-3,20
P50395	GDI2	1,46	19,94	2,10	0,04	0,83	-3,70
P06870	KLK1	1,65	23,40	2,08	0,04	0,83	-3,72
P24593	IGFBP5	1,68	19,12	2,55	0,01	0,80	-2,93
P42702	LIFR	1,69	18,23	2,21	0,03	0,83	-3,52
P02763	ORM1	1,81	26,94	2,08	0,04	0,83	-3,72
P04196	HRG	1,98	19,00	2,73	0,01	0,80	-2,60
P20933	AGA	2,01	19,30	2,71	0,01	0,80	-2,63
P49327	FASN	2,04	18,85	2,33	0,02	0,83	-3,32
P55287	CDH11	2,07	22,80	2,95	0,00	0,76	-2,17
P04180	LCAT	2,29	20,92	3,66	0,00	0,25	-0,64
Q9UPT9	USP22	2,43	19,44	2,28	0,03	0,83	-3,41
Q8WVN6	SECTM1	2,77	22,59	2,37	0,02	0,83	-3,24
P10153	RNASE2	2,93	25,42	3,38	0,00	0,31	-1,27
P25092	GUCY2C	3,62	20,50	2,92	0,01	0,76	-2,23

**Apêndice B - Lista de DAPs identificadas na comparação entre o grupo com
biópsia negativa e o grupo controle**

Accession	Gene name	logFC	AveExpr	t	P-Value	Adjusted p-value	B
Q96C86	DCPS	-3,66	19,43	-2,80	0,01	0,98	-3,36
P49221	TGM4	-3,54	22,02	-2,62	0,01	0,98	-3,54
Q9HC84	MUC5B	-2,90	20,62	-2,31	0,03	0,98	-3,81
P02452	COL1A1	-2,85	20,27	-3,00	0,00	0,72	-3,17
Q8N4F0	BPIFB2	-2,84	20,62	-2,23	0,03	0,98	-3,87
P00738	HP	-2,74	25,30	-2,71	0,01	0,98	-3,45
P05783	KRT18	-2,06	22,89	-2,68	0,01	0,98	-3,48
A0AVF1	IFT56	-2,04	18,86	-3,02	0,00	0,72	-3,15
P21333	FLNA	-1,77	19,59	-2,25	0,03	0,98	-3,86
P81605	DCD	-1,67	21,13	-2,12	0,04	0,98	-3,96
P14780	MMP9	-1,61	19,07	-2,27	0,03	0,98	-3,85
P54753	EPHB3	-1,58	18,10	-2,14	0,04	0,98	-3,95
A0A087WSY6	IGKV3D-15	-1,48	25,40	-2,18	0,03	0,98	-3,92
Q6UXI9	NPNT	-1,41	17,73	-2,49	0,02	0,98	-3,65
Q8NBS9	TXNDC5	-1,38	18,18	-2,38	0,02	0,98	-3,75
P98160	HSPG2	-0,96	27,50	-2,06	0,04	0,98	-4,01
Q9BRK3	MXRA8	1,08	22,88	2,09	0,04	0,98	-3,99
O75351	VPS4B	1,11	17,94	2,05	0,05	0,98	-4,02
Q9UNN8	PROCR	1,18	23,89	2,06	0,04	0,98	-4,01
O75144	ICOSLG	1,33	19,91	2,02	0,05	0,98	-4,04
P78324	SIRPA	1,42	22,87	2,13	0,04	0,98	-3,96
O75594	PGLYRP1	1,44	24,39	2,03	0,05	0,98	-4,04
Q9UGT4	SUSD2	1,62	18,48	2,33	0,02	0,98	-3,79
P06870	KLK1	1,75	23,40	2,21	0,03	0,98	-3,89
P20933	AGA	1,82	19,30	2,45	0,02	0,98	-3,68
P04180	LCAT	2,20	20,92	3,50	0,00	0,72	-2,66
P55287	CDH11	2,25	22,80	3,19	0,00	0,72	-2,98
P01023	A2M	2,28	20,88	2,10	0,04	0,98	-3,98
P10153	RNASE2	2,76	25,42	3,16	0,00	0,72	-3,01

**Apêndice C - Lista de DAPs identificadas na comparação entre o grupo com
biópsia positiva e biópsia negativa**

Accession	Gene name	logFC	AveExpr	t	P-Value	Adjusted p-value	B
Q03154	ACY1	-1,52	19,89	-2,95	0,00	0,998	-4,45
Q6UXD5	SEZ6L2	-1,31	17,86	-2,40	0,02	0,998	-4,50
P08582	MELTF	-1,13	19,25	-2,20	0,03	0,998	-4,52
Q12860	CNTN1	-1,02	19,36	-2,17	0,03	0,998	-4,52
O14818	PSMA7	-0,98	17,80	-2,26	0,03	0,998	-4,51
P16422	EPCAM	-0,90	18,47	-2,10	0,04	0,998	-4,52
O43895	XPNPEP2	-0,82	17,23	-2,24	0,03	0,998	-4,51
Q9BRK3	MXRA8	-0,82	22,88	-2,21	0,03	0,998	-4,52
Q9BS26	ERP44	-0,65	17,06	-2,12	0,04	0,998	-4,52
P02748	C9	0,94	22,18	2,26	0,03	0,998	-4,51
P24593	IGFBP5	1,03	19,12	2,18	0,03	0,998	-4,52
P30044	PRDX5	1,05	19,09	2,06	0,05	0,998	-4,53
Q9UBX7	KLK11	1,44	22,46	2,31	0,03	0,998	-4,51
Q66K66	TMEM198	1,54	19,13	2,33	0,02	0,998	-4,50
P00738	HP	1,54	25,30	2,12	0,04	0,998	-4,52
P06727	APOA4	1,55	20,92	2,10	0,04	0,998	-4,52
P19823	ITIH2	1,56	18,21	2,08	0,04	0,998	-4,53
Q08629	SPOCK1	1,63	20,67	2,73	0,01	0,998	-4,47
P05164	MPO	1,65	19,48	2,25	0,03	0,998	-4,51
P29401	TKT	1,89	18,60	2,55	0,01	0,998	-4,48
P49221	TGM4	2,10	22,02	2,15	0,04	0,998	-4,52

Apêndice D - Lista de DAPs identificadas na comparação entre o grupo com biópsia positiva e os grupos com biópsia negativa e controle

Accession	Gene name	logFC	AveExpr	t	P-Value	Adjusted p-value	B
Q03154	ACY1	-1,305	19,885	-2,704	0,009	0,992	-4,451
Q6UXD5	SEZ6L2	-1,269	17,855	-2,526	0,015	0,992	-4,471
Q8NBS9	TXNDC5	-1,196	18,179	-2,952	0,005	0,992	-4,423
P08582	MELTF	-1,120	19,248	-2,373	0,022	0,992	-4,487
P13671	C6	-1,038	17,917	-2,100	0,041	0,992	-4,514
P33908	MAN1A1	-0,969	21,638	-2,286	0,027	0,992	-4,496
O14818	PSMA7	-0,933	17,803	-2,336	0,024	0,992	-4,490
Q12860	CNTN1	-0,922	19,359	-2,135	0,038	0,992	-4,510
P50502	ST13	-0,882	17,370	-2,179	0,034	0,992	-4,506
P02649	APOE	-0,843	21,747	-2,283	0,027	0,992	-4,496
Q9BS26	ERP44	-0,789	17,058	-2,739	0,009	0,992	-4,447
P14384	CPM	-0,764	21,269	-2,068	0,044	0,992	-4,517
O43895	XPNPEP2	-0,708	17,235	-2,075	0,043	0,992	-4,516
P61970	NUTF2	-0,573	23,332	-2,110	0,040	0,992	-4,513
P02748	C9	0,808	22,179	2,097	0,041	0,992	-4,514
P06681	C2	0,906	17,788	2,216	0,031	0,992	-4,502
P04196	HRG	1,025	18,997	2,062	0,044	0,992	-4,517
P07478	PRSS2	1,082	17,996	2,047	0,046	0,992	-4,519
Q71U36	TUBA1A	1,166	20,201	2,027	0,048	0,992	-4,521
P24593	IGFBP5	1,202	19,120	2,723	0,009	0,992	-4,449
Q08629	SPOCK1	1,289	20,665	2,291	0,026	0,992	-4,495
P02675	FGB	1,313	19,161	2,010	0,050	0,992	-4,522
Q66K66	TMEM198	1,424	19,133	2,341	0,023	0,992	-4,490
P05164	MPO	1,434	19,476	2,116	0,039	0,992	-4,512
P49327	FASN	1,470	18,847	2,507	0,015	0,992	-4,473
P19823	ITIH2	1,668	18,215	2,409	0,020	0,992	-4,483
P29401	TKT	1,902	18,598	2,774	0,008	0,992	-4,444
P25092	GUCY2C	2,016	20,496	2,369	0,022	0,992	-4,487

**Apêndice E - Lista de DAPs identificadas na comparação entre os grupos ISUP
1 e ISUP $\geq$ 2**

Accession	Gene name	logFC	AveExpr	t	P-Value	Adjusted p-value	B
P14555	PLA2G2A	-1,893	20,835	-2,206	0,036	0,738	-3,682
Q9HB40	SCPEP1	-1,767	20,188	-2,930	0,007	0,738	-2,799
Q14515	SPARCL1	-1,741	22,024	-3,372	0,002	0,619	-2,216
P34059	GALNS	-1,610	18,997	-3,229	0,003	0,648	-2,406
Q14118	DAG1	-1,598	20,447	-2,489	0,019	0,738	-3,351
P55268	LAMB2	-1,441	19,523	-2,182	0,038	0,738	-3,709
Q13477	MADCAM1	-1,366	18,891	-2,092	0,045	0,792	-3,809
P25774	CTSS	-1,366	18,463	-2,282	0,030	0,738	-3,595
P00491	PNP	-1,338	19,004	-2,605	0,014	0,738	-3,209
Q53RD9	FBLN7	-1,267	18,814	-2,401	0,023	0,738	-3,456
Q14507	EDDM3A	-1,260	19,490	-2,065	0,048	0,792	-3,840
P48745	CCN3	-1,195	23,729	-2,338	0,027	0,738	-3,530
Q16706	MAN2A1	-1,159	17,544	-2,337	0,027	0,738	-3,532
Q12794	HYAL1	-1,114	17,493	-2,060	0,049	0,792	-3,844
P05067	APP	-1,108	20,483	-2,195	0,037	0,738	-3,695
Q9H665	IGFLR1	-1,085	18,486	-2,056	0,049	0,792	-3,848
P40925	MDH1	-1,024	20,683	-2,063	0,048	0,792	-3,842
P06865	HEXA	-0,867	20,907	-2,225	0,034	0,738	-3,661
P02743	APCS	0,819	21,559	2,049	0,050	0,792	-3,856
O95445	APOM	1,157	19,653	2,071	0,048	0,792	-3,832
P02748	C9	1,192	22,491	2,248	0,033	0,738	-3,635
P01824	IGHV4-39	1,213	22,066	2,388	0,024	0,738	-3,472
P02647	APOA1	1,241	24,522	2,404	0,023	0,738	-3,452
P02652	APOA2	1,275	21,808	2,281	0,030	0,738	-3,596
Q5T750	KPLCE	1,286	18,201	2,255	0,032	0,738	-3,626
P08185	SERPINA6	1,298	23,043	2,103	0,045	0,792	-3,798
Q13561	DCTN2	1,298	17,734	2,655	0,013	0,738	-3,148
P51149	RAB7A	1,332	17,659	2,279	0,030	0,738	-3,599
P01701	IGLV1-51	1,431	20,960	2,183	0,037	0,738	-3,709
P01703	IGLV1-40	1,443	18,578	2,629	0,014	0,738	-3,180
P20290	BTF3	1,528	18,711	2,204	0,036	0,738	-3,685
P43652	AFM	1,532	23,181	2,231	0,034	0,738	-3,655
A0A0C4DH35	IGHV3-35	1,570	18,845	2,612	0,014	0,738	-3,200
Q9HD89	RETN	1,582	20,187	2,394	0,024	0,738	-3,465
A0A075B6K4	IGLV3-10	1,749	21,089	2,743	0,010	0,738	-3,037
P80748	IGLV3-21	1,812	19,964	2,264	0,031	0,738	-3,617
Q86UP8	GTF2IRD2	1,878	23,103	2,434	0,021	0,738	-3,417
Q66K66	TMEM198	1,891	19,947	2,524	0,017	0,738	-3,309
P01130	LDLR	1,903	20,341	2,392	0,024	0,738	-3,467
P01714	IGLV3-19	1,937	20,041	2,298	0,029	0,738	-3,577
P05164	MPO	1,960	20,324	2,274	0,031	0,738	-3,605
A0A087WSY4	IGHV4-30-2	2,062	18,735	2,981	0,006	0,738	-2,732
P29401	TKT	2,115	19,470	2,059	0,049	0,792	-3,846
Q96HU8	DIRAS2	2,175	19,320	2,200	0,036	0,738	-3,690
P06702	S100A9	2,208	23,190	2,671	0,012	0,738	-3,127
P02675	FGB	2,360	19,922	3,359	0,002	0,619	-2,233
P01593	IGKV1D-33	2,437	18,941	2,376	0,024	0,738	-3,485
P19823	ITIH2	2,544	19,132	2,435	0,021	0,738	-3,416
P01768	IGHV3-30	2,613	20,436	2,737	0,011	0,738	-3,045
P01599	IGKV1-17	2,802	22,848	2,899	0,007	0,738	-2,838
P01602	IGKV1-5	2,929	19,774	4,216	0,000	0,190	-1,078

**Apêndice F - Lista de DAPs identificadas na comparação entre os grupos
alto/intermediário-desfavorável e baixo risco**

Accession	Gene name	logFC	AveExpr	t	P-Value	Adjusted p-value	B
P03973	SLPI	-2,699	25,483	-2,717	0,011	0,199	-2,789
P61769	B2M	-2,672	27,092	-2,776	0,010	0,193	-2,669
P20155	SPINK2	-2,494	21,610	-2,354	0,026	0,271	-3,488
Q14118	DAG1	-2,429	20,486	-3,370	0,002	0,127	-1,407
P07288	KLK3	-2,355	29,092	-2,659	0,013	0,210	-2,903
P01033	TIMP1	-2,295	24,924	-2,446	0,021	0,245	-3,315
Q9BRK5	SDF4	-2,252	19,447	-2,866	0,008	0,186	-2,485
P40925	MDH1	-2,251	20,621	-3,814	0,001	0,111	-0,409
P14555	PLA2G2A	-2,200	20,948	-2,061	0,049	0,363	-4,005
Q9HC38	GLOD4	-2,120	18,269	-2,916	0,007	0,179	-2,381
P01034	CST3	-2,088	25,131	-2,321	0,028	0,281	-3,548
P08118	MSMB	-2,071	28,881	-2,357	0,026	0,271	-3,482
P61916	NPC2	-1,979	26,650	-2,362	0,026	0,271	-3,474
Q14515	SPARCL1	-1,898	21,993	-2,737	0,011	0,193	-2,748
P10909	CLU	-1,882	28,110	-2,431	0,022	0,246	-3,345
P60022	DEFB1	-1,877	25,376	-2,595	0,015	0,219	-3,031
P05060	CHGB	-1,853	22,526	-2,775	0,010	0,193	-2,672
P45877	PPIC	-1,834	20,118	-2,979	0,006	0,175	-2,250
Q06828	FMOD	-1,828	19,643	-2,525	0,018	0,237	-3,165
Q9HB40	SCPEP1	-1,813	20,227	-2,307	0,029	0,287	-3,575
P0DP57	SLURP2	-1,765	23,144	-2,338	0,027	0,276	-3,518
P00491	PNP	-1,707	18,932	-2,605	0,015	0,219	-3,010
P00558	PGK1	-1,706	21,661	-2,610	0,015	0,219	-3,001
P54108	CRISP3	-1,705	23,901	-2,215	0,035	0,324	-3,739
P14384	CPM	-1,702	20,829	-2,560	0,016	0,228	-3,097
P07900	HSP90AA1	-1,697	21,947	-2,056	0,050	0,363	-4,015
Q8N114	SHISA5	-1,659	23,770	-2,335	0,027	0,276	-3,523
P16870	CPE	-1,567	25,778	-2,383	0,024	0,264	-3,435
P06733	ENO1	-1,549	22,872	-2,465	0,020	0,245	-3,281
P34059	GALNS	-1,514	19,035	-2,584	0,015	0,221	-3,052
Q15828	CST6	-1,507	23,024	-2,382	0,025	0,264	-3,437
P08637	FCGR3A	-1,505	21,176	-2,117	0,044	0,346	-3,911
P48745	CCN3	-1,423	23,732	-2,174	0,039	0,332	-3,812
Q8IWU5	SULF2	-1,416	24,898	-2,084	0,047	0,351	-3,968
O43505	B4GAT1	-1,369	20,763	-2,443	0,021	0,245	-3,321
Q9BRK3	MXRA8	-1,333	22,609	-2,500	0,019	0,243	-3,214
P30041	PRDX6	-1,177	21,791	-2,255	0,032	0,306	-3,667
P42785	PRCP	-1,040	21,588	-2,184	0,038	0,328	-3,795
Q7KYR7	BTN2A1	1,139	25,428	2,151	0,041	0,334	-3,851
A0A075B6S2	IGKV2D-29	1,247	25,298	2,091	0,046	0,349	-3,955
Q8WXW3	PIBF1	1,256	22,886	2,098	0,045	0,349	-3,943
P02790	HPX	1,370	25,921	2,464	0,020	0,245	-3,282
P37837	TALDO1	1,421	17,815	2,133	0,042	0,337	-3,883
P01024	C3	1,436	26,237	2,289	0,030	0,294	-3,606
P01703	IGLV1-40	1,442	18,548	2,091	0,046	0,349	-3,954
P02743	APCS	1,490	21,549	3,185	0,004	0,148	-1,812
Q13561	DCTN2	1,494	17,614	2,231	0,034	0,319	-3,712
P06312	IGKV4-1	1,496	22,322	2,147	0,041	0,334	-3,858
P02652	APOA2	1,578	21,802	2,206	0,036	0,324	-3,756
P05543	SERPINA7	1,588	23,879	2,743	0,011	0,193	-2,737
P02647	APOA1	1,655	24,527	2,531	0,017	0,237	-3,153
P07360	C8G	1,667	17,954	2,510	0,018	0,241	-3,194
P05783	KRT18	1,674	22,861	2,097	0,046	0,349	-3,945
P04216	THY1	1,704	21,389	2,153	0,040	0,334	-3,848
P05109	S100A8	1,735	23,726	2,163	0,040	0,332	-3,830
O95445	APOM	1,736	19,691	2,636	0,014	0,218	-2,949

P01700	IGLV1-47	1,764	22,087	2,439	0,022	0,245	-3,329
P01857	IGHG1	1,769	28,749	3,707	0,001	0,111	-0,654
P00747	PLG	1,781	23,246	2,480	0,020	0,245	-3,252
P00450	CP	1,800	25,292	2,847	0,008	0,189	-2,525
P01859	IGHG2	1,817	27,415	2,672	0,013	0,210	-2,877
Q9BYX2	TBC1D2	1,840	18,997	2,659	0,013	0,210	-2,905
A0A075B6I0	IGLV8-61	1,844	21,065	2,112	0,044	0,346	-3,919
P30622	CLIP1	1,902	23,615	2,191	0,037	0,326	-3,782
P02748	C9	1,907	22,489	2,944	0,007	0,179	-2,325
P01861	IGHG4	1,949	22,823	2,204	0,036	0,324	-3,758
Q14289	PTK2B	1,985	20,253	2,134	0,042	0,337	-3,882
P01834	IGKC	1,986	29,567	2,556	0,017	0,228	-3,105
A0A0C4DH25	IGKV3D-20	2,016	21,994	2,209	0,036	0,324	-3,749
P19652	ORM2	2,020	26,950	2,998	0,006	0,173	-2,211
P02787	TF	2,028	29,273	3,007	0,006	0,173	-2,192
Q9NZH0	GPRC5B	2,063	18,775	2,449	0,021	0,245	-3,310
P01780	IGHV3-7	2,073	23,366	3,209	0,003	0,148	-1,761
P08185	SERPINA6	2,086	23,044	2,745	0,011	0,193	-2,731
Q9HD89	RETN	2,094	20,184	2,598	0,015	0,219	-3,025
A0A0A0MS15	IGHV3-49	2,097	19,227	2,759	0,010	0,193	-2,703
A0A0B4J1X5	IGHV3-74	2,101	21,779	2,447	0,021	0,245	-3,315
P01824	IGHV4-39	2,136	22,062	3,618	0,001	0,111	-0,855
A0A075B6I9	IGLV7-46	2,155	20,906	2,199	0,037	0,324	-3,768
A0A075B6R9	IGKV2D-24	2,210	20,031	2,398	0,024	0,262	-3,407
A0A075B6K4	IGLV3-10	2,279	21,065	2,762	0,010	0,193	-2,699
A0A0B4J2H0	IGHV1-69D	2,401	20,044	3,036	0,005	0,170	-2,131
P01701	IGLV1-51	2,405	20,952	3,070	0,005	0,169	-2,059
O60635	TSPAN1	2,416	18,719	2,786	0,010	0,193	-2,649
A0A0B4J1Y9	IGHV3-72	2,481	21,157	2,940	0,007	0,179	-2,331
P23083	IGHV1-2	2,484	20,107	2,869	0,008	0,186	-2,479
P20160	AZU1	2,503	18,952	2,169	0,039	0,332	-3,821
P01782	IGHV3-9	2,524	19,655	2,925	0,007	0,179	-2,364
A0A0B4J1U7	IGHV6-1	2,624	20,650	2,824	0,009	0,193	-2,571
P43652	AFM	2,677	23,183	3,277	0,003	0,142	-1,612
P02763	ORM1	2,726	27,538	3,127	0,004	0,160	-1,937
A0A0C4DH35	IGHV3-35	2,748	18,823	4,072	0,000	0,111	0,184
P02675	FGB	2,828	19,796	2,905	0,007	0,179	-2,405
P00738	HP	2,883	25,769	2,676	0,013	0,210	-2,871
Q9H497	TOR3A	2,889	19,217	2,279	0,031	0,297	-3,625
P06702	S100A9	2,931	23,192	2,793	0,009	0,193	-2,635
P04899	GNAI2	2,939	22,410	3,071	0,005	0,169	-2,057
P01599	IGKV1-17	2,964	22,820	2,275	0,031	0,297	-3,633
Q9UPT9	USP22	3,036	19,802	2,474	0,020	0,245	-3,264
P01602	IGKV1-5	3,172	19,814	3,665	0,001	0,111	-0,749
P05164	MPO	3,233	20,097	2,617	0,014	0,219	-2,987
P80748	IGLV3-21	3,296	19,850	3,398	0,002	0,127	-1,346
Q86UP8	GTF2IRD2	3,336	23,047	3,335	0,002	0,131	-1,485
A0A087WSY4	IGHV4-30-2	3,344	18,601	4,041	0,000	0,111	0,113
P01130	LDLR	3,402	20,306	3,649	0,001	0,111	-0,784
P01768	IGHV3-30	3,435	20,587	3,186	0,004	0,148	-1,810
Q66K66	TMEM198	3,462	19,730	3,394	0,002	0,127	-1,354
Q96KQ4	PPP1R13B	3,623	19,155	3,176	0,004	0,148	-1,830
P19823	ITIH2	3,770	19,206	3,049	0,005	0,170	-2,103
P29401	TKT	4,013	19,494	3,401	0,002	0,127	-1,340
Q9H6N6	MYH16	4,046	19,872	3,838	0,001	0,111	-0,354
P25092	GUCY2C	4,310	21,568	3,583	0,001	0,111	-0,933
P01593	IGKV1D-33	4,402	18,879	3,511	0,002	0,121	-1,094
Q96HU8	DIRAS2	4,483	19,339	4,320	0,000	0,111	0,760

Apêndice G - Lista de DAPs identificadas na comparação entre os grupos intermediário-favorável e baixo risco

Accession	Gene name	logFC	AveExpr	t	P-Value	Adjusted p-value	B
Q13477	MADCAM1	-1,813	18,782	-2,467	0,020	0,997	-4,544
P55268	LAMB2	-1,755	19,440	-2,276	0,031	0,997	-4,552
Q14515	SPARCL1	-1,690	21,993	-2,759	0,010	0,997	-4,531
P15289	ARSA	-1,626	20,007	-2,212	0,036	0,997	-4,554
Q53RD9	FBLN7	-1,576	18,846	-2,708	0,012	0,997	-4,534
Q9HB40	SCPEP1	-1,572	20,227	-2,265	0,032	0,997	-4,552
P34059	GALNS	-1,522	19,035	-2,940	0,007	0,997	-4,523
P08236	GUSB	-1,505	21,287	-2,702	0,012	0,997	-4,534
Q14507	EDDM3A	-1,490	19,486	-2,215	0,035	0,997	-4,554
P25774	CTSS	-1,489	18,598	-2,160	0,040	0,997	-4,557
P10153	RNASE2	-1,462	25,823	-2,299	0,029	0,997	-4,551
P35052	GPC1	-1,308	18,137	-2,125	0,043	0,997	-4,558
P00491	PNP	-1,280	18,932	-2,212	0,036	0,997	-4,554
O15230	LAMA5	-1,224	19,559	-2,264	0,032	0,997	-4,552
P11047	LAMC1	-1,116	19,790	-2,149	0,041	0,997	-4,557
P56537	EIF6	1,028	18,820	2,065	0,049	0,997	-4,560
Q15907	RAB11B	1,160	18,416	2,423	0,022	0,997	-4,546
Q9H0U4	RAB1B	1,203	18,813	2,065	0,049	0,997	-4,560
P01703	IGLV1-40	1,361	18,548	2,233	0,034	0,997	-4,554
P25789	PSMA4	1,467	18,149	2,305	0,029	0,997	-4,551
P51149	RAB7A	1,596	17,763	2,548	0,017	0,997	-4,540
Q13561	DCTN2	1,878	17,614	3,175	0,004	0,997	-4,513
P02675	FGB	1,901	19,796	2,211	0,036	0,997	-4,555
P01040	CSTA	2,094	18,944	2,243	0,033	0,997	-4,553
P01602	IGKV1-5	2,479	19,814	3,242	0,003	0,997	-4,510
P01599	IGKV1-17	2,829	22,820	2,458	0,021	0,997	-4,544

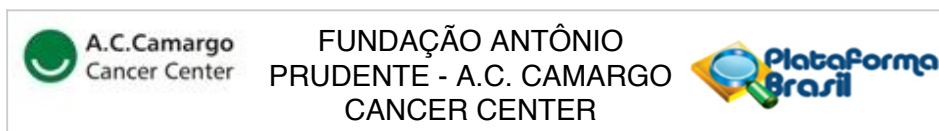
**Apêndice H - Lista de DAPs identificadas na comparação entre os grupos
alto/intermediário-desfavorável e intermediário-favorável**

Accession	Gene name	logFC	AveExpr	t	P-Value	Adjusted p-value	B
P03973	SLPI	-3,837	25,483	-3,784	0,001	0,296	-0,721
P20155	SPINK2	-3,335	21,610	-3,084	0,005	0,296	-2,066
P01040	CSTA	-3,176	18,944	-2,944	0,007	0,321	-2,324
P61769	B2M	-2,860	27,092	-2,911	0,007	0,321	-2,384
P08118	MSMB	-2,778	28,881	-3,097	0,005	0,296	-2,041
P60022	DEFB1	-2,411	25,376	-3,264	0,003	0,296	-1,727
P07288	KLK3	-2,115	29,092	-2,340	0,027	0,376	-3,371
P02765	AHSG	-2,111	26,913	-2,124	0,043	0,410	-3,711
P19971	TYMP	-2,061	18,266	-2,761	0,010	0,339	-2,654
P10909	CLU	-2,036	28,110	-2,575	0,016	0,339	-2,978
P01033	TIMP1	-2,030	24,924	-2,119	0,043	0,410	-3,719
Q969E1	LEAP2	-2,019	24,412	-2,449	0,021	0,339	-3,191
P07900	HSP90AA1	-1,995	21,947	-2,368	0,025	0,376	-3,326
Q5T749	KPRP	-1,972	18,181	-2,275	0,031	0,389	-3,475
P05452	CLEC3B	-1,970	22,187	-2,564	0,016	0,339	-2,997
P08637	FCGR3A	-1,968	21,176	-2,711	0,012	0,339	-2,741
P54108	CRISP3	-1,963	23,901	-2,498	0,019	0,339	-3,109
Q75015	FCGR3B	-1,960	18,928	-2,152	0,040	0,401	-3,668
P40925	MDH1	-1,910	20,621	-3,171	0,004	0,296	-1,902
Q9BRK5	SDF4	-1,846	19,447	-2,301	0,029	0,376	-3,433
Q9HC38	GLOD4	-1,839	18,269	-2,479	0,020	0,339	-3,141
P00558	PGK1	-1,761	21,661	-2,639	0,014	0,339	-2,868
P06733	ENO1	-1,758	22,872	-2,740	0,011	0,339	-2,690
P10451	SPP1	-1,750	25,938	-2,213	0,036	0,394	-3,574
Q6EMK4	VASN	-1,679	25,566	-2,158	0,040	0,401	-3,659
P31949	S100A11	-1,655	20,389	-2,058	0,049	0,419	-3,812
P16870	CPE	-1,645	25,778	-2,449	0,021	0,339	-3,191
P0DP57	SLURP2	-1,632	23,144	-2,117	0,044	0,410	-3,722
P00338	LDHA	-1,631	20,797	-2,198	0,037	0,394	-3,596
P05060	CHGB	-1,620	22,526	-2,376	0,025	0,376	-3,311
P21810	BGN	-1,600	18,906	-2,061	0,049	0,419	-3,807
P62258	YWHAE	-1,597	21,860	-2,174	0,039	0,401	-3,635
P45877	PPIC	-1,564	20,118	-2,488	0,019	0,339	-3,126
Q14118	DAG1	-1,543	20,486	-2,096	0,046	0,411	-3,754
Q8N114	SHISA5	-1,524	23,770	-2,101	0,045	0,411	-3,746
P07737	PFN1	-1,523	21,158	-2,232	0,034	0,393	-3,544
P62979	RPS27A	-1,469	25,748	-2,204	0,036	0,394	-3,587
Q9BRK3	MXRA8	-1,377	22,609	-2,528	0,018	0,339	-3,058
P30041	PRDX6	-1,253	21,791	-2,352	0,026	0,376	-3,352
P61970	NUTF2	-1,245	23,049	-2,403	0,023	0,364	-3,267
P02743	APCS	1,101	21,549	2,305	0,029	0,376	-3,427
P07602	PSAP	1,195	26,125	2,109	0,044	0,410	-3,735
P0C0L5	C4B	1,218	25,223	2,083	0,047	0,411	-3,775
P54802	NAGLU	1,247	23,048	2,304	0,029	0,376	-3,429
P02790	HPX	1,269	25,921	2,234	0,034	0,393	-3,541
P11279	LAMP1	1,286	23,058	2,186	0,038	0,396	-3,616
P08195	SLC3A2	1,333	20,494	2,904	0,007	0,321	-2,396
P19440	GGT1	1,375	22,269	2,251	0,033	0,393	-3,514
Q8TCT8	SPPL2A	1,395	17,501	2,089	0,046	0,411	-3,765

Q16348	SLC15A2	1,494	17,553	2,212	0,036	0,394	-3,576
P00450	CP	1,506	25,292	2,334	0,027	0,376	-3,381
P01824	IGHV4-39	1,517	22,062	2,517	0,018	0,339	-3,078
P05543	SERPINA7	1,540	23,879	2,605	0,015	0,339	-2,926
Q9Y5Y7	LYVE1	1,592	23,817	2,194	0,037	0,394	-3,604
P08236	GUSB	1,594	21,287	2,477	0,020	0,339	-3,145
P02787	TF	1,619	29,273	2,351	0,026	0,376	-3,353
Q5JS37	NHLRC3	1,672	19,257	2,322	0,028	0,376	-3,399
Q92956	TNFRSF14	1,680	19,673	2,129	0,042	0,410	-3,703
P17900	GM2A	1,685	26,512	2,443	0,021	0,339	-3,202
P01857	IGHG1	1,730	28,749	3,550	0,001	0,296	-1,178
P04216	THY1	1,748	21,389	2,164	0,039	0,401	-3,650
P01780	IGHV3-7	1,824	23,366	2,766	0,010	0,339	-2,645
P10153	RNASE2	1,877	25,823	2,553	0,017	0,339	-3,015
A0A0B4J2H0	IGHV1-69D	1,879	20,044	2,327	0,028	0,376	-3,392
P43652	AFM	1,883	23,183	2,258	0,032	0,393	-3,503
P01782	IGHV3-9	1,933	19,655	2,194	0,037	0,394	-3,604
P80188	LCN2	1,964	22,787	2,086	0,047	0,411	-3,769
P01861	IGHG4	2,022	22,823	2,241	0,033	0,393	-3,530
P06312	IGKV4-1	2,040	22,322	2,868	0,008	0,333	-2,462
P80748	IGLV3-21	2,042	19,850	2,062	0,049	0,419	-3,805
P00747	PLG	2,078	23,246	2,834	0,009	0,339	-2,522
P01859	IGHG2	2,090	27,415	3,011	0,006	0,313	-2,201
P01834	IGKC	2,093	29,567	2,638	0,014	0,339	-2,869
P19652	ORM2	2,107	26,950	3,062	0,005	0,296	-2,106
A0A0C4DH35	IGHV3-35	2,110	18,823	3,063	0,005	0,296	-2,105
Q07075	ENPEP	2,117	22,704	2,574	0,016	0,339	-2,980
Q86UP8	GTF2IRD2	2,153	23,047	2,108	0,044	0,410	-3,736
Q9NZH0	GPRC5B	2,244	18,775	2,609	0,015	0,339	-2,919
A0A0B4J1Y9	IGHV3-72	2,259	21,157	2,623	0,014	0,339	-2,896
P30622	CLIP1	2,268	23,615	2,559	0,016	0,339	-3,005
A0A0B4J1X5	IGHV3-74	2,297	21,779	2,621	0,014	0,339	-2,898
O60635	TSPAN1	2,302	18,719	2,600	0,015	0,339	-2,935
Q14289	PTK2B	2,327	20,253	2,450	0,021	0,339	-3,190
P00738	HP	2,367	25,769	2,152	0,040	0,401	-3,669
Q66K66	TMEM198	2,393	19,730	2,299	0,029	0,376	-3,437
P01130	LDLR	2,422	20,306	2,545	0,017	0,339	-3,029
P04899	GNAI2	2,467	22,410	2,525	0,018	0,339	-3,063
A0A075B6R9	IGKV2D-24	2,489	20,031	2,645	0,013	0,339	-2,856
A0A087WSY4	IGHV4-30-2	2,621	18,601	3,102	0,004	0,296	-2,031
P15289	ARSA	2,790	20,007	3,284	0,003	0,296	-1,688
P02763	ORM1	2,816	27,538	3,163	0,004	0,296	-1,917
Q9UPT9	USP22	2,820	19,802	2,251	0,033	0,393	-3,514
Q96KQ4	PPP1R13B	2,952	19,155	2,535	0,017	0,339	-3,046
P29401	TKT	3,006	19,494	2,496	0,019	0,339	-3,113
P01593	IGKV1D-33	3,133	18,879	2,448	0,021	0,339	-3,192
Q9H6N6	MYH16	3,206	19,872	2,979	0,006	0,317	-2,259
A0A0B4J1U7	IGHV6-1	3,631	20,650	3,828	0,001	0,296	-0,634
Q96HU8	DIRAS2	3,753	19,339	3,543	0,001	0,296	-1,192
P25092	GUCY2C	3,820	21,568	3,110	0,004	0,296	-2,016

ANEXO

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação proteômica de sêmen e de urina pós ejaculação e sequenciamento de nova geração do painel gênico Oncomine Focus Fusion Panel para identificação da fusão TMPRSS2-ERG em pacientes suspeitos para câncer de próstata.

Pesquisador: Stênio de Cássio Zequi

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 37985220.8.0000.5432

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.806.720

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos itens "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa", "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1598948", gerado pela Plataforma Brasil em 23/03/2021.

Desenho:

Neste estudo serão analisados 20 pacientes em investigação de câncer de próstata que tenham indicação de biópsia e acompanhados no Núcleo de Urologia do A.C. Camargo Cancer Center. Participarão do estudo outros cinco controles (pacientes saudáveis), que não devem apresentar queixas STUI, provenientes do Ambulatório de Disfunção Miccional da Disciplina de Urologia da Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Resumo:

O câncer de próstata (CP) é a segunda neoplasia maligna mais comum entre homens e responsável por alta mortalidade na população masculina. O diagnóstico é realizado principalmente com a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) e exame dígito retal (EDR), com sensibilidade e especificidade limitada. Como consequência do rastreamento com utilização do PSA, uma

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 4.806.720

porcentagem significativa dos pacientes é submetida à investigação diagnóstica invasiva do CP e tratamentos desnecessários, estando expostos aos efeitos colaterais genitourinários destes procedimentos. É necessário a identificação de biomarcadores sensíveis e específicos para detecção precoce do CP, e que possibilitem estimar sua agressividade. Investigação de alterações moleculares através de análise transcriptômica e proteômica são ferramentas promissoras na identificação de novos biomarcadores diagnósticos e prognósticos do CP, porém necessitam de estudos confirmatórios para demonstrar a acurácia dos resultados até agora obtidos. A urina e o sêmen destacam-se como fonte abundante de material para pesquisa não invasiva e representativas do microambiente prostático. Biomarcadores como o microRNA PCA3 e a fusão TMPRSS2:ERG, específicos para câncer de próstata, foram identificados na urina coletada após massagem prostática. A presença de um profissional da área de saúde capacitado é necessária para a realização da massagem prostática, onerando a coleta. Além disso, este procedimento provoca desconforto ao paciente e fornece secreção prostática limitada à face posterior da glândula. Tais limitações nos motivaram a pesquisar a urina pós ejaculação que, em teoria, representaria globalmente o microambiente prostático, com maior potencial para identificação de biomarcadores, além de promover coleta de material de forma menos invasiva, mais reprodutível e com menor custo. Neste estudo, realizaremos análise proteômica do sêmen e urina pós ejaculação de pacientes com suspeita de câncer de próstata e pacientes com hiperplasia prostática benigna. Realizaremos também análise da fusão TMPRSS2:ERG por sequenciamento de nova geração na urina pós ejaculação e tecido prostático, em pacientes diagnosticados com câncer de próstata.

Hipótese:

O CP apresenta a alta incidência e prevalência, comportamento heterogêneo, déficits no diagnóstico e tratamentos mórbitos. A frequente concomitância com a HPB, com elevação de marcadores como o PSA, comum a ambas afecções, motivam biópsias de próstata desnecessárias. Mesmo testes mais modernos, descritos acima, podem sofrer alterações decorrentes à HPB ou outras situações benignas. A identificação de biomarcadores sensíveis e específicos expressos no CP pode contribuir para elucidar a fisiopatologia, aprimorar a acurácia diagnóstica ou mesmo influenciar futuras intervenções terapêuticas e profiláticas do desenvolvimento desta afecção. A avaliação proteômica tem sido utilizada em diversas matrizes com intuito de esclarecer fisiopatologia, agressividade e progressão do CP. Porém os estudos apresentam baixa reprodutibilidade e são necessários estudos com coortes separadas para confirmação dos resultados obtidos até o momento. Acreditamos que a urina coletada após ejaculação seja uma

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

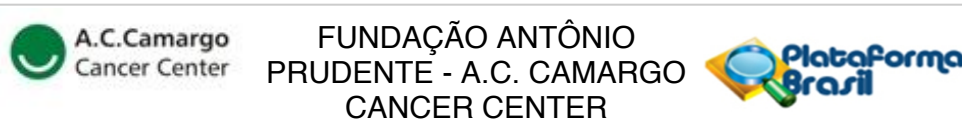
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 4.806.720

opção à coleta após massagem prostática, com menos custos e desconforto durante a coleta, sendo reprodutível em nosso país. Além disso, estimamos que seja mais representativa do microambiente prostático. Assim como o plasma seminal, poderia ser utilizada como fonte para avaliação proteômica e transcriptômica, com alto potencial para identificação de biomarcadores do CP. Deste modo, os autores intencionam realizar um projeto voltado à avaliação proteômica e transcriptômica no plasma seminal e urina após a ejaculação em pacientes submetidos à biópsia de próstata por suspeita de câncer de próstata e em pacientes saudáveis sem afecções prostáticas (grupo controle).

Critério de Inclusão:

3.2 Critérios de inclusão

3.2.1 Grupo suspeito para câncer de próstata.

- a) Indivíduos com idade entre 40 e 60 anos;
- b) Pacientes com indicação de biópsia de próstata determinado a juízo clínico do urologista responsável, considerando alteração do PSA (ou de seus derivativos) e/ou exame dígito retal com nódulo e/ou ressonância multiparamétrica suspeita para lesão clinicamente significativa e/ou com resultado anatomopatológico de biópsia anterior suspeita para CP.

3.2.2 Grupo controle.

- a) Indivíduos com idade entre 40 e 60 anos;
- b) Pacientes assintomáticos em seguimento ambulatorial de rotina;
- c) Exame dígito retal sem alterações;
- d) Nível sérico do PSA < 1,0 ng/dl; e) Ausência de queixas de STUI

Critério de Exclusão:

3.3 Critérios de exclusão.

- a) História pregressa de procedimentos cirúrgicos prostáticos;
- b) Uso de alfa-bloqueadores e inibidores de 5-alfa redutase, ou antiandrogênicos, estrógenos ou agonistas/antagonistas do LHRH nos últimos 30 dias;
- c) Infecção de urina ou prostatite aguda vigente;
- d) Diagnóstico de outro câncer primário, prévio ou em tratamento, exceto câncer de pele não-melanoma (carcinoma espinocelular e carcinoma basocelular);

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 4.806.720

- e) Portadores de distúrbios da ejaculação devido a neuropatias diversas (clínica, idiopática, pós-radioterapia, pós-operatória, medicamentosa);
- f) Portadores de distúrbios psiquiátricos e/ou cognitivos;
- g) incapacidade de masturbação e/ou fornecimento da amostra adequada de sêmen pelo paciente em até duas tentativas;
- e) Estenose de uretra que impeça ou reduza a eliminação do sêmen em quantidade adequada para coleta.

Desfecho Primário:

Rastrear e identificar as proteínas presentes no plasma seminal e na urina pós ejaculação em pacientes com biópsia de próstata positiva para CP, biópsia de próstata negativa e em pacientes controles, sem suspeita de malignidade.

Desfecho Secundário:

Identificar as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos e quais poderiam representar futuros biomarcadores para CP;- Avaliar a presença da fusão TMPRSS2-ERG na urina pós ejaculação em pacientes com câncer de próstata.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Rastrear e identificar proteínas presentes no plasma seminal e na urina pós ejaculação em pacientes com biópsia de próstata positiva para CP, biópsia de próstata negativa e em pacientes controles, sem suspeita de malignidade.

Objetivo Secundário:

Identificar as proteínas diferencialmente expressas entre os grupos e quais poderiam representar futuros biomarcadores para CP;- Avaliar a presença da fusão TMPRSS2-ERG na urina pós ejaculação em pacientes com câncer de próstata.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador:

Riscos:

A coleta de sêmen deve ser realizada por masturbação em frasco coletor estéril, fornecido pelo laboratório. A coleta da urina deve ser realizada no momento da primeira micção após a ejaculação, em frasco coletor estéril, fornecido. Este procedimento não oferece nenhum risco, mas

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

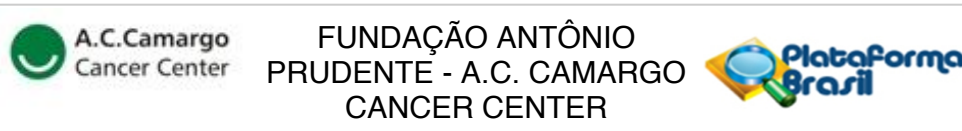
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 4.806.720

pode causar algum desconforto ou constrangimento. Sua participação será inteiramente voluntária.

Benefícios:

Contribuir com um estudo de grande importância para o câncer de próstata, que vai avaliar possíveis proteínas presentes no sêmen e urina após ejaculação que possam estar relacionadas ao câncer de próstata e possivelmente associadas a um novo biomarcador para esta doença. Caso ele seja encontrado, você poderá contribuir para o diagnóstico desse câncer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de uma resposta ao parecer consubstanciado CEP nº 4.725.471 datado em 21/05/2021.

1.3 - Na seção "VII - DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS" e "VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO" menciona-se que será aplicado aos participantes um questionário, no entanto, o mesmo não foi submetido para avaliação deste CEP. Solicita-se que este documento seja encaminhado para avaliação.

*RESPOSTA ANTERIOR: Questionário: Não será necessário que o paciente responda questionário para participação no projeto. Dados serão obtidos em revisão de prontuário. Corrigido informação no TCLE.

*ANÁLISE ANTERIOR: pendência parcialmente atendida. Na página 3 de 5, no documento "TCLE.docx", postado na PB em 18/02/2021, ainda faz-se menção ao questionário "O(s) questionário(s) poderá(ão) causar um sentimento de desconforto ou ansiedade frente às perguntas realizadas. Os pesquisadores estarão disponíveis para conversar e prestar apoio se necessários, frente a estas situações".

* RESPOSTA ATUAL: Retirado menção a questionário na página 3 do TCLE.

* ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



**FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER**



Continuação do Parecer: 4.806.720

1.5 - Ainda na seção "VII - DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS", menciona-se que "A coleta de sêmen e urina após ejaculação será feita no Laboratório de Andrologia e Reprodução Humana da Disciplina de Urologia, localizado na Rua Napoleão de Barros, 628 por masturbação". De acordo com (Resolução CNS nº 466 de 2012 item IV 3g), solicita-se que seja explicitada a garantia de ressarcimento e como serão cobertas as despesas tidas pelos participantes da pesquisa (como seu transporte até o local de coleta).

*RESPOSTA ANTERIOR: Detalhado garantia de ressarcimento com gastos para transporte. "Despesas referentes ao transporte até o local da coleta serão ressarcidas mediante a demonstração de comprovante de pagamento do meio de transporte utilizado".

*ANÁLISE ANTERIOR: pendência parcialmente atendida. O TCLE deve assegurar de forma clara e afirmativa o ressarcimento de todos os gastos que o participante e seu(s) acompanhante(s) terão ao participar da pesquisa, sem limitar os itens (ex. transporte) ou valores. RESOLUÇÃO CNS Nº 466 de 2012: II.21, IV.3.g.

RESPOSTA ATUAL: Corrigido orientação quanto a ressarcimento de despesas, na seção "VII DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTO": "Os pacientes participantes do projeto e acompanhantes terão direito a reembolso das despesas realizadas para coleta de exames e atendimentos relacionados ao projeto (Ex: transporte, alimentação, etc.). Isto será feito diretamente com o pesquisador do estudo que explicará o projeto aos participantes".

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

1.8 - Sobre a seção "XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS", solicita-se que nessa seção conste esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa, inclusive considerando benefícios e acompanhamentos posteriores ao encerramento e/ ou a interrupção da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012 item IV 1c). Ressalta-se que a informação sobre os responsáveis já consta na seção XIII.

*RESPOSTA ANTERIOR: Esclarecimento sobre assistência e acompanhamento em seção XII. "O acompanhamento dos participantes da pesquisa será realizado pelo urologista titular do A.C. Camargo Cancer Center pelo qual o paciente já realizava as consultas previamente. Não haverá alteração do protocolo de acompanhamento, periodicidade de consultas ou interferência nos possíveis tratamentos indicados. O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo".

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

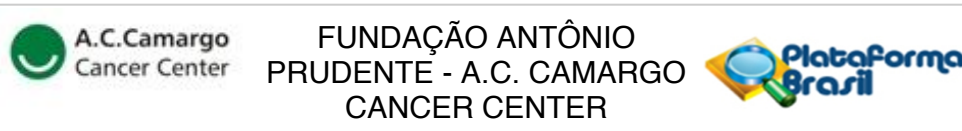
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 4.806.720

***ANÁLISE ANTERIOR:** pendência não atendida. SOLICITA-SE explicitação no texto do direito do participante da pesquisa à assistência (Resolução CNS N° 466 de 2012 item II.6, V.6 - O TCLE deve assegurar, de forma clara e afirmativa, que o participante de pesquisa receberá a assistência integral e imediata, de forma gratuita (pelo patrocinador), pelo tempo que for necessário em caso de danos decorrentes da pesquisa.).

RESPOSTA ATUAL: Corrigido esclarecimento quanto a acompanhamento dos participantes do projeto, na seção "XII ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA": "Em caso de danos decorrentes da pesquisa, os participantes receberão assistência integral e imediata, de forma gratuita, pelo tempo que for necessário."

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

4. Solicita-se alterar data de início da pesquisa, que consta como 01/10/2020 para data posterior à aprovação do projeto por este CEP.

RESPOSTA ANTERIOR: Alterado data de início do projeto.

ANÁLISE ANTERIOR: pendência não atendida. Não foi submetido na plataforma brasil para apreciação o cronograma alterado. Solicita-se submissão de arquivo de cronograma atualizado (NORMA OPERACIONAL CNS N° 001 de 2013: 3.4.1.9).

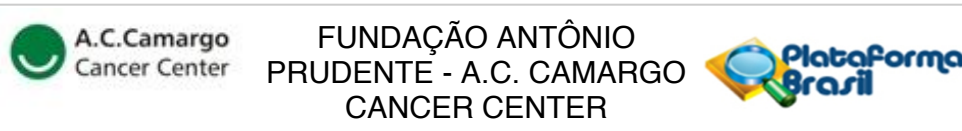
RESPOSTA ATUAL: Alterado cronograma de início do projeto na Plataforma Brasil: Início 01/10/2021.

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

5 - O arquivo ORÇAMENTO (arquivo "ORÇAMENTO.pdf" postado na Plataforma Brasil em 02/09/20) não apresenta detalhamento dos gastos, com informações discrepantes daquelas apresentadas no texto do projeto (arquivo "Projeto_Doutorado_EPM_UNIFESP_ACCCC.docx" postado na Plataforma Brasil em 02/09/20), no arquivo de INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO (arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1598948.pdf" postado na Plataforma Brasil em 11/09/20) e no FORMULÁRIO PARA SUBMISSÃO DO PROJETO AO CEP (arquivo SUBMISSAO.pdf postado na Plataforma Brasil em 02/09/20). No arquivo ORÇAMENTO consta apenas o gasto com fotocópias, com custo total 10 reais, o que não condiz com a metodologia descrita no projeto.

RESPOSTA ANTERIOR: Corrigido arquivo ORÇAMENTO.pdf conforme informações contidas na Plataforma Brasil.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 4.806.720

ANÁLISE ANTERIOR: pendência parcialmente atendida. O documento "Orcamento.pdf" submetido em 18/02/2021 apresenta agora detalhamento dos gastos da pesquisa, mas contém informações discrepantes daquela presente no documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1598948.pdf" submetido na PB em 23/03/2021. **SOLICITA-SE** harmonização das informações em ambos os documentos e ressalta-se que deve detalhar os recursos, fontes e destinação; (...); apresentar previsão de ressarcimento de despesas do participante e seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação e compensação material nos casos ressalvados no item II.10 da Resolução do CNS 466 de 2012 (NORMA OPERACIONAL CNS N° 001 de 2013:3.3.e).

RESPOSTA ATUAL: Readequado orçamento, com adição de valores correspondentes a despesas reembolsáveis para os participantes do projeto.

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

7 - Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (referente ao arquivo "TCLE.docx") postado na Plataforma Brasil em 18/02/2021:

7.1 - **SOLICITA-SE** incluir o e-mail do Comitê de ética em pesquisa da instituição:

cep_accamargo@accamargo.org.br, na página 5 de 5, juntamente com os dados de endereço e telefone do CEP. (RESOLUÇÃO CNS N° 466 de 2012: IV.5.d).

RESPOSTA ATUAL: Adicionado e-mail do CEP no TCLE, página 5 de 5.

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

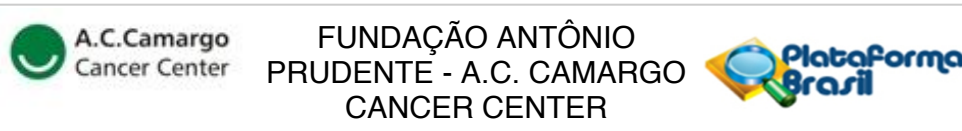
7.2 - Solicita-se incluir a informação de que o prontuário médico será consultado para fins de coleta de dados para pesquisa.

RESPOSTA ATUAL: Incluído informação sobre a realização de consulta do prontuário médico para coleta de dados para a pesquisa na seção "XIII OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES".

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

7.3 - Solicita-se que para os locais de rubrica e assinatura seja utilizada a terminologia preconizada na Res. 466 de 2012 "Participante de pesquisa/ Representante legal" e "Pesquisador" ao invés de somente "participante" e "pesquisador responsável". Solicita-se ainda remover o nome

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



Continuação do Parecer: 4.806.720

do pesquisador (Lucas Fornazieri) do local da assinatura. (RESOLUÇÃO CNS N° 466 de 2012: II.15, II.16).

RESPOSTA ATUAL: Corrigido terminologia em locais de rubrica no TCLE, página 5 de 5.

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

7.4 - SOLICITA-SE inserir local apropriado para rubrica do pesquisador e participante da pesquisa/responsável no rodapé de todas as páginas do documento "TCLE.docx" de 18/02/2021. (RESOLUÇÃO CNS N° 466 de 2012:II.10, IV.5.d).

RESPOSTA ATUAL: Inserido local para rubrica do participante e pesquisador em todas as páginas do TCLE.

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

7.5 - Solicita-se inserir no item X-CONFIDENCIALIDADE quais procedimentos serão empregados para assegurar a confidencialidade e a privacidade dos participantes da pesquisa (ex. anonimização dos dados, uso de siglas, etc) (RESOLUÇÃO CNS N° 466 de 2012: III.2.i).

RESPOSTA ATUAL: Inserido procedimento de anonimização dos dados na seção "X CONFIDENCIALIDADE" participante e pesquisador em todas as páginas do TCLE.

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

7.6 - Na página 5 de 5 lê-se "Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa". Solicita-se adequação da frase para: "Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é elaborado em duas vias, ambas deverão ser rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s). O participante da pesquisa ficará com uma das vias, sendo que a outra ficará arquivada com o pesquisador". (Resolução CNS 466 de 2012 IV.5).

RESPOSTA ATUAL: Modificado texto na página 5 de 5, conforme Resolução CNS 466 de 2012 IV.5): "Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é elaborado em duas vias, ambas deverão ser rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade **CEP:** 01.509-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 **Fax:** (11)2189-5020 **E-mail:** cep_accamargo@accamargo.org.br



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 4.806.720

pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s). O participante da pesquisa ficará com uma das vias, sendo que a outra ficará arquivada com o pesquisador".

ANÁLISE ATUAL: Pendência atendida.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto em referência (registro CEP nº.2972/20) será desenvolvido por, Lucas Fornazieri, aluno de Doutorado.

NOTA: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1598948.pdf	26/05/2021 08:20:11		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	26/05/2021 08:18:16	LUCAS FORNAZIERI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Submissao.pdf	26/05/2021 08:18:07	LUCAS FORNAZIERI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutorado.docx	26/05/2021 08:17:50	LUCAS FORNAZIERI	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	26/05/2021 08:17:37	LUCAS FORNAZIERI	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	26/05/2021 08:17:16	LUCAS FORNAZIERI	Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	26/05/2021 08:17:07	LUCAS FORNAZIERI	Aceito
Folha de Rosto	FR_Stenioassinado.pdf	11/03/2021	LUCAS FORNAZIERI	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br



**FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER**



Continuação do Parecer: 4.806.720

Folha de Rosto	FR_Stenio_assinado.pdf	17:24:09	LUCAS FORNAZIERI	Aceito
Outros	DECLARACAO_Ciencia_COMPROMETIMENTO.pdf	18/02/2021 08:14:13	LUCAS FORNAZIERI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Imagem.pdf	10/09/2020 08:44:01	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Patologia.pdf	10/09/2020 08:43:34	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_COMPROMISSO.pdf	02/09/2020 12:50:55	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	RECRUTAMENTO.pdf	02/09/2020 12:50:22	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	MATERIAL_BIOLOGICO.pdf	02/09/2020 12:50:03	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DADOS_BIOBANCO.pdf	02/09/2020 12:49:39	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DADOS_COLETADOS.pdf	02/09/2020 12:49:29	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CURRICULOS.pdf	02/09/2020 12:49:17	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CIENCIA_URO.pdf	02/09/2020 12:49:06	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CIENCIA_BIOBANCO.pdf	02/09/2020 12:48:37	Stênio de Cássio Zequi	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	INFRAESTRUTURA.pdf	02/09/2020 12:45:37	Stênio de Cássio Zequi	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 25 de Junho de 2021

**Assinado por:
Sandra Caires Serrano
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br