

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO *FMOD* EM INDIVÍDUOS COM CÂNCER DE PRÓSTATA E HIPERPLASIA BENIGNA PROSTÁTICA

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *FMOD* IN INDIVIDUALS WITH PROSTATE CANCER AND BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA

Ana Clara Sales de Oliveira Otaviano^{1,3,4}; Livia Helena Machado Simão dos Santos^{1,3,4}; Gabriella Oliveira Alves Moreira de Carvalho^{5,6,7}; Gabriella de Medeiros Abreu^{2,8}; Ana Carolina Proença da Fonseca^{2,3,4}; Tamara Silva^{2,3}.

E-mail correspondente: otavianoana7@gmail.com

1. Acadêmico(a) do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (PPG Biotrans), Universidade do Grande Rio/Afya, Brasil. 2. Professora do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (PPG Biotrans), Universidade do Grande Rio/Afya, Brasil. 3. Laboratório de Genética, Universidade do Grande Rio/Afya, Brasil. 4. Laboratório de Genética Humana, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Brasil. 5. Preceptora do Laboratório de Genética, Universidade do Grande Rio/Afya, Brasil. 6. Pós Doutorada do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (BIOTRANS) - UERJ, UNIGRANRIO, InMetro - Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 7. Professora da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde, Departamento de Farmácia, Rio de Janeiro. 8. Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

Eixo Temático: Pesquisa original

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) e a hiperplasia benigna prostática (HBP) são condições frequentes em indivíduos do sexo masculino, especialmente a partir dos 50 anos. Nesse contexto, o gene *FMOD*, que codifica a fibromodulina, proteoglicano envolvido na organização da matriz extracelular e regeneração tecidual, apresenta potencial como biomarcador. O presente estudo teve como objetivo rastrear a região codificante do *FMOD* em pacientes com CaP e HBP. Foram incluídos 255 indivíduos, sendo 71 controles, 49 CaP e 135 HBP. Foram analisados dados clínicos, bioquímicos e demográficos, incluindo PSA, histórico familiar e volume prostático. Os níveis de PSA total e livre foram significativamente maiores no CaP ($p < 0,001$), enquanto o volume prostático foi maior na HBP ($p < 0,001$). A análise molecular foi realizada por sequenciamento automático de Sanger, seguida de caracterização *in silico*. Foram identificadas sete variantes: 3 em regiões regulatórias (rs4971252 (C>G), rs2102307110 (G>A), rs74419933 (C>A)), 2 não sinônimas (rs7543148 (G>A), rs145901742 (C>T)) e 2 intrônicas (rs79536246 (C>T), rs1891180 (A>G)). As variantes rs4971252 e rs2102307110 foram as mais frequentes em HBP; enquanto que a variante rs145901742 apresentou predição *in silico* potencialmente patogênica, porém foi encontrada exclusivamente nos controles, sendo uma VUS (Variante de Significado Incerto - *Variant of Uncertain Significance*), indicando que, até o momento, as evidências disponíveis são

insuficientes para determinar se a alteração apresenta efeito patogênico ou benigno, sugerindo nova análise com número amostral maior. As variantes rs7543148 e rs1891180 foram polimórficas, e rs79536246 predominou em HBP. Os resultados encontrados têm o intuito de auxiliar a ampliação da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no CaP e na HBP, além de fornecer novas perspectivas para a identificação de potenciais marcadores moleculares e o aprimoramento do diagnóstico precoce do CaP e HBP.

Palavras-chave: Câncer de Próstata. Hiperplasia Benigna Prostática. *FMOD*. Fibromodulina. Sequenciamento.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) and benign prostatic hyperplasia (BPH) are common conditions in males, particularly those aged 50 and older. In this context, the *FMOD* gene, which encodes fibromodulin, a proteoglycan involved in extracellular matrix organization and tissue regeneration, shows potential as a biomarker. This study aimed to screen the coding region of *FMOD* in patients with PCa and BPH. A total of 255 individuals were included: 71 controls, 49 with PCa, and 135 with BPH. Clinical, biochemical, and demographic data were analyzed, including PSA levels, family history, and prostate volume. Total and free PSA levels were significantly higher in the PCa group ($p < 0.001$), whereas prostate volume was greater in the BPH group ($p < 0.001$). Molecular analysis was performed using automated Sanger sequencing, followed by in silico characterization. Seven variants were identified: three in regulatory regions (rs4971252 (C>G), rs2102307110 (G>A), rs74419933 (C>A)), two non-synonymous (rs7543148 (G>A), rs145901742 (C>T)), and two intronic (rs79536246 (C>T), rs1891180 (A>G)). The variants rs4971252 and rs2102307110 were the most frequent in BPH; Meanwhile, the rs145901742 variant showed a potentially pathogenic in silico prediction but was found exclusively in controls, classifying it as a VUS (Variant of Uncertain Significance); this indicates that current evidence is insufficient to determine whether the alteration has a pathogenic or benign effect, suggesting the need for further analysis with a larger sample size. Variants rs7543148 and rs1891180 were polymorphic, while rs79536246 predominated in BPH. These findings aim to help expand the understanding of the molecular mechanisms involved in PCa and BPH, as well as provide new perspectives for identifying potential molecular markers and improving the early diagnosis of PCa and BPH.

Keywords: Prostate Cancer. Benign Prostatic Hyperplasia. *FMOD*. Fibromodulin. Sequencing.

INTRODUÇÃO

Doenças prostáticas como o Câncer de Próstata (CaP) e Hiperplasia Benigna Prostática (HBP) são relevantes na saúde masculina.^{1,2} O CaP é importante causa de morbimortalidade, enquanto a HBP está associada ao envelhecimento e pode relacionar-se à progressão do CaP.^{3,4} Seu desenvolvimento envolve fatores genéticos, ambientais e hormonais, como a di-hidrotestosterona (DHT).^{4,5} O diagnóstico inicial para ambas as doenças envolve toque retal digital (DRE) e antígeno prostático específico (PSA); biópsia em casos de CaP.⁵

O CaP e a HBP são doenças complexas e poligênicas, e entre os fatores de risco, o gene *FMOD* se destaca. O *FMOD* possui 2.943 pares de bases, 3 éxons e localiza-se no cromossomo 1q32. Ele codifica a proteína fibromodulina com 376 aminoácidos^{8,9}, que está relacionada à matriz extracelular (MEC), à reparação tecidual e à angiogênese.^{6,7} A interação da fibromodulina com o TGF- β regula processos tumorais, enquanto as vias *SMAD* e *MAPK/ERK* (*Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase*) participam da remodelação da MEC, proliferação e migração celular.^{9,10,11}

O envelhecimento populacional e a baixa adesão masculina à prevenção podem favorecer o agravamento de doenças prostáticas e aumentar a mortalidade. Assim, este projeto busca auxiliar a compreensão do gene *FMOD* no desenvolvimento do CaP e do HBP em indivíduos do sexo masculino, contribuindo para um diagnóstico precoce e novas abordagens terapêuticas. O presente estudo teve como intuito rastrear o gene *FMOD* em novos pacientes com HBP e CaP, bem como em indivíduos controle sem alterações na próstata.

MÉTODO

Neste estudo foram incluídos 255 indivíduos do sexo masculino com idade ≥ 50 anos provenientes dos centros parceiros, INCA (Instituto Nacional do Câncer) e PDC (Policlínica de Duque de Caxias), no município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro. O grupo de pacientes com CaP incluiu indivíduos com diagnóstico clínico de câncer de próstata (n=49); o grupo de indivíduos com HBP (n=135) incluiu pacientes com diagnóstico de hiperplasia benigna prostática e PSA (Antígeno Prostático Específico) alterado, considerando PSA total, livre e volume prostático por ultrassonografia. O grupo controle não apresentava sintomas prostáticos e neoplasias (n = 71). A presença de prostatite foi critério de exclusão para todos os grupos. Este projeto teve seu protocolo aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Unigranrio (CAAE nº 88510618800005283) e do INCA (CAAE nº 88510618830025274). Informações sociodemográficas, bioquímicas e clínicas foram obtidas dos prontuários. Todos os participantes foram informados quanto aos objetivos do estudo e só foram incluídos mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O sangue periférico foi coletado em EDTA e processado no Laboratório de Genética (LABGEN) da Unigranrio/Afya. O DNA genômico foi extraído com FlexiGene DNA Kit (Qiagen®) e os éxons 1, 2 e 3 e regiões de splicing do *FMOD* foram amplificados por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), com primers desenhados no Primer3Web e avaliados *in silico*. Os produtos foram purificados com ExoSAP-IT® e analisados por sequenciamento de Sanger (BigDye Terminator v3.1), na Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz

(PDTIS-FIOCRUZ). Os eletroferogramas foram analisados no BioEdit e comparados à referência no Ensembl (ENST00000354955.4). A classificação das variantes foi investigada em bancos clínicos como o *ClinVar*, e a frequência populacional nos bancos de dados públicos gnomAD e ABraOM. Além disso, sua predição *in silico* e classificação de acordo com o ACMG foram realizadas por meio do acesso à plataforma Franklin. As análises estatísticas foram realizadas no SPSS 25.0, com significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Um total de 255 amostras foi analisado, sendo 71 controles, 49 CaP e 135 HBP. Houve diferenças significativas em idade, estatura, hemácias, hematócrito, PSA total/livre e volume prostático. O grupo controle apresentou maior estatura em comparação com outros grupos ($p=0,006$); o grupo CaP obteve indivíduos com maiores níveis de PSA e maior gravidade dos sintomas, enquanto o grupo HBP apresentou maior volume prostático, sedentarismo, hipertensão arterial sistêmica (HAS), hesitação urinária, poliúria, noctúria e alterações ultrassonográficas. Também houve diferenças entre os grupos em relação à etnia/cor da pele, atividade física, IPSS (*International Prostate Symptom Score*), no qual se demonstrou que os indivíduos com CaP concentraram-se predominantemente nas categorias de gravidade leve, e STUI (*Sintomas do Trato Urinário Inferior*), no qual o sintoma de hesitação urinária foi mais frequente entre os indivíduos com HBP, por exemplo, mostrando as alterações esperadas no desenvolvimento das doenças prostáticas estudadas.

Nossos resultados mostraram a presença de sete variantes: três na região regulatória (rs4971252, rs2102307110, rs74419933), duas não sinônimas (rs7543148 e rs145901742) e duas intrônicas (rs79536246 e rs1891180).

DISCUSSÃO

O gene *FMOD*, que codifica a fibromodulina, atua na organização da matriz extracelular, na regulação do colágeno, na resposta inflamatória e na progressão tumoral. Estudos de Bettin, Reyes e colaboradores demonstraram, em 2016, maior expressão de *FMOD* em células de câncer de próstata, diferentemente das células hiperplásicas.⁶ Assim, variantes intrônicas ou silenciosas podem apresentar relevância funcional, reforçando a necessidade de investigá-las para compreender seu possível papel na HBP e no CaP.

A rs4971252, localizada na região regulatória do éxon 1 e previamente descrita na literatura, apresenta potencial interesse funcional, especialmente pela ocorrência concomitante com outras variantes.^{12,13} As variantes rs2102307110 e rs74419933, também regulatórias, podem igualmente sugerir estudos funcionais, devido à escassez de informações disponíveis.

Entre as variantes intrônicas, a rs79536246, embora classificada como benigna pelo *VarSome* e *Mutation Taster*, e a rs1891180, um polimorfismo comum com frequência de 61,54%, podem apresentar efeitos regulatórios que ainda precisam ser esclarecidos.⁷ No éxon 2, a rs7543148, já descrita em estudos relacionados à miopia, ligamentos e tendões associados à *FMOD*,^{14, 15, 16, 17} também merece investigação quanto à sua relevância prostática. Já a rs145901742, no éxon 3, apresenta predições *in silico* sugestivas de possível impacto estrutural ou funcional na proteína, embora essas evidências não sejam suficientes para estabelecer caráter patogênico.¹⁸

CONCLUSÃO

Foi apresentado sete variantes, com suas diferentes localizações nos éxons 1, 2 e 3, e resultados relevantes, alguns já citados anteriormente pelo nosso próprio grupo de estudo, outros novos: três em região regulatória (rs4971252, rs2102307110, rs74419933), duas não sinônimas (rs7543148 e rs145901742) e duas intrônicas (rs79536246 e rs1891180), tendo suas particularidades destacadas, porém uma delas bastante notória: o comportamento solo da alteração rs79536246 em apenas grupos com as doenças, requerendo mais estudos sobre a mesma. Os achados reforçam a necessidade de estudos funcionais e clínicos e ampliam o conhecimento sobre a variabilidade genética do *FMOD*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schatten, H. (2018). Brief Overview of Prostate Cancer Statistics, Grading, Diagnosis and Treatment Strategies. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 1095, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95693-0_1.
2. Song, Zhenfeng et al. “Correlation between benign prostatic hyperplasia and comorbidities: a systematic analysis integrating global burden of disease and mendelian 62 randomization study.” **Journal of translational medicine** vol. 22,1 1035. 18 Nov. 2024, doi:10.1186/s12967-024-05604-x.
3. Aaron, LaTayia et al. “Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia.” **The Urologic clinics of North America** vol. 43,3 (2016):279-88. doi:10.1016/j.ucl.2016.04.012.
4. Carson C 3rd, Rittmaster R. The role of dihydrotestosterone in benign prostatic hyperplasia. **Urology**. 2003 Apr;61(4 Suppl 1):2-7. doi: 10.1016/s0090-4295(03)00045-1. PMID: 12657354.

5. SEKHOACHA, Mamello et al. Prostate cancer review: Genetics, diagnosis, treatment options, and alternative approaches. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5730, 2022.
6. BETTIN, Alfonso; REYES, Ismael; REYES, Niradiz. Gene Expression Profiling of Prostate Cancer–Associated Genes Identifies Fibromodulin as Potential Novel Biomarker for Prostate Cancer. **The International journal of biological markers**, v. 31, n. 2, p. 153-162, 2016.
7. SILVA, Tamara et al. Fibromodulin gene variants (FMOD) as potential biomarkers for prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Disease Markers*, v. 2022, 2022.
8. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E. Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin, and fibromodulin with transforming growth factor-beta. **Biochem J**. 1994;302(Pt2):527–534. doi: 10.1042/bj3020527.
9. Zheng, Z et al. “Fibromodulin, a Multifunctional Matricellular Modulator.” **Journal of dental research** vol. 102,2 (2023): 125-134. doi:10.1177/00220345221138525.
10. Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGF β in the tumour microenvironment. **Nat Rev Cancer**. 2013 Nov;13(11):788-99. doi: 10.1038/nrc3603. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24132110; PMCID: PMC4025940.
11. Levens E, Luo X, Ding L, Williams RS, Chegini N. Fibromodulin is expressed in leiomyoma and myometrium and is regulated by gonadotropin-releasing hormone analog therapy and TGF-beta through Smad- and MAPK-mediated signaling. **Mol Hum Reprod**. 2005;11(7):489–494. doi: 10.1093/molehr/gah187.
12. Gudjonsson A, Gudmundsdottir V, Axelsson GT, Gudmundsson EF, Jonsson BG, Launer LJ, Lamb JR, Jennings LL, Aspelund T, Emilsson V, Gudnason V. A genome-wide association study of serum proteins reveals shared loci with common diseases. **Nat Commun**. 2022 Jan;13(1):480. doi: 10.1038/s41467-021-27850-z. PMID: 35078996; PMCID: PMC8789779.
13. Polakkattil BK, Vellichirammal NN, Nair IV, Nair CM, Banerjee M. Methylo-me-wide and meQTL analysis helps to distinguish treatment response from non-response and pathogenesis markers in schizophrenia. **Front Psychiatry**. 2024;15:1297760. doi:10.3389/fpsy.2024.1297760.
14. Lin HJ, Wan L, Tsai Y, Tsai YY, Chen WC, Tsai FJ, et al. Sclera-related gene polymorphisms in high myopia. **Mol Vis**. 2009;15:1655-1663.

15. Kaynak M, Nijman F, van Meurs J, Reijman M, Meuffels DE. Genetic variants and anterior cruciate ligament rupture: a systematic review. **Sports Med.** 2017;47(8):1637-1650. doi:10.1007/s40279-017-0678-2.
16. Ribbans WJ, September AV, Collins M. Tendon and ligament genetics: how do they contribute to disease and injury? A narrative review. **Life (Basel).** 2022;12(5):663. doi:10.3390/life12050663.
17. Candela V, Longo UG, Berton A, Salvatore G, Forriol F, de Sire A, et al. Genome-wide association screens for anterior cruciate ligament tears. **J Clin Med.** 2024;13(8):2330. doi:10.3390/jcm13082330.
18. Sahni N, Yi S, Taipale M, Fuxman Bass JI, Coulombe-Huntington J, Yang F, et al. Widespread macromolecular interaction perturbations in human genetic disorders. **Cell.** 2015;161(3):647-660. doi:10.1016/j.cell.2015.04.013.