

## Estágio Curricular

# **Integração de Técnicas Laboratoriais e Bioinformática na Investigação Molecular do Cancro da Próstata**

**Cláudia Silvâna Mendes Soares Rosa**

*Relatório de Estágio apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e ao  
Instituto Politécnico da Guarda para obtenção do Grau de Mestre em Ciências  
Aplicadas à Saúde – Ramo Biotecnologia*

*Orientada pela Professora Doutora Neidy Varela Rodrigues, UNICV-FCT*

*Bragança, 2025*

Cláudia Silvâna Mendes Soares Rosa



Estágio realizado na Universidade de Cabo Verde (UniCV) no âmbito do projeto INCUBATOR, em parceria com o Hospital Agostinho Neto, integrando atividades no Laboratório de Histopatologia.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me conceder saúde, força e sabedoria para concluir mais esta etapa da minha vida acadêmica.

A minha profunda gratidão à Professora Doutora Neidy Varela Rodrigues, pela orientação dedicada, apoio científico, disponibilidade constante e incentivo ao longo deste estágio. A sua orientação foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço igualmente à Universidade de Cabo Verde e ao Hospital Dr. Agostinho Neto, pela oportunidade e pela colaboração no acolhimento e fornecimento de amostras, bem como a todos os profissionais que contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização deste projeto.

Um agradecimento especial à minha colega de estágio e a todo o corpo técnico do laboratório, pelo companheirismo, pela troca de conhecimentos e pela partilha de experiências.

Por fim, agradeço à minha família pelo suporte emocional, pelo carinho e pelo incentivo contínuo ao longo deste percurso.

## **RESUMO**

O cancro da próstata (CP) constitui uma das principais causas de morbilidade e mortalidade masculina, sendo um grave problema de saúde pública. Este estágio curricular, realizado na Universidade de Cabo Verde no âmbito do projeto INCUBATOR, teve como objetivo a validação de protocolos laboratoriais no sistema Bento Lab e a identificação de potenciais biomarcadores moleculares associados ao CP.

O trabalho desenvolveu-se em duas fases: A primeira é otimização dos protocolos de centrifugação, PCR e eletroforese em gel; A segunda consiste na aplicação prática em amostras biológicas locais, com extração de DNA/RNA, seleção de genes candidatos a partir das bases e GEO, e análise comparativa de expressão diferencial pela plataforma TNMplot.

Foram avaliados os genes SPON2, PCAT19 e GADD45G. O PCAT19 apresentou subexpressão consistente em tecidos tumorais, o GADD45G não demonstrou diferenças relevantes e o SPON2 revelou sobreexpressão, sobretudo em estádios avançados.

Os resultados sugerem o PCAT19 como potencial biomarcador de subexpressão no CP, enquanto o SPON2, paradoxalmente sobreexpresso, poderá estar associado à progressão tumoral. Estes achados reforçam a necessidade de estudos complementares para validação clínica e translacional.

Palavras-chave: Cancro da próstata; Biomarcadores moleculares; Expressão genética; PCAT19; SPON2.

## **ABSTRACT**

The Prostate Cancer (PCa) is one of the leading causes of male morbidity and mortality, representing a major public health concern. This curricular internship, carried out at the University of Cabo Verde within the scope of the INCUBATOR project, aimed to validate laboratory protocols using the Bento Lab system and to identify potential molecular biomarkers associated with PCa.

The work was developed in two phases: The first involved the optimisation of centrifugation, PCR, and gel electrophoresis protocols; the second consisted of their practical application to local biological samples, including DNA/RNA extraction, selection of candidate genes from GEO databases, and comparative analysis of differential gene expressions using the TNMplot platform.

The genes SPON2, PCAT19, and GADD45G were evaluated. PCAT19 showed consistent underexpression in tumour tissues, GADD45G did not exhibit relevant differences, and SPON2 demonstrated overexpression, particularly in advanced disease stages.

Overall, the findings suggest PCAT19 as a potential underexpressed biomarker in PCa, while the paradoxical overexpression of SPON2 may be associated with tumour progression. These results emphasise the need for further complementary studies to achieve clinical and translational validation.

**Keywords:** Prostate cancer; Molecular biomarkers; Gene expression; PCAT19; SPON2.

# ÍNDICE

---

<b>RESUMO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS DO ESTÁGIO/ ATIVIDADES DESENVOLVIDAS</b> .....	<b>12</b>
<b>BENTO LAB</b> .....	<b>14</b>
PROCOLOS VALIDADOS .....	14
<i>Centrifugação</i> .....	14
<i>PCR</i> .....	14
<i>Eletroforese em Gel</i> .....	14
<b>CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
1.1 ENQUADRAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DO CANCRO DA PRÓSTATA .....	17
1.2 ANATOMIA E FISILOGIA DA PRÓSTATA.....	18
1.3 ESTRUTURA ANATÓMICA E HISTOLÓGICA DA PRÓSTATA.....	18
1.4 PRINCIPAIS PATOLOGIAS DA PRÓSTATA .....	19
1.4.1 <i>Hiperplasia benigna da próstata (HBP)</i> .....	19
1.4.2 <i>Prostatite</i> .....	20
1.4.3 <i>Cancro da Próstata (CP)</i> .....	21
1.5 DIAGNOSTICO E MONITORAÇÃO DE CP.....	22
1.6 MECANISMOS MOLECULARES O CANCRO DA PRÓSTATA .....	22
1.6.1 <i>Alterações Genéticas no Cancro da Próstata</i> .....	23
1.6.2 <i>Vias de sinalização no Cancro da Próstata</i> .....	24
1.6.3 <i>Epigenética no Cancro da próstata</i> .....	25
1.6.4 <i>Resistência à castração no Cancro da Próstata</i> .....	26
1.7 BIOMARCADORES DO CANCRO DA PRÓSTATA.....	27
1.7.1 <i>Expressão génica dos genes relevantes no Cancro da Próstata</i> .....	27
1.7.1.1 Gene Prostate Cancer Associated Transcript 19 (PCAT19) .....	28
1.7.1.2 Gene Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Gamma (GADD45G) .....	29
1.7.1.3 Gene SPON2.....	29
<b>CAPÍTULO II – OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO DO ESTUDO.....	31
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	31
<b>CAPÍTULO III – METODOLOGIAS</b> .....	<b>32</b>
3.1 DESENHO METODOLÓGICO.....	33
3.2 ANÁLISE EXPERIMENTAL .....	33
3.2.1 <i>Tipo e origem das amostras</i> .....	33
3.2.2 <i>Critérios de inclusão</i> .....	33
3.2.3 <i>Tamanho amostral</i> .....	33
3.2.4 <i>Considerações éticas</i> .....	33
3.3 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA.....	34

3.3.1	<i>Bases de dados</i> .....	34
3.3.2	<i>Seleção dos genes</i> .....	34
3.3.3	<i>Ferramenta de análise</i> .....	34
3.3.4	<i>Métricas utilizadas</i> .....	34
3.3.5	<i>Análise Estatística e Representação Gráfica</i> .....	34
3.4	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS:.....	35
3.4.1	<i>Extração de DNA na amostra de tecido</i> .....	35
3.4.2	<i>Extração de RNA em amostra de sangue</i> .....	37
3.4.3	<i>Validação da extração de DNA através de Eletroforese em gel</i> .....	40
<b>CAPÍTULO IV - RESULTADOS</b> .....		<b>43</b>
4.1	RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	44
4.1.1	<i>Extração e integridade de DNA</i> .....	44
4.1.2	<i>Extração e quantificação do RNA</i> .....	45
4.2	RESULTADOS <i>IN SILICO</i> .....	46
4.2.1	<i>Análise bioinformática da expressão génica de PCAT19</i> .....	46
4.2.1.1	<b>Informações gerais do gene PCAT19</b> .....	46
4.2.1.2	<b>Análise da expressão génica do gene PCAT19 em TNMplot</b> .....	46
4.2.2	<i>Análise bioinformática da expressão génica de GADD45G</i> .....	48
4.2.2.1	<b>Informações gerais do gene GADD45G</b> .....	48
4.2.2.2	<b>Análise da expressão génica do gene GADD45G em TNMplot</b> .....	48
4.2.3	<i>Análise bioinformática da expressão génica de SPON2</i> .....	49
4.2.3.1	<b>Informações gerais do gene SPON2</b> .....	49
4.2.3.2	<b>Análise da expressão génica do gene SPON2 em TNMplot</b> .....	50
4.2.4	<i>Comparação da expressão génica de SPON2 em diferentes estádios do cancro da próstata</i> .....	51
4.2.5	<i>Expressão diferencial e correlação entre os genes PCAT19, GADD45G, SPON2 no cancro da próstata</i> 52	
<b>CAPÍTULO V - DISCUSSÃO /CONCLUSÃO</b> .....		<b>54</b>
5.1	DISCUSSÃO/CONCLUSÃO.....	55
5.2	LIMITAÇÃO DO ESTUDO.....	57
5.3	RECOMENDAÇÕES.....	58
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....		<b>60</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		61
<b>ANEXOS</b> .....		<b>67</b>

## Índice de figura

Figura 1 - - Anatomia do órgão reprodutor masculino (Todd M Hoagland, 2025).....	18
Figura 2 - Presença de corpos amiláceos em tecido prostático, observados em coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). A imagem foi obtida no âmbito do Projeto INCUBATOR, destinado ao fortalecimento da investigação em histopatologia e cancro da próstata em Cabo Verde.....	20
Figura 3 - Imagens histológicas da próstata coradas em Hematoxilina & Eosina (H&E), com diferentes padrões morfológicos:.....	22
Figura 4 - corte de tecido prostático .....	36
Figura 5 - Amostra pipetado e transferida para um novo tubo .....	37
Figura 6 - Formação de pellet branco de RNAig.....	39
Figura 7 - Solução de agarose no poço .....	41
Figura 8 - aplicação das amostras no gel .....	42
Figura 9 - Resultado da eletroforese em gel .....	45
Figura 10 - Expressão do gene PCAT19 no tecido normal e tumoral I da próstata (TNMplot, n.d.) ..... <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
Figura 11 - - Expressão do gene GADD45G no tecido tumoral e normal da próstata (TNMplot, n.d.).....	49
Figura 12 - - Expressão do gene SPON2 no tecido tumoral e normal da próstata (TNMplot, n.d.) .....	50
Figura 13 - Expressão de SPON2 em diferentes estádios do CP (TNMplot, n.d.) <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
Figura 14 - Correlação entre os genes PCAT19, GADD45G, SPON2 (TNMplot, n.d.) ..... <b>Erro! Marcador não definido.</b>	
Figura 15 - Perfis de expressão diferencial de PCAT19, SPON2 e GADD45G no cancro da próstata.....	52

## ABREVIATURAS

CP	Cancro da Próstata
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GEO	Gene Expression Omnibus
lncRNA	Long non-coding RNA
SPON2	Spondin 2
GADD45G	Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Gamma
PCAT19	Prostate Cancer Associated Transcript 19
TBE	Tris-Borato-EDTA
RPM	Rotações Por Minuto
G	Força centrífuga relativa
ITU	Infeção de Trato Urinaria
UNICV	Universidade de Cabo Verde
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
GEO	Gene Expression Omnibus
PALOP	Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa
AR	Recetor Andrógeno
DHT	Diidrotestosterona
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
CRPC	Cancro da Próstata Resistente à Castração
PHI	Prostate Health Index
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
miRNAs	MicroRNAs
LncRNAs	RNA longo não codificante

PSA	Antigénio Específico da Próstata
PSMA	Prostate-Specific Membrane Antigen
HE	Hematoxilina-Eosina

## INTRODUÇÃO

No âmbito do curso de Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde, da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico de Bragança e do Instituto Politécnico da Guarda, e conforme o respetivo plano de estudos, foi desenvolvido o presente relatório de estágio, que descreve e analisa o percurso desenvolvido ao longo do estágio curricular, com enfoque na consolidação de competências na área da Biotecnologia.

O estágio curricular decorreu no Laboratório de Histopatologia da Universidade de Cabo Verde (UniCv), integrado no projeto INCUBATOR, uma iniciativa de investigação aplicada que visa compreender a incidência do cancro da próstata em homens de Cabo Verde e Moçambique, através de um estudo clínico-patológico que procura identificar o subtipo mais frequente desta neoplasia.

A investigação em Cancro da Próstata (CP) tem adquirido crescente importância, devido a sua elevada prevalência e impacto clínico, que contribui uma das principais causas da mortalidade oncológica masculina a nível global. A doença caracteriza-se por heterogeneidade molecular e clínica, refletida nas diferentes vias de progressão tumoral. Esta variabilidade torna essencial a identificação de biomarcadores moleculares capazes de melhorar o diagnóstico, refinar a estratificação prognóstica e apoiar decisões terapêuticas mais individualizadas (National Cancer Institute, 2024).

Neste contexto, os estádios clínicos do cancro da próstata (CP) constituem uma ferramenta fundamental para a compreensão da evolução da doença. A classificação clínica do CP baseia-se na conjugação do sistema Tumor, Nódulo, Metástase (TNM), do valor do antígeno específico da próstata (PSA) e do grau histológico (Gleason), permitindo a estratificação da doença em diferentes níveis de risco, e orientando a tomada de decisão clínica (Sekhoacha *et al.*, 2022).

Neste relatório destacam-se os estádios II, III e IV, os mais frequentes analisados em estudos de expressão génica:

- Estádio II: a neoplasia ainda está confinada à próstata, mas já características morfológicas ou moleculares que indicam maior risco de progressão (National Cancer Institute, 2024).
- Estádio III: tumor localmente avançada, ultrapassando a cápsula prostática, podendo invadir estruturas periprostáticas, como as vesículas seminais. Tem maior potencial invasivo e implicações prognósticas mais desfavoráveis (National Cancer Institute, 2024).

- Estádios IV: o tumor está avançado ou metastático, com invasão de gânglios linfáticos regionais e disseminação para órgãos distantes, como ossos ou fígado (National Cancer Institute, 2024).

No âmbito da linha de investigação voltada aos estudos molecular do projeto incubator, o presente estágio subdivide-se em duas partes principais.

A primeira parte consistiu na validação do protocolo de funcionalidade do equipamento Bento Lab. Esta fase envolveu-se a familiarização com o sistema Bento, a elaboração do protocolo técnico (em anexo) e a realização dos ensaios experimentais para avaliar a sua fiabilidade operacional.

A segunda parte tratou sobre a análise molecular e bioinformática de genes associados à fisiopatologia do CP, com particular enfoque nos genes PCAT19, GADD45G e SPON2.

As investigações em biologia molecular assumem um papel central na compreensão dos mecanismos que sustentam a patogénese do CP. Vários estudos demonstram que a desregulação da expressão génica, nomeadamente a subexpressão de determinados genes, pode contribuir para a progressão tumoral e a resistência aos tratamentos. A identificação de genes subexpressos é, por isso, essencial para o desenvolvimento de biomarcadores de diagnóstico e de alvos terapêuticos inovadores (Bergez-Hernández, *et al.*, 2024).

Para esta finalidade, foram analisados dados disponíveis em bases públicas como o NCBI Gene Expression Omnibus (GEO). Utilizando ferramentas de bioinformática, a plataforma TNMplot, para identificar genes diferencialmente expressos entre tecidos tumorais da próstata e tecidos saudáveis, contribuindo assim para um maior entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes à doença.

Este relatório descreve o percurso metodológico seguindo os resultados obtidos e uma discussão sobre os genes identificados e o seu papel na fisiopatologia do cancro da próstata.

## OBJETIVOS DO ESTÁGIO/ ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

- **Objetivo geral**

Desenvolver competências técnicas e científicas na área da biotecnologia, através da aplicação e validação de procedimentos básicos de biologia molecular, recorrendo a equipamentos laboratoriais portáteis, com vista ao apoio à investigação molecular no cancro da próstata.

- **Objetivo específico**

- ✓ Validar a funcionalidade operacional dos módulos de centrifugação e eletroforese do equipamento Bento Lab.
- ✓ Aplicar protocolos de extração de DNA e RNA a partir de amostras biológicas.
- ✓ Avaliar qualitativamente a integridade dos ácidos nucleicos extraídos por eletroforese em gel.
- ✓ Adaptar protocolos laboratoriais às especificações técnicas de um equipamento portátil.

- **Atividades realizadas**

Durante o estágio foram desenvolvidas as seguintes atividades principais:

- Familiarização com o equipamento Bento Lab.
- Extração de DNA genómico a partir de tecido prostático humano.
- Extração de RNA a partir de sangue periférico.
- Avaliação qualitativa da integridade do DNA por eletroforese em gel de agarose.
- Validação funcional dos módulos de centrifugação e eletroforese do Bento Lab.
- Análise *in silico* de dados de expressão génica recorrendo a bases de dados públicas.

---

PARTE I – VALIDAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DO BENTO LAB

---

## **BENTO LAB**

O Bento Lab é um laboratório portátil de biologia molecular que integra, num único sistema compacto, módulos como centrífuga, termociclador PCR e sistema de eletroforese em gel. O equipamento foi concebido para permitir a realização de procedimentos laboratoriais essenciais fora de laboratórios convencionais, sendo particularmente adequado a ambientes com limitações limitados.

A sua utilização no estágio justificou-se por ser um equipamento inovador em Cabo Verde, com necessidade de dispor de uma solução compacta e funcional, capaz de suportar as etapas experimentais previstas, nomeadamente a extração e análise qualitativa de ácidos nucleicos. O reduzido volume, a facilidade de transporte e a integração de múltiplas funções num único equipamento constituíram vantagens operacionais relevantes.

## **Protocolos Validados**

### **Centrifugação**

O módulo de centrifugação foi utilizado durante os procedimentos de extração de DNA e RNA, com o objetivo de promover a separação eficiente de componentes celulares e precipitados. Foi testado a capacidade de formação de pellets visíveis e bem definidos e a eficiência da separação durante as etapas de extração

### **PCR**

Embora o Bento Lab integre um termociclador PCR, este módulo não foi validado experimentalmente no presente estágio.

### **Eletroforese em Gel**

O sistema de eletroforese foi validado através da análise qualitativa da integridade do DNA extraído. Foi testado a migração adequada do DNA em gel de agarose e a capacidade de visualização de bandas sob luz UV.

---

PARTE II – ANÁLISE BIOINFORMÁTICA DA EXPRESSÃO GÊNICA

---

## CAPÍTULO I – ENQUADRAMENTO TEÓRICO

---

## 1.1 Enquadramento epidemiológico do cancro da próstata

O cancro da próstata é uma das principais causas de morte por cancro em homens a nível mundial, representando um relevante problema de saúde pública (Bergez-Hernández, *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2023) A sua incidência aumenta significativamente com a idade, sendo uma tendência observada em diversos países (Jin *et al.*, 2020).

De acordo com os dados do GLOBOCAN de 2022, o CP foi o segundo tipo de cancro mais frequentemente diagnosticado entre os homens a nível global, com aproximadamente 1,47 milhões de novos casos, representando 7,3% de todos os casos de cancro. Este tipo de cancro foi também responsável por cerca de 375 mil mortes, ocupando a quinta posição entre as causas de morte por cancro nos homens em todo o mundo (Filho *et al.*, 2025).

Na Europa, o CP permanece entre os cancros masculinos mais prevalentes, representando um desafio significativo para os sistemas de saúde, apesar dos avanços terapêuticos e diagnósticos. A elevada incidência e o impacto clínico fazem dele uma prioridade no âmbito da oncologia urológica (Ferlay J, 2024).

Nos países africanos, incluindo os Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa (PALOP), observa-se uma tendência crescente de incidência e mortalidade associada ao CP. A África, com uma população aproximada de 1,4 mil milhões de habitantes, regista anualmente cerca de 1,1 milhões de novos casos de cancro, resultando em mais de 700 000 mortes. Em 2022, foram notificados 1 185 216 novos casos de cancro (506 032 em homens e 679 184 em mulheres), dos quais ocorreram 763 843 óbitos (INCUBATOR, 2025).

Entre os 506 032 homens diagnosticados com cancro, o cancro da próstata foi o mais prevalente, liderando o ranking com 103 050 novos casos. Nos PALOP — Angola, Cabo Verde, Guiné-Bissau, Moçambique e São Tomé e Príncipe e tal como em Portugal, Brasil e Timor-Leste, os registos apontam igualmente para valores elevados de incidência, prevalência e mortalidade por CP (INCUBATOR, 2025).

Em Cabo Verde, ainda segundo o GLOBOCAN 2022, o CP é o tipo de cancro mais frequente entre os homens no país, com uma taxa de incidência padronizada de 43,6 casos por 100.000 homens/ano, considerada elevada para a realidade nacional.

## 1.2 Anatomia e Fisiologia da Próstata

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino, localizada anterior ao reto, inferior à bexiga urinária e envolvendo a porção inicial da uretra. A posição anatômica confere-lhe um papel fundamental na fertilização masculina. Num adulto jovem, anatomicamente, ela apresenta uma forma semelhante a uma castanha ou uma noz, pesando em média entre 20 e 30 gramas (American Cancer Society, 2023; Levin, 2018).

A principal função da próstata é a produção de uma parte significativa do líquido que faz parte do sémen, este líquido nutre e protege os espermatozoides, facilitando a sua mobilidade e a capacidade de fertilização (Levin, 2018).

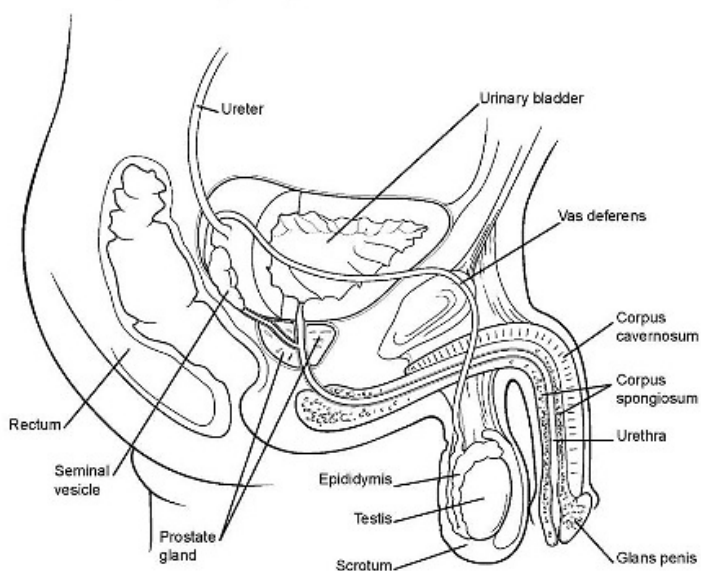


Figura 1 - - Anatomia do órgão reprodutor masculino (Todd M Hoagland, 2025)

## 1.3 Estrutura anatômica e histológica da próstata

A próstata é composta por diferentes zonas anatômicas, e cada uma delas tem características histológicas específicas. A zona periférica é responsável por cerca de 70% do volume prostático; é onde ocorre a maioria dos casos de carcinomas da próstata. A zona de transição corresponde a 5% do volume e está associada à hiperplasia benigna da próstata. A zona central com os restantes

25% envolve os ductos ejaculatórios. Ainda existe a zona fibromuscular anterior, uma área não glandular constituída por tecido muscular fibroconjuntivo. Histologicamente, a próstata é composta por glândulas tubuloalveolares distribuídas em lóbulos, rodeada por estroma fibromuscular rico em colágeno e musculo liso. Histologicamente, a próstata é composta por glândulas tubuloalveolares distribuídas em lóbulos, rodeada por estroma fibromuscular rico em colágeno e musculo liso. (Francis & Swain, 2018).

A formação e o desenvolvimento da próstata, bem como a manutenção da sua integridade estrutural e funcional ao longo da vida, dependem da ação dos andrógenos, hormonas sexuais masculinas produzidas pelos testículos, a testosterona (Francis & Swain, 2018).

A testosterona, produzida principalmente nos testículos, pode ser convertida em diidrotestosterona (DHT) na próstata pela ação da enzima  $5\alpha$ -redutase, ou em estradiol pela aromatase. A DHT, mais biologicamente ativa, liga-se ao Recetor de Androgénio (AR) com maior afinidade e estabilidade do que a testosterona (Davey & Grossmann, 2016).

## **1.4 Principais Patologias da Próstata**

### **1.4.1 Hiperplasia benigna da próstata (HBP)**

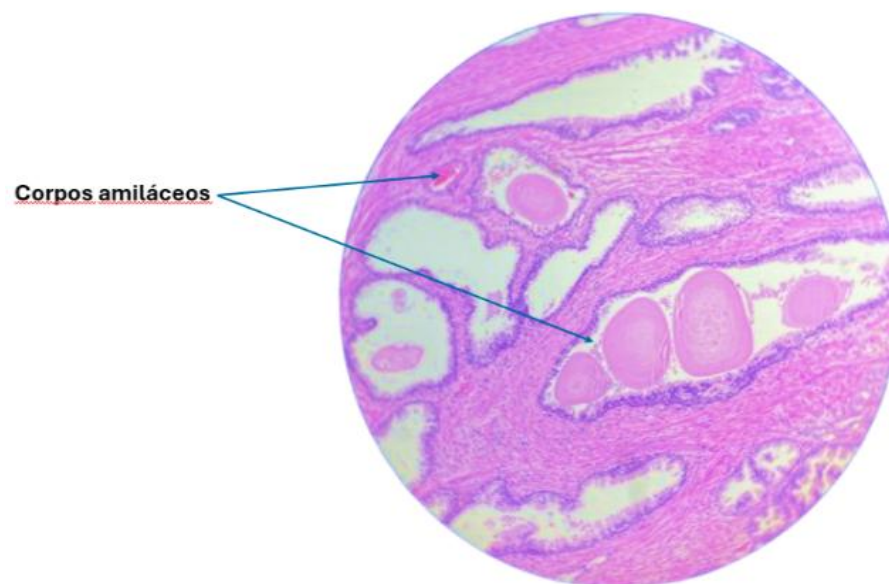
Condição comum em homens mais velhos, caracterizada pelo aumento benigno do volume da próstata, principalmente na zona de transição. Provoca sintomas do trato urinário inferior, como jato urinário fraco, hesitação e aumento da frequência urinária (Cannarella *et al.*, 2021).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna incluem a idade avançada, as alterações hormonais de natureza androgénica, o histórico familiar (com maior risco em indivíduos com parentes de primeiro grau com HBP) e a obesidade. Do ponto de vista histopatológico, a doença caracteriza-se pela proliferação de glândulas benignas com morfologia preservada, frequentemente acompanhada da presença de corpos amiláceos e do aumento do estroma muscular, sem evidência de invasão tecidual.

A imagem (fig. 2) mostra uma secção histológica de tecido prostático corado por Hematoxilina-Eosina (HE). Destaca-se a presença de corpos amiláceos, estruturas eosinofílicas arredondadas ou

ovais, localizadas no lúmen das glândulas prostáticas. Estas formações resultam da deposição concêntrica de glicoproteínas e material secretório, frequentemente associadas à estase glandular.

Do ponto de vista clínico e histopatológico, os corpos amiláceos são achados benignos e comuns em próstatas de indivíduos adultos e idosos, podendo estar associados à hiperplasia prostática benigna (HPB). Apesar de não representarem malignidade, a sua presença é considerada um marcador de alterações funcionais e morfológicas das glândulas.



*Figura 2 - Presença de corpos amiláceos em tecido prostático, observados em coloração de Hematoxilina-Eosina (HE). A imagem foi obtida no âmbito do Projeto INCUBATOR, destinado ao fortalecimento da investigação em histopatologia e cancro da próstata em Cabo Verde*

#### **1.4.2 Prostatite**

A prostatite corresponde a um quadro de inflamação da próstata, que pode ser de origem bacteriana (aguda ou crónica) ou não bacteriana, sendo esta última frequentemente designada como síndrome da dor pélvica crónica (Motrich *et al.*, 2018; Yebes *et al.*, 2023).

##### **Fatores de risco:**

- Infecções do trato urinário (ITU): Especialmente em homens mais jovens, as ITUs podem predispor ao desenvolvimento de prostatite bacteriana aguda ou crónica.

- Síndromes ou traumatismos pélvicos: Lesões na região pélvica, podem aumentar o risco de inflamação prostática.
- Diminuição das defesas imunológicas: Doenças ou estados que comprometam a imunidade podem predispor a infecções.

### 1.4.3 Cancro da Próstata (CP)

O tumor maligno mais frequente em homens idosos é uma das principais causas de mortalidade por cancro a nível mundial. A maioria dos tumores desenvolve na zona periférica da próstata e durante algum período permanece assintomático. O CP está associado a alterações moleculares, incluindo a desregulação de genes (Cannarella *et al.*, 2021). Na imagem (fig. 3) mostra alguns dos diferentes padrões morfológicos do CP.

**Fatores de risco:** Idade avançada: o principal fator de risco;

- Histórico familiar: homens com familiares de primeiro grau diagnosticados com CP tem maior risco de desenvolver a doença;
- Raça e etnia (maior incidência em homens africanos ou afrodescendentes)
- Fatores genéticos e moleculares: Alterações genéticas e desregulação de genes supressores tumorais estão associados ao desenvolvimento e progressão da doença.
- Dieta e estilo de vida: Dietas ricas em gorduras saturadas, carnes vermelhas e produtos lácteos, o consumo de álcool e tabaco, podem estar associados a um aumento do risco.

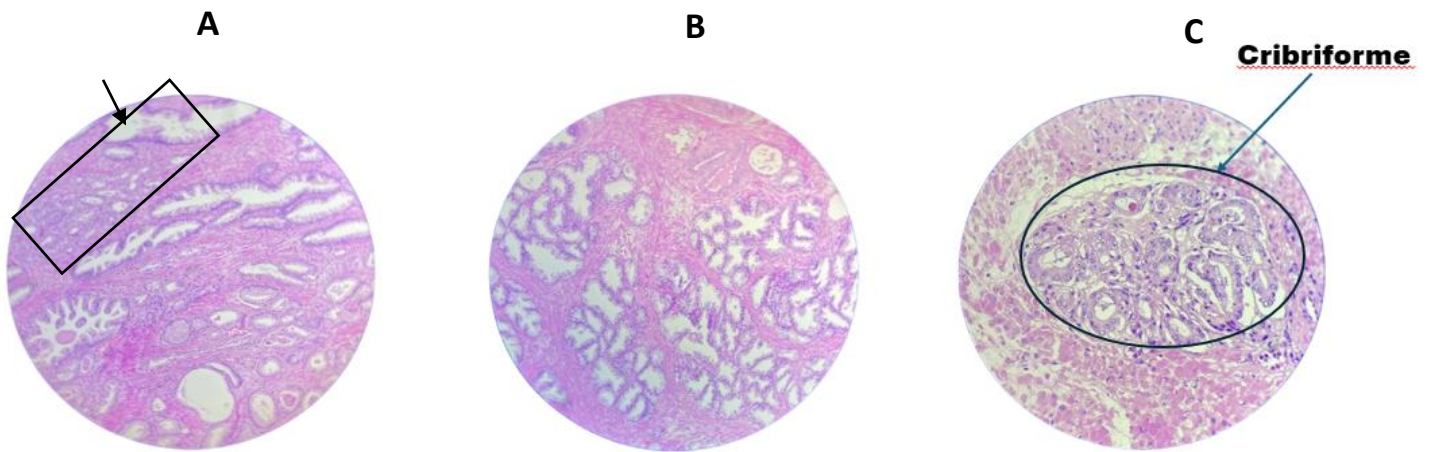


Figura 3 - Imagens histológicas da próstata coradas em Hematoxilina & Eosina (H&E), com diferentes padrões morfológicos:

(A) Glândulas prostáticas benignas bem organizadas, com células epiteliais e lúmen preservados (seta e retângulo).

(B) Adenocarcinoma da próstata, padrão glandular irregular, com fusão de glândulas.

(C) Adenocarcinoma prostático com padrão cribriforme, caracterizado por estruturas glandulares fusionadas formando espaços luminais perfurados (oval).

## 1.5 Diagnóstico e monitoração de CP

O diagnóstico precoce do CP é importante para melhorar o prognóstico, e os principais métodos de diagnósticos incluem: o toque retal, a dosagem do PSA, a biópsia prostática transversal e os exames de imagem (Gravestock *et al.*, 2023).

## 1.6 Mecanismos moleculares o Cancro da Próstata

O CP é caracterizado por uma série de alterações moleculares que contribuem para a sua origem, progressão e resistência ao tratamento, é fundamental conhecer estes mecanismos moleculares que envolvem a alterações genéticas, epigenéticas e transcriptômicas que afetam a regulação normal do crescimento celular, transformando os em células malignas, com propriedades de proliferação descontrolada, escapar aos mecanismos de apoptose, acumular

instabilidade genómica e, em fases mais avançadas, invadir tecidos adjacentes e metastizar. Estes fenómenos resultam da atuação integrada de múltiplos mecanismos moleculares, que não ocorrem de forma isolada, mas sim de modo interdependente ao longo da evolução da doença.(Conteduca *et al.*, 2021).

### **1.6.1 Alterações Genéticas no Cancro da Próstata**

No CP verificam-se várias alterações genéticas que sustentam a sua oncogénese, progressão e resistência terapêutica. Uma das anomalias mais recorrentes é a fusão génica TMPRSS2-ERG, observada em cerca de 50% dos adenocarcinomas prostáticos. Esta fusão resulta da colocação do gene ETS-related gene (ERG), pertencente à família Erythroblast Transformation Specific (ETS), sob controlo do promotor andrógino-dependente TMPRSS2, conduzindo à sua sobre-expressão aberrante. A ativação excessiva de ERG promove alterações profundas na transcrição celular, prejudica a diferenciação epitelial normal e favorece um estado de plasticidade tumoral associado a invasão e transformação maligna (Blee *et al.*, 2018).

Outro evento molecular de grande relevância é a perda ou mutação do gene PTEN, um supressor tumoral que regula negativamente a via PI3K/AKT. O PTEN, uma fosfatase de dupla especificidade, converte fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato em fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato fazendo com que o PTEN funcione como um antagonista direto da atividade da PI3K classe I (He *et al.*, 2022). A sua inativação leva à ativação permanente da via PI3K/AKT, resultando em aumento de proliferação, sobrevivência celular e resistência à apoptose. Estas alterações são frequentes em tumores avançados, contribuindo para o desenvolvimento de doença metastática (Hashemi *et al.*, 2023).

A mutação e perda de função de TP53, outro gene supressor crítico, comprometem a resposta ao dano no DNA e a regulação do ciclo celular, favorecendo a acumulação de mutações secundárias. A inativação deste gene associa-se frequentemente à transição para cancro da próstata resistente à castração (CRPC), refletindo um estágio de maior instabilidade genómica e mau prognóstico (Ionescu (Mitu) *et al.*, 2025).

A diminuição da expressão de NKX3.1 tem consequências biológicas significativas, pois este gene regula negativamente a atividade de vários proto-oncogenes, incluindo ERG e c-Myc, dois

importantes promotores da carcinogénese prostática. Quando NKX3.1 é perdido ou reduzido, ocorre desinibição destas vias oncogénicas, potenciando a proliferação celular, instabilidade genómica e promoção de um microambiente favorável à progressão tumoral. Estudos demonstram que a diminuição de NKX3.1 está associada à ativação de programas transcricionais que facilitam a transformação neoplásica, tornando o epitélio mais suscetível a lesões pré-malignas (Sun *et al.*, 2014).

Em conjunto, a perda de NKX3.1, a ativação aberrante de ERG através da fusão TMPRSS2-ERG e a inativação de TP53 contribuem para a reprogramação molecular que caracteriza as fases mais avançadas da doença.

É importante salientar que estas alterações genéticas não ocorrem de forma isolada. Pelo contrário, tendem a coexistir e interagir funcionalmente, reforçando fenótipos oncogénicos sinérgicos.

### **1.6.2 Vias de sinalização no Cancro da Próstata**

A biologia molecular do CP é amplamente determinada pela desregulação de múltiplas vias de sinalização intracelulares que controlam a proliferação, sobrevivência, plasticidade fenotípica e evolução para resistência terapêutica (Aurilio *et al.*, 2020).

A via do recetor de androgénios (AR) constitui um mecanismo central em todas as fases do CP, uma vez que a maioria dos tumores iniciais depende fortemente da estimulação androgénica para manter a proliferação e a sobrevivência celular. Após a ligação de androgénios, como a DHT, o AR sofre ativação citoplasmática, dimeriza e transloca para o núcleo, onde se liga a elementos de resposta a androgénios e regula a transcrição de genes envolvidos na diferenciação epitelial, no crescimento tumoral e na evasão da apoptose. Contudo, mesmo após terapêutica de privação androgénica, muitas células tumorais mantêm a sinalização androgénica através de mecanismos como amplificação génica do gene AR, mutações ativadoras ou expressão de variantes splicing, nomeadamente AR-V7, que permanece ativa mesmo na ausência de androgénios e confere resistência aos anti-androgénios de nova geração (Aurilio *et al.*, 2020; Jian *et al.*, 2024).

A via PI3K/AKT desempenha um papel central na sobrevivência, crescimento e progressão do cancro da próstata, constituindo uma das rotas de sinalização mais frequentemente desreguladas

na doença. A ativação desta via inicia-se através da fosforilação de lípidos de membrana pela fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), que, por sua vez, recruta e ativa a serina/treonina-quinase AKT, um regulador-chave de processos celulares como proliferação, metabolismo, migração e inibição da apoptose (Hashemi *et al.*, 2023).

A via WNT/ $\beta$ -catenina é uma das redes de sinalização mais conservadas e essenciais para o desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual e regulação do crescimento celular. No cancro da próstata, esta via encontra-se frequentemente desregulada, contribuindo para a proliferação tumoral, progressão e aquisição de fenótipos agressivos. No estado fisiológico, a via canónica WNT é mantida inativa por um complexo de destruição constituído por APC, AXIN, CK1 e GSK3 $\beta$ , que fosforila a  $\beta$ -catenina, conduzindo à sua degradação proteassomal. A ativação da via ocorre quando ligando WNT se ligam aos recetores Frizzled e co-recetores LRP5/6 (Zhan *et al.*, 2017).

### **1.6.3 Epigenética no Cancro da próstata**

A epigenética diz respeito a mudanças hereditárias na expressão génica que não envolvem alterações na sequência de DNA. Estas modificações controlam a acessibilidade da cromatina e influenciam se determinados genes são ativados ou silenciados ao longo da vida celular (He *et al.*, 2022).

Neste contexto, destacam-se quatro tipos principais de modificações epigenéticas: metilação, acetilação, ubiquitinação e fosforilação, todas elas amplamente desreguladas no CP.

A metilação pode ocorrer tanto no DNA, geralmente associada ao silenciamento de genes supressores tumorais, como nas histonas, onde diferentes padrões de metilação determinam estados ativos ou repressivos de transcrição (He *et al.*, 2022).

A acetilação das histonas, por sua vez, regula a estrutura da cromatina e quando desregulada, altera programas génicos essenciais à sobrevivência tumoral. A ubiquitinação das histonas funciona como uma marca reguladora que modula a compactação da cromatina e influencia processos de reparação do DNA, contribuindo para a instabilidade genómica observada nos tumores mais agressivos (He *et al.*, 2022).

Já a fosforilação das histonas, uma modificação altamente dinâmica, participa na resposta ao dano genómico e na ativação rápida de genes, facilitando a adaptação das células tumorais ao stress induzido pela terapêutica (He *et al.*, 2022).

Além das alterações acima referido, a regulação epigenética no CP inclui também mecanismos mediados por RNAs não codificantes, entre os quais se destacam microRNAs (miRNAs) e os longos RNAs não codificantes (lncRNAs).

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA que atuam predominantemente ao nível pós-transcricional, promovendo a degradação de mRNAs ou inibindo a sua tradução. No cancro da próstata, vários miRNAs encontram-se desregulados, quando sobre-expressos podem silenciar genes supressores de tumor ou ativar vias proliferativas, e quando diminuídos podem levar à perda de regulação de genes de controlo do ciclo celular (Hu *et al.*, 2021).

Os lncRNAs, são moléculas mais longas que regulam a expressão génica em múltiplos níveis, incluindo remodelação da cromatina, regulação transcricional e sequestro de miRNAs. Muitos lncRNAs associados ao cancro da próstata como PCA3, encontram-se envolvidos na promoção da proliferação, invasão e resistência à privação androgénica. Além disso, alguns lncRNAs atuam como “guias” de complexos epigenéticos para regiões específicas do genoma (Mirzaei *et al.*, 2022).

#### **1.6.4 Resistência à castração no Cancro da Próstata**

A progressão do cancro da próstata para um estado resistente à castração (CRPC) representa uma fase avançada e clinicamente desafiante da doença, caracterizada pela capacidade do tumor de continuar a proliferar apesar da supressão androgénica (Jian *et al.*, 2024).

Um dos mecanismos mais relevantes é a expressão de variantes do AR independentes do ligando, sendo a AR-V7 a mais estudada e clinicamente significativa. Esta variante resulta de splicing alternativo do gene AR e carece do domínio de ligação ao ligando, permanecendo constitutivamente ativa no núcleo, onde promove a transcrição de genes pró-proliferativos mesmo em ausência total de androgénios. A presença de AR-V7 está associada a fraca resposta a terapias anti-androgénicas de nova geração, e constitui um marcador de resistência adquirida (Jian *et al.*, 2024).

Um subconjunto de tumores adquire características do carcinoma neuroendócrino da próstata, um fenótipo agressivo que surge por transdiferenciação neuroendócrina. Este processo envolve a perda da dependência do AR e a ativação de programas transcricionais alternativos, incluindo SOX2, ASCL1 e BRN2, que promovem plasticidade celular, evasão terapêutica e rápida progressão (Jian *et al.*, 2024).

## **1.7 Biomarcadores do Cancro da Próstata**

Os biomarcadores podem ser proteínas, metabolitos, RNA, DNA, ou até alterações epigenéticas de DNA, detetados através de amostras de pacientes, obtidos de forma invasiva ou não invasiva (Endzeliņš *et al.*, 2016).

Os biomarcadores do cancro da próstata constituem ferramentas essenciais para melhorar o diagnóstico, o prognóstico e a seleção terapêutica, ultrapassando as limitações do antigénio específico da próstata (PSA) tradicional, cuja baixa especificidade conduz frequentemente ao sobrediagnóstico. Entre os marcadores diagnósticos mais relevantes incluem-se o Prostate Health Index (PHI), o PCA3 que é um lncRNA urinário altamente específico, e a fusão TMPRSS2-ERG, amplamente associada ao carcinoma prostático (AM *et al.*, 2024). Estes biomarcadores, demonstram maior precisão na identificação de tumores clinicamente significativos, permitindo reduzir biópsias desnecessárias e melhorar a estratificação inicial da doença.

### **1.7.1 Expressão génica dos genes relevantes no Cancro da Próstata**

Os biomarcadores moleculares desempenham um papel central na compreensão da biologia tumoral do cancro da próstata, permitindo melhorar a precisão diagnóstica, otimizar o prognóstico e orientar estratégias terapêuticas personalizadas. Entre estes, os biomarcadores baseados em expressão génica têm ganho particular destaque, uma vez que refletem diretamente alterações funcionais nos processos celulares que impulsionam a transformação maligna. Estudos recentes demonstram que a caracterização transcriptómicas de tumores prostáticos é fundamental para distinguir fenótipos clínicos, identificar subtipos moleculares clinicamente relevantes e reconhecer vias de sinalização que condicionam a progressão da doença e a resposta ao tratamento (Huang *et al.*, 2025).

Genes amplamente reconhecidos como clinicamente significativos no cancro da próstata ilustram a diversidade funcional destes biomarcadores. O PSMA (Prostate-Specific Membrane Antigen) apresenta expressão aumentada em células tumorais e constitui atualmente um dos alvos mais explorados em imagiologia e terapias dirigidas. O gene NKX3.1, por sua vez, é um supressor tumoral cuja diminuição constitui um dos eventos moleculares precoces da carcinogénese prostática, associado a instabilidade genómica e perda da diferenciação epitelial. Alterações nos genes de reparação do DNA BRCA1 e BRCA2 estão ligadas a tumores mais agressivos, resistência a terapias hormonais, reforçando o seu valor como biomarcadores preditivos e de estratificação terapêutica (Gerhauser *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2025).

Os genes PCAT19, SPON2 e GADD45G foram selecionados para estudo neste relatório devido ao seu envolvimento comprovado em processos biológicos fundamentais na progressão tumoral. Estes genes ilustram de forma representativa como a expressão génica pode ser utilizada para compreender a heterogeneidade tumoral. O PCAT19 tem sido associado à regulação de fatores de transcrição ligados à proliferação celular, o GADD45G desempenha um papel importante na resposta ao stress celular e na indução da apoptose. O foco do presente estudo é o gene SPON2 (Spondin-2), cuja sua expressão tem sido identificada em múltiplos estudos como um marcador potencial de progressão do cancro da próstata.

#### 1.7.1.1 Gene Prostate Cancer Associated Transcript 19 (PCAT19)

PCAT19 é um RNA longo não codificante (lncRNA) específico da próstata, fortemente regulado pela sinalização androgénica e está associado ao desenvolvimento e progressão do cancro da próstata (Hu *et al.*, 2024; Hua *et al.*, 2018)..

Durante a carcinogénese do CP, observa-se frequentemente uma desregulação da expressão de PCAT19, particularmente em tumores de maior agressividade. A diminuição da sua expressão tem sido associada à perda de controlo transcricional mediado pelo recetor de androgénios (AR), refletindo alterações profundas na arquitetura regulatória do genoma prostático. Esta subexpressão contribui para a instabilidade transcricional e favorece a ativação de programas oncogénicos alternativos, promovendo a progressão tumoral (Bhan *et al.*, 2017).

PCAT19 atua como um regulador epigenético, interagindo com complexos de remodelação da cromatina e modulando a acessibilidade de regiões regulatórias críticas. A sua desregulação compromete a organização epigenética do genoma, contribuindo para a plasticidade fenotípica e para a adaptação das células tumorais a contextos de privação androgénica, desempenhando assim um papel relevante na evolução para resistência à castração (Paleati & Munirathinam, 2023).

É considerado um biomarcador promissor para diagnóstico e prognóstico do cancro da próstata devido à sua expressão diferencial entre tecidos normais e tumorais (Hu *et al.*, 2024).

#### 1.7.1.2 Gene Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Gamma (GADD45G)

O GADD45G atua como um gene supressor de tumor, sendo frequentemente inativado em diversos tipos de câncer, incluindo o de próstata. Em condições normais, este gene é ativado em resposta a stress genotóxico, promovendo a paragem do ciclo celular e facilitando a reparação do DNA ou a eliminação de células irreversivelmente danificadas. A perda da sua função compromete a capacidade de as células prostáticas responderem eficazmente ao dano genómico, favorecendo a acumulação de mutações e a instabilidade genómica. No entanto, no CP, os estudos demonstram uma expressão heterogénea, nem sempre havendo diferenças significativas entre tecido normal e tumoral (C. Wang *et al.*, 2024).

#### 1.7.1.3 Gene SPON2

O gene SPON2 (Spondin 2), também conhecido como *Mindin*, localiza-se no cromossoma 4q22.1 e codifica uma proteína da matriz extracelular, pertencente à família dos domínios de adesão F-spondin. Este gene desempenha um papel relevante na adesão celular, migração, angiogénese e na resposta imunitária inata, atuando como uma ponte entre a célula e a matriz extracelular (Wu *et al.*, 2023).

No cancro da próstata, SPON2 apresenta um padrão de expressão alterado desde fases precoces da doença, a sua sobreexpressão tem sido associada a pior prognóstico, maior risco de metastização e potencial utilidade como marcador sérico. A sua presença contribui para a manutenção da integridade tecidular e ativação de vias de sinalização envolvidas no controlo da inflamação e migração celular (Wu *et al.*, 2023).

## CAPÍTULO II – OBJETIVOS

---

## 2.1 Objetivo do estudo

Este estudo centra-se na análise das alterações génicas associadas ao cancro da próstata, integrando abordagens experimentais e bioinformáticas. Neste contexto, foram realizadas a extração de DNA e RNA a partir de amostras biológicas, bem como a avaliação qualitativa da integridade dos ácidos nucleicos por eletroforese em gel. Paralelamente, foram conduzidas análises *in silico* com recurso a bases de dados públicas, para identificar e analisar genes com expressão diferencial no contexto tumoral.

## 2.2 Objetivo específico

- Realizar a extração de DNA genómico a partir de tecido prostático humano e a extração de RNA total a partir de sangue periférico, como base para a análise molecular.
- Avaliar qualitativamente a integridade dos ácidos nucleicos extraídos, recorrendo à eletroforese em gel de agarose.
- Analisar, por via bioinformática, a expressão diferencial dos genes PCAT19, GADD45G e SPON2 entre tecido prostático normal e tumoral.
- Avaliar a variação da expressão génica dos genes selecionados em função dos estádios clínicos do cancro da próstata, quando aplicável.
- Explorar relações de correlação entre a expressão dos genes analisados, com vista à identificação de associações moleculares relevantes.
- Interpretar os resultados obtidos à luz da evidência científica atual

## CAPÍTULO III – METODOLOGIAS

---

### **3.1 Desenho Metodológico**

O presente estudo foi estruturado em duas componentes metodológicas complementares: a Análise experimental e a análise bioinformática da expressão génica diferencial no cancro da próstata, integrando resultados laboratoriais e computacionais

### **3.2 Análise experimental**

#### **3.2.1 Tipo e origem das amostras**

A componente experimental foi realizada com uma amostra de tecido prostático tumoral, proveniente de indivíduo do sexo masculino com diagnóstico confirmado de cancro da próstata, destinada à extração de DNA genómico e conservado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  e uma amostra de sangue periférico, utilizada para a extração de RNA total, conservado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

As amostras foram recolhidas em hospital Dr. Agostinho Neto, segundo os procedimentos clínicos institucionais aplicáveis.

#### **3.2.2 Critérios de inclusão**

Indivíduo do sexo masculino com diagnóstico confirmado de cancro da próstata; E existência de consentimento informado para utilização das amostras.

#### **3.2.3 Tamanho amostral**

A componente experimental baseou-se numa amostra-teste ( $n = 1$ ), adequada ao carácter piloto do estudo e ao objetivo de validação do fluxo técnico e avaliação qualitativa dos ácidos nucleicos.

#### **3.2.4 Considerações éticas**

O estudo respeitou os princípios éticos aplicáveis à investigação com material biológico humano. Foi obtido consentimento informado para a utilização das amostras, assegurando-se a codificação e confidencialidade dos dados

### **3.3 Análise Bioinformática**

#### **3.3.1 Bases de dados**

A análise *in silico* baseou-se em dados transcriptômicos provenientes de bases públicas integradas na plataforma TNMplot.

#### **3.3.2 Seleção dos genes**

Foram selecionados os genes PCAT19, GADD45G e SPON2, com base na sua relevância biológica, evidência prévia na literatura e potencial associação aos mecanismos moleculares do cancro da próstata.

#### **3.3.3 Ferramenta de análise**

A plataforma TNMplot foi utilizada para comparar a expressão génica entre tecido normal, tumoral, avaliar a expressão em função dos estádios clínicos e explorar correlações entre os genes selecionados.

Os dados disponibilizados pela plataforma encontram-se previamente normalizados, garantindo a comparabilidade entre amostras.

#### **3.3.4 Métricas utilizadas**

Foram utilizadas as seguintes métricas: a Mediana para a distribuição dos valores de expressão, o Fold change para avaliação da expressão diferencial e o valor de p para significância estatística.

#### **3.3.5 Análise Estatística e Representação Gráfica**

A análise estatística foi realizada através das ferramentas integradas na plataforma TNMplot, que aplica automaticamente testes estatísticos adequados ao tipo de comparação efetuada:

- Teste de Mann–Whitney U para comparações entre dois grupos (tecido normal vs tumoral);
- Teste de Kruskal–Wallis para comparações entre múltiplos grupos (ex.: estádios clínicos);
- Coeficientes de correlação de Pearson e Spearman para avaliação de associações entre a expressão génica dos genes analisados.

Os resultados foram representados graficamente sob a forma de boxplots, evidenciando a mediana, os quartis e os valores extremos, bem como gráficos de dispersão para análise de correlação.

### **3.4 Procedimentos Laboratoriais:**

#### **3.4.1 Extração de DNA na amostra de tecido**

A extração de DNA genômico a partir de amostras de tecido prostático foi realizada seguindo o protocolo GF – “*1 tissue DNA extraction da vivantis*”, conforme indicado pelo fabricante. O procedimento seguiu as seguintes etapas:

##### **Materiais:**

- Luvas
- Micropipetas e pontas com filtro
- Pinça estéril
- Lâmina estéril e bisturi
- Tubos de microcentrífuga (1,5 ml)
- Balança analítica
- Triturador manual
- Coluna de extração da membrana
- Vórtex
- Centrifuga
- Incubadora
- Cronometro
- Suportes com gelo para amostra
- Racks para microtubos

##### **Reagentes:**

- Tampão lise inicial (Buffer TL)
- Proteinase K
- Solução tampão de extração (Buffer TB)
- Lysis Enhancer (lise)
- Álcool absoluto
- Tampão de lavagem (Wash Buffer)
- Água ultrapura (Elution Buffer)
- O RNase A por ser opcional não foi utilizado

## Procedimentos:

### 1. Recolha e conservação da amostra de tecido

Para a realização dos procedimentos laboratoriais previstos no projeto principal (INCUBATOR), foi realizada a recolha de amostras biológicas no Hospital Dr. Agostinho Neto, com o devido cumprimento dos princípios éticos da investigação.

O Projeto foi apresentado ao paciente e obteve o consentimento informado por escrito, foi aplicado um questionário clínico.

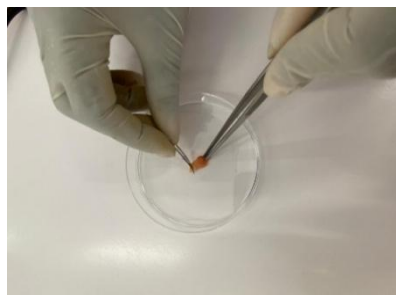
Foi recolhida a amostra do tecido com a identificação do paciente “220” sob a supervisão médica e após o mapeamento do tecido, foi conservada em  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2. Preparação do tecido

2.1. Foi pesada 100 mg de amostra de tecido.

2.2. A amostra de tecido foi cortada em pequenos fragmentos com a ajuda de um bisturi e uma pinça, como mostra a imagem (Figura 4).

2.3. O tecido foi triturado manualmente para obter fragmentos mais pequenos.



*Figura 4 - corte de tecido prostático*

### 3. Lise do tecido

3.1. Com o tecido já num microtubo, é adicionada:

- 250  $\mu\text{L}$  de Buffer TL
- 20  $\mu\text{L}$  de Proteinase K
- 12  $\mu\text{L}$  de Lysis Enhancer

3.2. A mistura foi homogeneizada por vortex pulsado e incubada a 65 °C durante 1 a 3 horas, promovendo a lise das células e liberação do DNA.

#### 4. Remoção de RNA

4.1. Como a remoção de RNA era opcional, não foi realizado este passo.

#### 5. Homogeneização

5.1. A seguir, foram adicionados 2 volumes de Buffer TB à mistura e homogeneizados completamente.

5.2. A solução foi incubada a 65 °C durante 10 minutos.

#### 6. Precipitação e Purificação

6.1. Foi adicionado 200 µL de etanol absoluto à mistura, agitando imediatamente.

- A solução foi transferida para uma coluna de purificação.
- Centrifugou-se a  $5.000 \times g$  durante 1 minuto.
- Sobrenadante foi descartado.
- Procedeu-se à lavagem da coluna com 650 µL de Wash Buffer, seguida de centrifugação a  $5.000 \times g$  por 1 minuto.

#### 7. Eluição do DNA



*Figura 5 - Amostra pipetado e transferida para um novo tubo*

A coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrifugação (Figura 5). Foram adicionados 200 µL de Elution Buffer pré-aquecido ou água, deixando repousar durante 2 minutos. A seguir, centrifugou-se a  $5.000 \times g$  por 1 minuto para recuperar o DNA eluído.

#### 8. Armazenamento

8.1. O DNA extraído foi armazenado a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para posterior quantificação e análise molecular.

### 3.4.2 Extração de RNA em amostra de sangue

**Recomendações:** O RNA degrada-se muito facilmente devido à presença de RNase. Assim, todos os tubos e soluções usados nos protocolos devem estar livres de RNase. Manter sempre um

ambiente de trabalho limpo ao manusear o RNA e trabalhar no gelo. Trocar de luvas frequentemente.

**Materiais:**

- Micropipetas
- Ponteiras estéreis com filtro
- Tubos de microcentrífuga
- Pipetas pasteur
- Vortex
- Centrífuga
- Suporte com gelo
- Racks
- Suporte para tubos falcon
- Luvas descartável
- Papel descartável

**Reagentes:**

- Amostras de sangue total
- Tampão lise
- PBS estéril
- TRIzol
- Isopropanol
- clorofórmio
- Etanol 75%
- Água ultrapura

**Procedimentos:**

1. Foram utilizados 0,5–1 ml de sangue total, transferido para um tubo cônico de centrifugação.

2. O volume foi ajustado para 15 ml com Tampão de Lise de Glóbulos Vermelhos (1× RBC Lysis Buffer).
3. A amostra foi incubada à temperatura ambiente durante 10 minutos.
4. Centrifugou-se a 600 g por 10 minutos, e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado.
5. O pellet foi ressuspensão em 1 ml de tampão de lise de eritrócitos e transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 ml.
6. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a 2000 g por 5 minutos.
7. O pellet celular foi lavado com 1 ml de PBS estéril, seguido de nova centrifugação nas mesmas condições.
8. Após remoção do sobrenadante, adicionaram-se 0,5–1 ml de solução TRIzol® para lise completa.
9. A amostra foi incubada por 2–3 minutos à temperatura ambiente, seguida da adição de 200 µl de clorofórmio e agitação vigorosa por 15 segundos.
10. Centrifugou-se a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C, e a fase aquosa superior foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, evitando a interface proteica.
11. À fase aquosa, adicionou-se volume igual de isopropanol, seguido de agitação leve. A amostra foi colocada a –20 °C por pelo menos 30 minutos para facilitar a precipitação.



Figura 6 - Formação de pellet branco de RNAi

12. Realizou-se centrifugação a 12.000 g por 20 minutos a 4 °C, formando um pequeno pellet branco de RNA, representada na imagem (Figura 6)
13. O pellet foi lavado com 500 µl de etanol a 75% frio, e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C.
14. O etanol restante foi cuidadosamente eliminado, e o pellet foi

1.5. O RNA foi solubilizado com 10–20 µl de água livre de RNases.

1.6. A quantificação do RNA foi realizada por leitura da absorvância a 260 nm num espectrofotômetro.

1.7. O RNA purificado foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior uso.

### **3.4.3 Validação da extração de DNA através de Eletroforese em gel**

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica muito fundamental na análise de ácidos nucleicos, usada para a separação de fragmentos de DNA baseando-se no seu tamanho, assim como a avaliação da sua integridade e pureza. Após a extração, a aplicação desta técnica possibilita a confirmação da presença de DNA nas amostras, o que é essencial para validar a eficácia do protocolo utilizado. Neste trabalho, para a realização da eletroforese recorreu-se ao procedimento fornecido pelo próprio Bento Lab.

#### **Materiais:**

- Micropipetas
- Ponteiras estéreis descartáveis
- Suporte para gel
- Becker de vidro
- Proveta graduada
- Placa de petri
- Pente e diques para gel
- Cuba de eletroforese
- Transiluminador UV (Bento Lab)
- Luvas descartáveis

#### **Reagentes:**

- Agarose em comprimido
- Tampão TAE 1x
- Loading dye (carga de corante)
- Gelgreen (corante intercalante fluorescente)
- Amostra de DNA previamente extraída
- Água destilada

## Procedimentos:

### 1. Preparação do gel de agarose

- 1.1. Preparou-se a solução de TAE 1x com 45 ml de água destilada e 5 ml da solução TBE Buffer.
- 1.2. Preparou-se uma solução de agarose a 1%, dissolvendo 1 comprimido de agarose em 50 ml de tampão TAE 1x.
- 1.3. A solução foi aquecida no micro-ondas de 20 em 20 segundos até o comprimido de agarose ser completamente dissolvido.
- 1.4. Após o arrefecimento a cerca de 50°C, adicionou-se 5 µL de corante intercalante, o gelGreen.

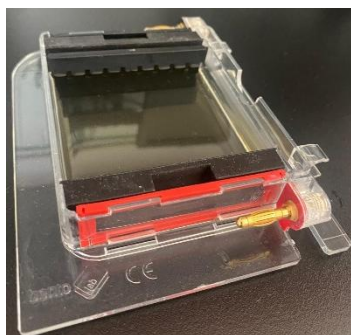


Figura 7 - Solução de agarose no poço

- 1.5. A solução foi vertida numa cuba apropriada com pente (Figura 7) colocado e deixada a solidificar à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos.

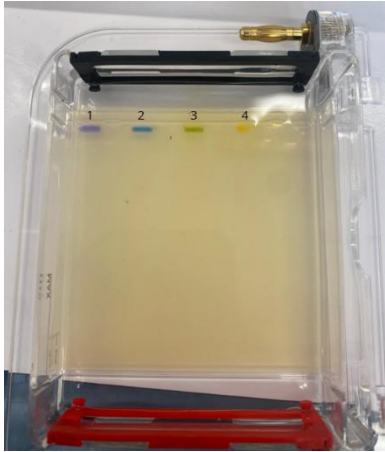
- 1.6. Após o gel solidificar, o pente e os diques são retirados.

### 2. Preparação das amostras:

- 2.1. A amostra de DNA foi previamente extraída e armazenada a -20°C
- 2.2. A cada amostra (DNA e do controlo) foi *adicionado loading dye* (o corante de carga) que facilita a visualização no poço de gel.
- 2.3. Também foi preparado somente o controlo negativo, apenas com o loading dye, sem DNA.

### 3. Montagem da Eletroforese:

3.1. Após solidificação do gel na cuba, com os diques e pente retirados, adiciona o tampão TAE 1x até cobrir totalmente o gel.



3.2. A amostra e os controlos foram cuidadosamente aplicados nos poços de gel com micropipeta (Figura 8).

Figura 8 - aplicação das amostras no gel

3.3. A corrida foi realizada a uma voltagem de 50V durante 40 minutos, até o *loading dye* migrar a uma distância adequada.

### 4. Visualização do DNA

4.1. Após a corrida eletroforética, o gel foi transferido para o transiluminador UV do Bento Lab.

4.2. As bandas foram observadas sob a luz UV.

4.3. Teve presença de bandas fluorescentes nas amostras.

## CAPÍTULO IV - RESULTADOS

---

Nesta secção apresentam-se os resultados obtidos do experimento científico, que incluíram extração de DNA a partir da amostra do tecido da próstata, a avaliação da sua integridade por eletroforese em gel de agarose, a extração de RNA a partir de amostras de sangue total, e a sua avaliação através de espectrofotómetro e a análise bioinformática da expressão génica com enfoque no gene SPON2 associado ao cancro da próstata.

Os procedimentos experimentais foram conduzidos no Laboratório de Histopatologia de Uni-CV, utilizando os recursos disponíveis.

## **4.1 Resultados experimentais**

### **4.1.1 Extração e integridade de DNA**

A extração de DNA genómico foi realizada a partir de amostras de tecido da próstata humana, utilizando o kit comercial Vivantis *GF-1 DNA Extraction*. Este kit baseia-se numa tecnologia de coluna com membrana de sílica que permite a purificação seletiva de DNA genómico por absorção em presença de soluções de alta concentração salina com eliminação eficiente dos contaminantes. O DNA extraído foi conservado a -20°C até à análise da sua integridade.

Não foi realizada a quantificação espectrofotométrica do DNA, a verificação da sua qualidade e integridade baseou-se exclusivamente na análise por eletroforese em gel.

A integridade de DNA genómico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% preparada com tampão TAE 1x e corada com o GelRed para permitir a visualização do DNA sob a luz UV.

A distribuição dos poços foi a seguinte:

- Poço 1 – Está o marcador de peso molecular, o ladder, utilizado para estimar o tamanho dos fragmentos.
- Poço 2 – Está a amostra de DNA extraído do tecido humano.
- Poço 3 – Controlo positivo da amostra de DNA extraído.
- Poço 4 – Controlo negativo só com o corante loading dye.

Com a imagem obtida (figura 9), foi carregado um marcador de peso molecular com fragmentos de DNA de tamanhos conhecidos. Observam-se múltiplas bandas dispostas de forma decrescente, sendo que as de maior tamanho estão mais próximas da origem do gel e as de menos tamanho migrando para a extremidade inferior.



*Figura 9 - Resultado da eletroforese em gel*

No poço 2, uma banda única e intensa de elevada massa molecular, posicionada próxima da origem do gel, compatível com o DNA intacto e não são visíveis sinais de degradação.

No poço 3, apresentou padrão semelhante ao poço 2, confirmando a integridade do procedimento de extração e a corrida eletroforética.

No poço 4, do controlo negativo, no qual não é visível nenhuma banda fluorescente, confirmando a ausência de contaminação e garantindo assim a fiabilidade dos resultados dos poços anteriores.

#### **4.1.2 Extração e quantificação do RNA**

O RNA foi extraído de sangue total, e foi quantificado por leitura espectrofotométrica a 260 nm e 280 nm

A amostra apresentou uma concentração de 8,6 ng/μL, valor muito inferior ao intervalo recomendado para a biologia molecular.

Com os valores reduzidos da concentração de RNA, sugere-se que houve uma perda significativa do material genético durante a extração. Apesar disso, mesmo com uma pequena quantidade de RNA, ainda podem ser utilizadas em reações de amplificação de alta sensibilidade, desde que sejam realizadas etapas para a purificação de RNA. Devido à ausência de medição do rácio A260/A280, não foi possível avaliar a pureza do material genético

## **4.2 Resultados *in silico***

### **4.2.1 Análise bioinformática da expressão génica de PCAT19**

#### **4.2.1.1 Informações gerais do gene PCAT19**

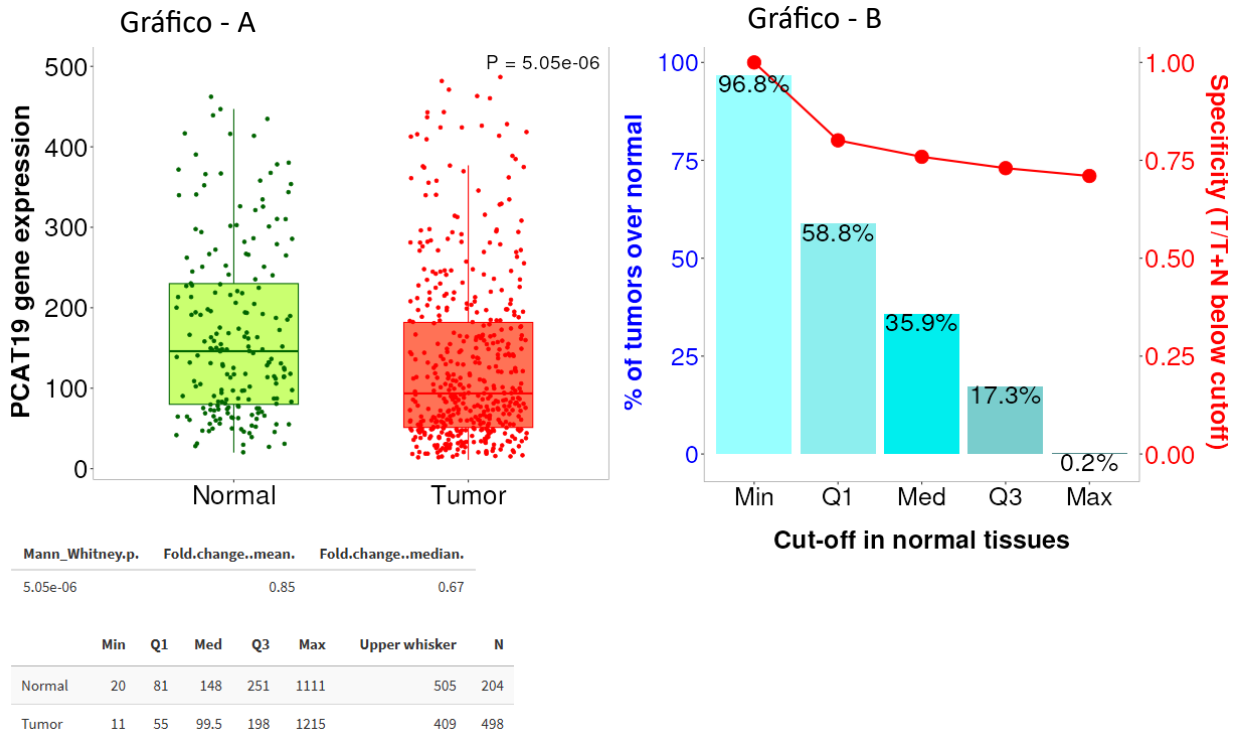
Informações extraídas da plataforma NCBI GEO

- Símbolo oficial: PCAT19
- Nome completo: Prostate cancer-associated transcript 19
- Tipo de gene: RNA não codificante (ncRNA)
- Organismo: Homo sapiens
- Outro nome: LINC01190
- Localização: 19q13.2
- Exões: 4
- Expressão: o gene PCAT19 está sobreexpresso em vários tecidos humanos, como, por exemplo, no tecido adiposo, os níveis de expressão são de 5,8 RPKM, e no pulmão, os níveis são de 5,0 RPKM, e tem expressão adicional em mais 22 outros tecidos.

Embora o PCAT19 é associado ao cancro da próstata, o tecido da próstata não é mencionado neste projeto específico.

#### **4.2.1.2 Análise da expressão génica do gene PCAT19 em TNMplot**

O TNMplot é uma plataforma web avançada projetada para a análise transcriptómicas, facilitando a análise diferencial da expressão génica em tecidos normais e tumorais.



O gráfico (figura 10) gerado pelo TNMplot compara a expressão do gene PCAT19 em tecido prostático, em que o tecido normal está representado em verde e o tecido tumoral em vermelho.

No gráfico de caixa (gráfico B), a expressão do PCAT19 apresentou mediana de 148 no tecido normal e de 99,5 no tecido tumoral. No grupo normal, os valores variaram entre 20 para o mínimo e 1111 para o máximo, com o primeiro quartil (Q1) em 81 e o terceiro quartil (Q3) em 251. No grupo tumoral, os valores variaram entre 11 (mínimo) e 1215 (máximo), com Q1 em 55 e Q3 em 198.

A comparação estatística entre os dois grupos foi realizada através do teste de Mann-Whitney (gráfico A), que revelou uma grande diferença ( $p = 5,05 \times 10^{-6}$ ), evidenciando uma redução do nível da expressão de PCAT19 nos tumores. O “fold change” medio obtido foi de 0,85 e o mediano foi de 0,67, indicando uma redução média de 15% nos níveis de transcrição no tecido tumoral em relação ao normal, e evidencia que pelo menos metade das amostras tumorais apresentam expressão inferior a 67% da mediana dos tecidos normais, ambos os valores são inferiores a 1, confirmando assim subexpressão do gene PCAT19 no contexto tumoral.

Estes resultados mostram o potencial de PCAT19 como marcador diferencial na próstata, e a sua expressão reduzida em tumores mostra que distingue os estados benignos e maligno (Hu *et al.*, 2024).

## **4.2.2 Análise bioinformática da expressão génica de GADD45G**

### **4.2.2.1 Informações gerais do gene GADD45G**

Informações extraídas da plataforma NCBI GEO

- Símbolo oficial: GADD45G
- Nome completo: growth arrest and DNA damage inducible gamma
- Tipo de gene: Codificação de proteínas
- Organismo: Homo sapiens
- Outro nome: CR6; DDIT2; GRP17; GADD45gamma
- Localização: 9q22.2
- Exões: 4
- Expressão: Ampla expressão no fígado (RPKM 21,4), placenta (RPKM 16,8) e 22 outros tecidos.

Este gene faz parte de um grupo de genes cujos níveis de transcrição aumentam após condições estressantes de parada do crescimento e tratamento com agentes que danificam o DNA. A proteína codificada por este gene responde a estresses ambientais mediando a ativação da via p38/JNK via cinase MTK1/MEKK4. O GADD45G é altamente expresso na placenta

### **4.2.2.2 Análise da expressão génica do gene GADD45G em TNMplot**

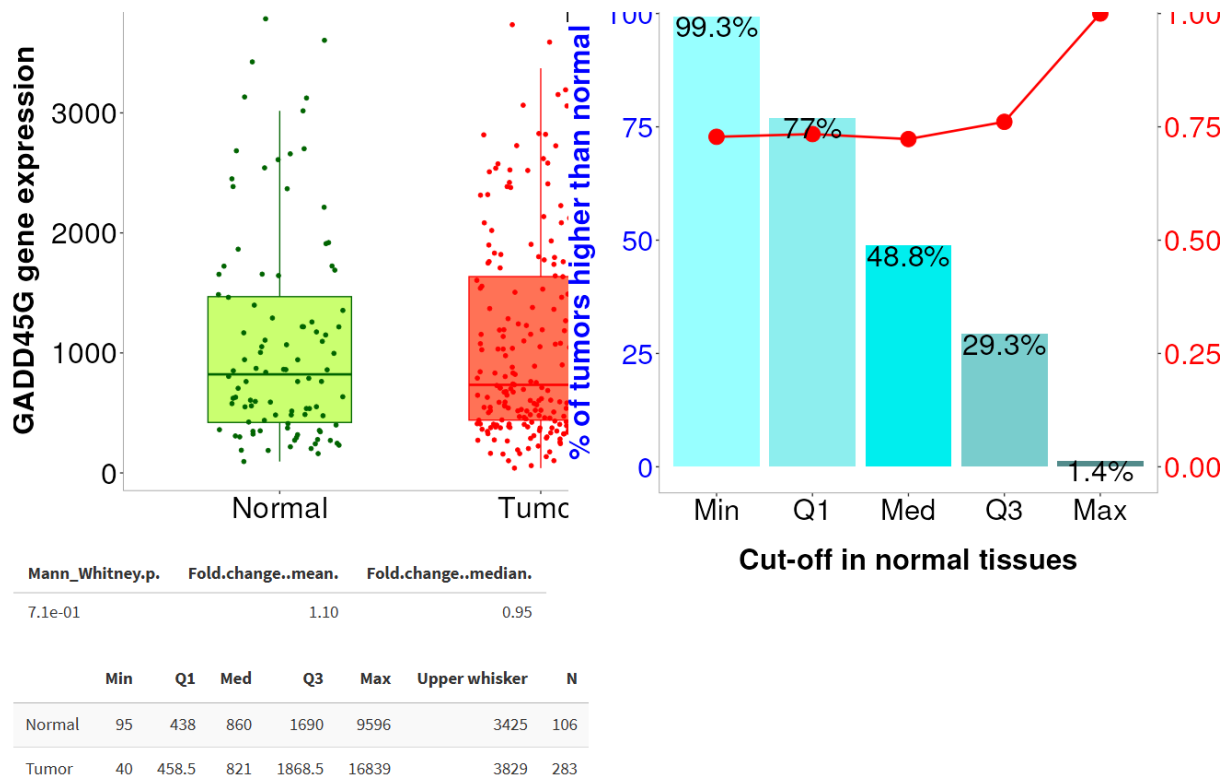


Figura 10 - - Expressão do gene GADD45G no tecido tumoral e normal da próstata (TNMplot, n.d.)

A análise da expressão do gene GADD45G não revelou diferenças significativas entre tecido prostático normal e tumoral (Figura 11). No grupo normal, a mediana de expressão foi de 860, enquanto no grupo tumoral a mediana foi ligeiramente inferior, 821. O teste de Mann–Whitney resultou num valor de  $p = 0,71$ , não atingindo significância estatística. O fold change médio foi de 1,10 e o mediano de 0,95, ambos próximos de 1, indicando ausência de variação expressiva nos níveis de transcrição entre os dois grupos. Estes resultados indicam que o gene GADD45G não apresenta regulação diferencial detetável entre a próstata normal e o tumor da próstata.

## 4.2.3 Análise bioinformática da expressão génica de SPON2

### 4.2.3.1 Informações gerais do gene SPON2

Informações extraídas da plataforma NCBI GEO

- Símbolo oficial: SPON2
- Nome completo: spondin 2

- Tipo de gene: Codificação de proteínas
- Organismo: Homo sapiens
- Outro nome: DIL1, DIL-1, MINDIN, M-SPONDIN
- Localização: 4p16.3
- Exões: 9
- Expressão: Ampla expressão na próstata (RPKM 48,4), endométrio (RPKM 37,2) e 18 outros tecidos

Prevê-se que a proteína apresente atividade de ligação a antígenos, lipopolissacarídeos e íons metálicos, estando potencialmente envolvida em mecanismos de adesão celular. Está associada a processos como resposta imunitária contra organismos patogênicos, regulação positiva da produção de citocinas. Localiza-se em exossomas extracelulares e é descrita como biomarcador de meningioma.

#### 4.2.3.2 Análise da expressão gênica do gene SPON2 em TNMplot

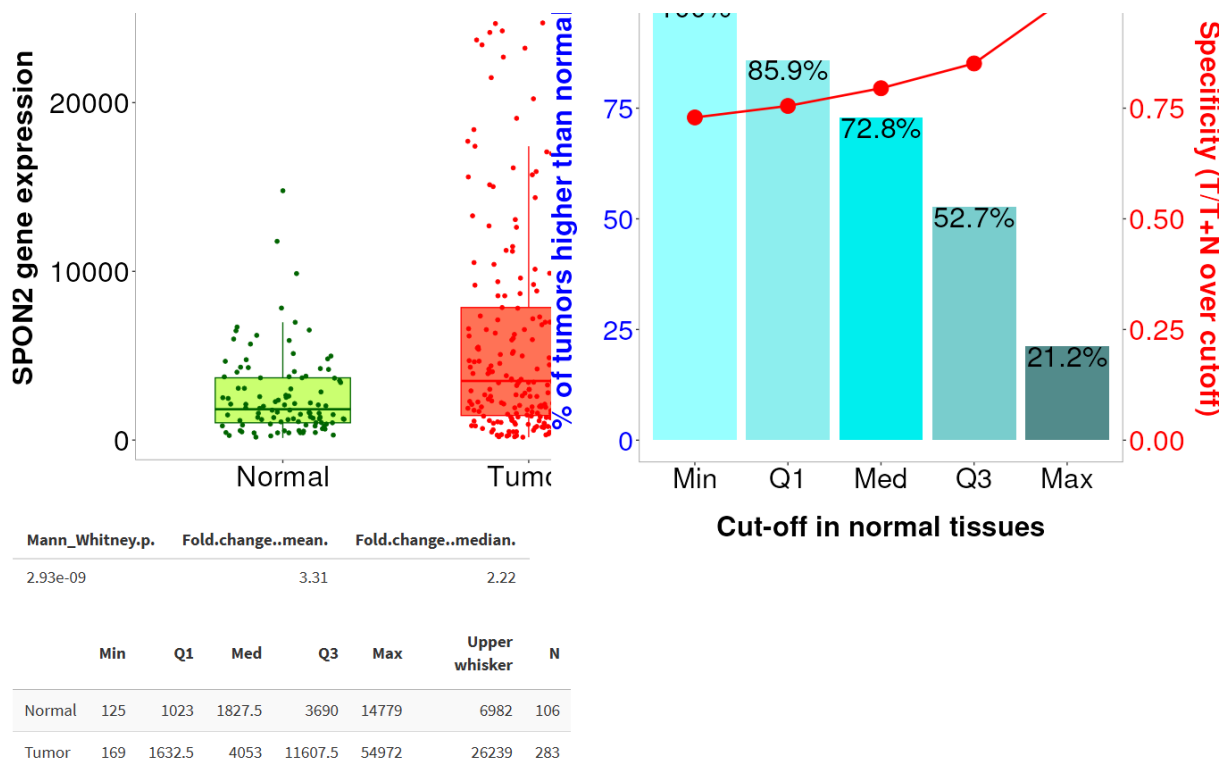
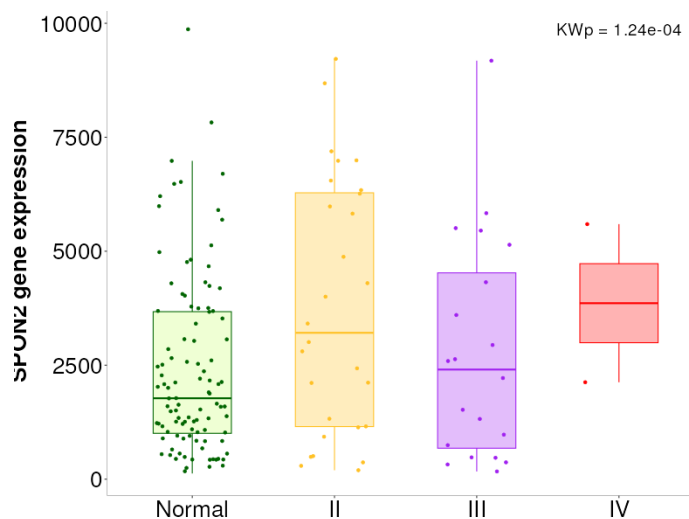


Figura 11 - - Expressão do gene SPON2 no tecido tumoral e normal da próstata (TNMplot, n.d.)

No caso do SPON2 (Figura 12), observou-se uma expressão significativamente superior nos tecidos tumorais em comparação com os tecidos normais. A mediana de expressão no grupo tumoral foi 4053, aproximadamente 2,2 vezes superior à do grupo normal, 1827,5, com um fold change médio de 3,31 ( $>2$ ), evidenciando uma sobre-expressão consistente. O teste de Mann–Whitney revelou um valor extremamente baixo de  $p = 2,93 \times 10^{-9}$ , confirmando a robustez estatística desta diferença. A distribuição dos valores no grupo tumoral apresentou maior dispersão com expressão extremamente elevada. Este perfil de expressão, sugere que SPON2 pode estar associado a processos tumorais ativos, potencialmente relacionados com adesão celular, resposta imunitária e progressão da doença.

#### 4.2.4 Comparação da expressão génica de SPON2 em diferentes estádios do cancro da próstata



A análise de expressão do SPON2 (Figura 13) entre amostras normais e tumorais em diferentes estádios clínicos (II, III e IV) revelou diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis  $p = 1,24 \times 10^{-4}$ ).

O grupo Normal apresentou valores de expressão mais baixos quando comparado com todos os estádios tumorais, confirmando a sobre-expressão tumoral previamente observada. No estágio

II, a mediana de expressão aumentou, enquanto no estágio III houve ligeira redução. O estágio IV apresentou a mediana mais elevada, sugerindo uma possível associação entre expressão muito elevada de SPON2 e doença avançada.

O padrão identificado sugere que SPON2 está significativamente sobreexpresso no cancro da próstata e que a sua expressão tende a ser mais elevada em estádios mais avançados, podendo ter potencial como biomarcador de progressão tumoral.

#### 4.2.5 Expressão diferencial e correlação entre os genes PCAT19, GADD45G, SPON2 no cancro da próstata

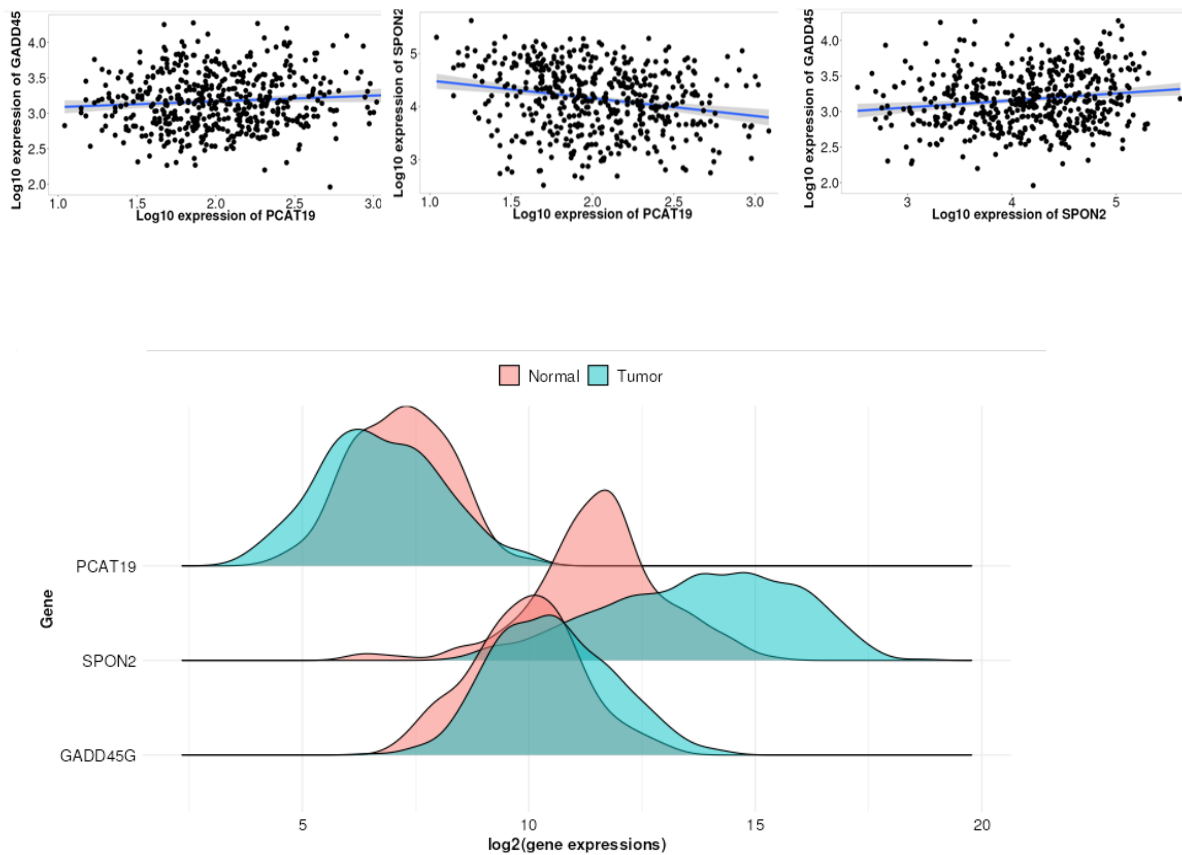


Figura 12 - Perfis de expressão diferencial de PCAT19, SPON2 e GADD45G no cancro da próstata

A avaliação das interações entre estes genes, por correlação de Pearson (Figura 14), demonstrou uma correlação positiva fraca entre SPON2 e GADD45G ( $R = 0,15$ ;  $p < 0,001$ ), sugerindo que a sobreexpressão de SPON2 tende a estar associada a um aumento modesto da expressão de GADD45G. A relação entre PCAT19 e GADD45G foi positiva, muito fraca e não significativa ( $R = 0,06$ ;  $p = 0,18$ ), não evidenciando uma relação relevante entre estes genes. Em contraste, observou-se uma correlação negativa fraca e inversa entre PCAT19 e SPON2 ( $R = -0,16$ ;  $p < 0,001$ ), sugerindo que o aumento da expressão de PCAT19 está associado a menor expressão de SPON2.

A análise da expressão diferencial (Figura 15) dos genes PCAT19, SPON2 e GADD45G entre tecidos normais e tumorais de próstata revelou padrões distintos de regulação. O gene PCAT19 apresentou níveis de expressão mais elevados no tecido normal em comparação com o tumoral, sugerindo uma possível função supressora na progressão da doença. SPON2 mostra um comportamento inverso, com maior expressão nas amostras tumorais, indicativo de sobreexpressão associada à presença de tumor. Já GADD45G mantém um padrão de expressão mais próximo entre os dois grupos, embora com ligeira tendência para redução em tumores.

Com este resultado, sugere-se que o PCAT19 e SPON2 poderão ter funções opostas no Cancro da próstata.

## CAPÍTULO V - DISCUSSÃO /CONCLUSÃO

---

## 5.1 Discussão/Conclusão

Os resultados do presente estudo resultam do desenvolvimento de duas componentes metodológicas distintas, uma de natureza experimental e outra de natureza bioinformática, analisadas de forma independente. A componente experimental centrou-se na utilização do Bento Lab para a extração e avaliação qualitativa da integridade de ácidos nucleicos, permitindo consolidar procedimentos laboratoriais fundamentais em biologia molecular. Por sua vez, a componente bioinformática baseou-se na análise de dados públicos de expressão génica no cancro da próstata, possibilitando a caracterização dos padrões de expressão dos genes PCAT19, GADD45G e SPON2, identificados como candidatos com potencial interesse enquanto biomarcadores moleculares.

Embora o objetivo geral do estudo previsse a integração entre dados experimentais e bioinformáticos, esta integração não foi plenamente alcançada, uma vez que a componente experimental se limitou à extração e avaliação qualitativa da integridade dos ácidos nucleicos, não tendo sido realizadas análises experimentais de expressão génica.

Do ponto de vista experimental, a extração de DNA a partir de tecido prostático tumoral foi bem-sucedida, produzindo DNA de elevada integridade, conforme demonstrado pelo padrão compacto de banda observado na eletroforese. Este resultado é relevante, uma vez que valida a aplicabilidade do Bento Lab em contextos de recursos limitados, permitindo executar procedimentos fundamentais de biologia molecular em ambientes menos equipados. Em contraste, a extração de RNA a partir de sangue periférico resultou em baixa concentração. Ainda assim, este ensaio contribuiu para identificar pontos críticos do protocolo que poderão ser otimizados em trabalhos futuros, nomeadamente ao nível da manipulação, do controlo de RNAses e da etapa de purificação.

A análise *in silico* proporcionou uma perspetiva mais ampla sobre o comportamento dos genes selecionados no contexto do CP. A subexpressão de PCAT19 em tecido tumoral, observada na plataforma TNMplot, é compatível com a hipótese de que variantes genéticas de risco podem modular a atividade promotora e enhancer de PCAT19, contribuindo para fenótipos tumorais mais agressivos (Hua *et al.*, 2018). Para além disso os lncRNAs desempenha um papel regulador na

homeostasia epitelial prostática e que a sua perda contribui para desregulação transcripcional (Jiang *et al.*, 2020; Takayama *et al.*, 2020).

Por sua vez, a sobre-expressão de SPON2 no tecido tumoral, com valores crescentes em estádios mais avançados, aponta para o envolvimento deste gene em processos de progressão tumoral. SPON2 codifica uma proteína da matriz extracelular associada à adesão celular e à modulação da resposta imune. Estudos prévios demonstraram que SPON2 se encontra significativamente sobreexpresso em tecido prostático maligno e em soro de doentes com cancro da próstata, apresentando desempenho diagnóstico superior ao PSA em determinados subgrupos (Lucarelli *et al.*, 2013). Dados mais recentes mostram ainda que SPON2 secretado por células de cancro da próstata aumenta fatores osteogénicos em osteoblastos através da via PI3K/AKT/mTOR, favorecendo um microambiente propício à metastização óssea. A associação observada neste estudo entre expressão mais elevada de SPON2 e estádios clínicos superiores é particularmente sugestiva do seu valor potencial como biomarcador de agressividade ou progressão, destacando-a como marcador associado a doença avançada e fenótipo invasivo (H. Wang *et al.*, 2022).

O gene GADD45G, classicamente associado à resposta ao dano no DNA e à paragem do ciclo celular, não apresentou expressão diferencial significativa entre tecido normal e tumoral nos dados analisados. Este achado sugere que, pelo menos nas coortes integradas no TNMplot, GADD45G poderá não constituir um marcador robusto de distinção entre estados benignos e malignos da próstata. No entanto, a sua relevância biológica não é necessariamente excluída, podendo estar mais relacionada com contextos específicos de stress genotóxico, subtipos tumorais ou alterações epigenéticas como hipermetilação promotora, não captadas pelas médias de expressão global (Shen *et al.*, 2025)

A análise de correlações entre os três genes fornece uma perspetiva adicional sobre as suas possíveis inter-relações funcionais. A correlação negativa fraca entre PCAT19 e SPON2 é coerente com a interpretação de que estes genes participam em eixos biológicos de sentido oposto: PCAT19 como potencial regulador associado a fenótipo menos agressivo e SPON2 como mediador de fenótipos mais invasivos. Embora a magnitude das correlações seja modesta, este padrão reforça a ideia, já salientada em estudos de assinaturas transcriptómicas em cancro da próstata, de que a avaliação combinada de múltiplos genes pode ser mais informativa do que a análise isolada de um único marcador (Vittrant *et al.*, 2020).

Os resultados obtidos apontam para um cenário em que PCAT19 e SPON2 se destacam como candidatos promissores a biomarcadores transcriptômicos no cancro da próstata, com perfis de expressão opostos e potencial utilidade complementar: PCAT19 como marcador de subexpressão associado à perda de diferenciação e SPON2 como marcador de sobre-expressão associado à progressão tumoral. GADD45G, embora não tenha mostrado diferenças expressivas no conjunto de dados analisado, permanece relevante como parte das redes de resposta ao dano no DNA e poderá vir a revelar utilidade em contextos específicos ou em combinação com outros marcadores.

Em conclusão, o presente estudo permitiu caracterizar preliminarmente a expressão dos genes PCAT19, GADD45G e SPON2 no contexto do cancro da próstata, com base em análises *in silico* de dados públicos. Do mesmo modo, foram implementados procedimentos laboratoriais fundamentais de biologia molecular para a extração e avaliação qualitativa de ácidos nucleicos. Embora não tenha sido realizada a integração direta entre dados experimentais e bioinformáticos, o trabalho estabeleceu uma base metodológica consistente que poderá sustentar futuras investigações com validação experimental da expressão génica, contribuindo para o aprofundamento do conhecimento molecular do cancro da próstata.

## **5.2 Limitação do estudo**

Este estudo apresenta um conjunto de limitações que precisam ser reconhecidas para contextualizar adequadamente os resultados obtidos.

Uma das principais limitações do presente trabalho prende-se com a impossibilidade de integrar diretamente os dados experimentais com os resultados bioinformáticos. A ausência de validação experimental da expressão génica impediu a correlação direta entre os dados obtidos *in silico* e resultados laboratoriais, limitando a análise integrada inicialmente proposta.

O número reduzido de amostras biológicas analisadas localmente diminuiu a robustez da componente experimental, limitando a generalização dos resultados de extração e avaliação de integridade de DNA e RNA.

A impossibilidade de dispor de amostra suficiente para biomarcadores específicos constituiu outra restrição relevante, impedindo a realização de técnicas adicionais como a PCR. Assim, não

foi possível validar experimentalmente os níveis de expressão dos genes estudados, sendo esta etapa fundamental para confirmar a expressão diferencial observada *in silico*.

Por fim, o estudo dependeu amplamente de bases de dados públicas, que permitiram a seleção e exploração dos genes de interesse, mas que não substituem uma validação funcional *in vitro*. Embora essas plataformas disponibilizem dados homogêneos e previamente padronizados, a ausência de experimentação complementar dificulta a confirmação direta dos mecanismos biológicos sugeridos pelos padrões de expressão, constituindo-se em um limite importante à extrapolação dos resultados.

Estas limitações reforçam a necessidade de interpretar os resultados bioinformáticos com cautela.

### **5.3 Recomendações**

Com base nos resultados obtidos e nas limitações identificadas ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, apresentam-se as seguintes recomendações com vista à continuidade da investigação:

Recomenda-se a expansão do estudo a uma amostra mais alargada e representativa, incluindo indivíduos com diferentes estádios clínicos e características histopatológicas do cancro da próstata. O aumento do número de amostras permitirá reforçar a robustez estatística das análises e aprofundar a compreensão da heterogeneidade molecular da doença.

Os padrões de expressão diferencial observados para os genes PCAT19, GADD45G e SPON2 deverão ser objeto de validação experimental em amostras clínicas locais, recorrendo a técnicas quantitativas como a PCR em tempo real. Esta etapa é fundamental para confirmar a relevância biológica e clínica dos resultados obtidos *in silico*.

Do ponto de vista metodológico, sugere-se a otimização dos protocolos de extração de RNA, de forma a melhorar o rendimento e a qualidade do material genético obtido, garantindo maior fiabilidade em análises posteriores. A implementação sistemática da avaliação da pureza do RNA

Recomenda-se também a validação completa do termociclador PCR integrado no Bento Lab, permitindo expandir a capacidade analítica do equipamento e possibilitar a realização de análises moleculares mais avançadas em contextos com recursos limitados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AM, S. K., Rajan, P., Alkhamees, M., Holley, M., & Lakshmanan, V.-K. (2024). Prostate cancer theragnostics biomarkers: An update. *Investigative and Clinical Urology*, 65(6), 527. <https://doi.org/10.4111/icu.20240229>
- American Cancer Society. (2023). *About Prostate Cancer*. <https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8793.00.pdf>
- Aurilio, G., Cimadamore, A., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Verri, E., Scarpelli, M., Massari, F., Cheng, L., Santoni, M., & Montironi, R. (2020). Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells*, 9(12), 2653. <https://doi.org/10.3390/cells9122653>
- Bergez-Hernández, F., Irigoyen-Arredondo, M., & Martínez-Camberos, A. (2024). A systematic review of mechanisms of PTEN gene down-regulation mediated by miRNA in prostate cancer. *Heliyon*, 10(15). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34950>
- Bergez-Hernández, F., Luque-Ortega, F., García-Magallanes, N., Alvarez-Arazola, M., & Arámbula-Meraz, E. (2024). Deletion in a regulatory region is associated with underexpression of miR-148b-3p in patients with prostate cancer. *Biomedical Reports*, 20(3). <https://doi.org/10.3892/br.2024.1740>
- Bhan, A., Soleimani, M., & Mandal, S. S. (2017). Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Research*, 77(15), 3965–3981. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634>
- Blee, A. M., He, Y., Yang, Y., Ye, Z., Yan, Y., Pan, Y., Ma, T., Dugdale, J., Kuehn, E., Kohli, M., Jimenez, R., Chen, Y., Xu, W., Wang, L., & Huang, H. (2018). TMPRSS2-ERG Controls Luminal Epithelial Lineage and Antiandrogen Sensitivity in PTEN and TP53-Mutated Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 24(18), 4551–4565. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0653>
- Cannarella, R., Condorelli, R. A., Barbagallo, F., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2021). Endocrinology of the Aging Prostate: Current Concepts. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.554078>
- Chen, J. Y., Wang, P. Y., Liu, M. Z., Lyu, F., Ma, M. W., Ren, X. Y., & Gao, X. S. (2023). Biomarkers for Prostate Cancer: From Diagnosis to Treatment. In *Diagnostics* (Vol. 13, Issue 21). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/diagnostics13213350>
- Conteduca, V., Hess, J., Yamada, Y., Ku, S. Y., & Beltran, H. (2021). Epigenetics in prostate cancer: Clinical implications. In *Translational Andrology and Urology* (Vol. 10, Issue 7, pp. 3104–3116). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/tau-20-1339>

- Davey, R. A., & Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. In *Androgen Receptor Biology Clin Biochem Rev* (Vol. 37, Issue 1).
- Endzeliņš, E., Melne, V., Kalniņa, Z., Lietuvietis, V., Riekstiņa, U., Llorente, A., & Linē, A. (2016). Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: a systematic review. *Molecular Cancer*, *15*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0523-5>
- Ferlay J, E. M. L. F. L. M. C. M. M. L. P. M. Z. A. S. I. B. F. (2024). *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/132-cape-verde-fact-sheet.pdf>
- Filho, A. M., Laversanne, M., Ferlay, J., Colombet, M., Piñeros, M., Znaor, A., Parkin, D. M., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2025). The GLOBOCAN 2022 cancer estimates: Data sources, methods, and a snapshot of the cancer burden worldwide. *International Journal of Cancer*, *156*(7), 1336–1346. <https://doi.org/10.1002/ijc.35278>
- Francis, J. C., & Swain, A. (2018). Prostate organogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *8*(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030353>
- Gerhauser, C., Favero, F., Risch, T., Simon, R., Feuerbach, L., Assenov, Y., Heckmann, D., Sidiropoulos, N., Waszak, S. M., Hübschmann, D., Urbanucci, A., Girma, E. G., Kuryshev, V., Klimczak, L. J., Saini, N., Stütz, A. M., Weichenhan, D., Böttcher, L.-M., Toth, R., ... Weischenfeldt, J. (2018). Molecular Evolution of Early-Onset Prostate Cancer Identifies Molecular Risk Markers and Clinical Trajectories. *Cancer Cell*, *34*(6), 996-1011.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.016>
- Gravestock, P., Somani, B. K., Tokas, T., & Rai, B. P. (2023). A Review of Modern Imaging Landscape for Prostate Cancer: A Comprehensive Clinical Guide. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm12031186>
- Hashemi, M., Taheriazam, A., Daneii, P., Hassanpour, A., kakavand, A., Rezaei, S., Hejazi, E. S., Aboutalebi, M., Gholamrezaie, H., Saebfar, H., Salimimoghadam, S., Mirzaei, S., Entezari, M., & Samarghandian, S. (2023). Targeting PI3K/Akt signaling in prostate cancer therapy. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *17*(3), 423–443. <https://doi.org/10.1007/s12079-022-00702-1>
- He, Y., Xu, W., Xiao, Y.-T., Huang, H., Gu, D., & Ren, S. (2022). Targeting signaling pathways in prostate cancer: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 198. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01042-7>
- Hu, C.-Y., Wu, K.-Y., Lin, T.-Y., & Chen, C.-C. (2021). The Crosstalk of Long Non-Coding RNA and MicroRNA in Castration-Resistant and Neuroendocrine Prostate Cancer:

- Their Interaction and Clinical Importance. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 392. <https://doi.org/10.3390/ijms23010392>
- Hu, H., Luo, H., & Deng, Z. (2024b). PCAT19: the role in cancer pathogenesis and beyond. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 12). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1435717>
- Hua, J. T., Ahmed, M., Guo, H., Zhang, Y., Chen, S., Soares, F., Lu, J., Zhou, S., Wang, M., Li, H., Larson, N. B., McDonnell, S. K., Patel, P. S., Liang, Y., Yao, C. Q., van der Kwast, T., Lupien, M., Feng, F. Y., Zoubeidi, A., ... He, H. H. (2018). Risk SNP-Mediated Promoter-Enhancer Switching Drives Prostate Cancer through lncRNA PCAT19. *Cell*, 174(3), 564-575.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.014>
- Huang, H., Sun, X., Li, P., Cai, H., Xu, L., Shi, B., & Qu, S. (2025). Identification of novel gene-based risk score for prognosis in prostate cancer. *Scientific Reports*, 15(1), 22128. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-03800-3>
- INCUBATOR. (2025). *Cancro da Próstata*. <https://www.incubator-cv.com/cancro>
- Ionescu (Mitu), C. A., Cozaru, G. C., Aschie, M., Leopa, N., Cimpineanu, B., Voinea, F., Matei, E., Mitroi, A., Deacu, M., Iorga, I., & Pundiche, M. (2025). Toward Personalized Surgery in Advanced Prostate Cancer: Stratification by PTEN, AR-V7, TP53, TMPRSS2-ERG, and ERBB2 Genetic Alterations. *Chirurgia*, 120(3), 265. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.3151>
- Jian, J., Wang, X., Zhang, J., Zhou, C., Hou, X., Huang, Y., Hou, J., Lin, Y., & Wei, X. (2024). Molecular landscape for risk prediction and personalized therapeutics of castration-resistant prostate cancer: at a glance. *Frontiers in Endocrinology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1360430>
- Jiang, G., Su, Z., Liang, X., Huang, Y., Lan, Z., & Jiang, X. (2020). Long non-coding RNAs in prostate tumorigenesis and therapy (Review). *Molecular and Clinical Oncology*, 13(6), 1–1. <https://doi.org/10.3892/mco.2020.2146>
- Jin, W., Fei, X., Wang, X., Song, Y., & Chen, F. (2020). Detection and Prognosis of Prostate Cancer Using Blood-Based Biomarkers. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/8730608>
- Levin, R. J. (2018). Prostate-induced orgasms: A concise review illustrated with a highly relevant case study. *Clinical Anatomy*, 31(1), 81–85. <https://doi.org/10.1002/ca.23006>
- Lucarelli, G., Rutigliano, M., Bettocchi, C., Palazzo, S., Vavallo, A., Galleggiante, V., Trabucco, S., Di Clemente, D., Selvaggi, F. P., Battaglia, M., & Ditunno, P. (2013). Spondin-2, a Secreted Extracellular Matrix Protein, is a Novel Diagnostic Biomarker

for Prostate Cancer. *Journal of Urology*, 190(6), 2271–2277.  
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.05.004>

- Mirzaei, S., Paskeh, M. D. A., Okina, E., Gholami, M. H., Hushmandi, K., Hashemi, M., Kalu, A., Zarrabi, A., Nabavi, N., Rabiee, N., Sharifi, E., Karimi-Maleh, H., Ashrafizadeh, M., Kumar, A. P., & Wang, Y. (2022). Molecular Landscape of LncRNAs in Prostate Cancer: A focus on pathways and therapeutic targets for intervention. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 41, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02406-1>
- National Cancer Institute. (2024). *Prostate Cancer*. <https://uroweb.org/guidelines/prostate-cancer>
- Paleati, N., & Munirathinam, G. (2023). Role of Chromatin and Epigenetic Dysregulation in Prostate Cancer: From Development to Progression and Therapeutic Response. *Cancers*, 15(23), 5638. <https://doi.org/10.3390/cancers15235638>
- Sekhoacha, M., Riet, K., Motloung, P., Gumenku, L., Adegoke, A., & Mashele, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27175730>
- Shen, C., Cai, H., Mao, C., Yang, J., & Tang, K. (2025). GADD45G as a novel prognostic biomarker and therapeutic target in glioma: integrative analysis of bulk and single-cell RNA sequencing. *Frontiers in Oncology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1608710>
- Sun, T., Wang, X., He, H. H., Sweeney, C. J., Liu, S. X., Brown, M., Balk, S., Lee, G.-S., & Kantoff, P. W. (2014). MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A. *Oncogene*, 33(21), 2790–2800. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.230>
- Takayama, K., Fujimura, T., Suzuki, Y., & Inoue, S. (2020). Identification of long non-coding RNAs in advanced prostate cancer associated with androgen receptor splicing factors. *Communications Biology*, 3(1), 393. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01120-y>
- TNMplot*. (n.d.). Retrieved December 19, 2025, from <https://tnmplot.com/analysis/>
- Todd M Hoagland. (2025, March 11). *Testes and Epididymis Anatomy - Male reproductive organs, sagittal section*. Medscape. <https://emedicine.medscape.com/article/1949259-overview#a7>
- Vittrant, B., Leclercq, M., Martin-Magniette, M.-L., Collins, C., Bergeron, A., Fradet, Y., & Droit, A. (2020). Identification of a Transcriptomic Prognostic Signature by Machine

Learning Using a Combination of Small Cohorts of Prostate Cancer. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.550894>

Wang, C., Shan, S., Li, X., Wang, H., Qi, J., & Zhao, S. (2024). The role of GADD45G methylation in endometrial cancer: Insights into CDK1/CCNB1 activation and therapeutic opportunities. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 20(4), 1214–1223. [https://doi.org/10.4103/jcrt.jcrt\\_2103\\_23](https://doi.org/10.4103/jcrt.jcrt_2103_23)

Wang, H., Zhang, M., Lu, W., & Yuan, C. (2022). Prostate cancer cell-derived spondin 2 boosts osteogenic factor levels in osteoblasts via the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncology Reports*, 49(1), 23. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8460>

Wu, M., Kong, D., & Zhang, Y. (2023). SPON2 promotes the bone metastasis of lung adenocarcinoma via activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Bone*, 167, 116630. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116630>

Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. In *Oncogene* (Vol. 36, Issue 11, pp. 1461–1473). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>

### **Links importantes da Web:**

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
2. <https://tnmplot.com/analysis/>
3. <https://emedicine.medscape.com/article/1949259-overview#a7>
4. <https://www.incubator-cv.com/>

ANEXOS

---

**Anexo:**



QR code – Ligação e funcionamento do Bento Lab