

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

JOSIANE ABBADIA PESSOA

**AVALIAÇÃO TRANSCRICIONAL DO GENE *TLR9* E SUA CORRELAÇÃO COM
DADOS CLÍNICOS EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2018**

JOSIANE ABBADIA PESSOA

**AVALIAÇÃO TRANSCRICIONAL DO GENE *TLR9* E SUA CORRELAÇÃO COM
DADOS CLÍNICOS EM PACIENTES COM CÂNCER DE PRÓSTATA**

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

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

**PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2018**

JOSIANE ABBADIA PESSOA

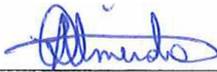
Avaliação transcricional do gene *TLR9* e sua correlação com os dados clínicos em pacientes com câncer de próstata.

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

Banca examinadora:



Prof.^a. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – Universidade Federal de Uberlândia
Presidente



Dra. Luciana de Oliveira Almeida - Universidade Federal de Uberlândia
Membro



MSc Douglas Cardoso Brandão - Universidade Federal de Uberlândia
Membro

Patos de Minas – MG, 03 de Dezembro de 2018

Agradecimentos

Começo este agradecimento dizendo que nem sempre sou boas com palavras, principalmente quando se trata de agradecer, nunca acredito que posso falar o suficiente para demonstrar meu sentimento.

Dito isso quero agradecer a todos os meus professores e aos técnicos que me acompanharam de perto nesta jornada, pessoas que me ensinaram muito, e não somente sobre o conhecimento do curso, mas sobre a vida.

Em especial, tenho que agradecer a professora Thaise, minha orientadora, que me viu nos piores momentos e ainda sim não desistiu de mim, obrigada pela paciência e ensinamentos. E ao Milton que muito mais que um dos técnicos que me salvou várias vezes, foi um amigo querido que pretendo levar por toda a vida. Queria agradecer a outras pessoas que foram importantes, mas já me estendi demais, então meu este é meu agradecimento a todo o corpo docente e técnico da UFU.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos, os que a UFU me deu, e aos que levo comigo antes mesmo da faculdade, estes estiveram comigo em todos os momentos. Como esquecer as farras com o João e o Caio e os momentos que me colocaram no colo para me consolar desde o início do curso, as broncas construtivas da Carol e todos os drama vividos no apartamento ou por me aturar nas minhas crises. As crises existenciais com o Felipe, ou as bebidas maravilhosas da Babi, as trocas de confissões com a Gabi, que morreram com a gente. Como posso deixar de agradecer a Bia por sempre estar comigo, mesmo depois que mudou.

Mesmo não estando ao meu lado diariamente durante estes anos, nunca poderia deixar de falar da minha Loira (Bruna) e da Cinthia, que são minhas almas gêmeas, meus portos seguros, minha luz, a amizade de vocês é inexplicável, amo vocês duas com a minha vida.

E tantos outros que fizeram parte da minha vida durante estes anos da faculdade. Obrigada a todos e a cada um.

Por fim, e não menos importante, quero agradecer a minha família, que esteve do meu lado a cada segundo, que foi minha base, meu suporte. Por eles suportei mais que eu mesma acreditava poder suportar. Falar de vocês é tão fácil e tão difícil ao mesmo tempo.

Também tenho que agradecer as minhas madrinhas e padrinhos, aos meus avós, tios, tias, primos e primas que sempre entenderam cada ausência minha, cada falta nas festas de família, entenderam tudo, e nunca deixaram de me apoiar, amo muito vocês.

Mas vamos lá Pedro, obrigada por cada ligação, mesmo as mais bobas, você não sabe o quanto elas foram importantes para mim. Gui, a gente não era de conversa tanto por ligações, mas saber que mesmo longe eu era a sua confidente em diversos assuntos, e que eu podia contar com você para tudo me ajudou a superar muita coisa, sempre sendo meu melhor amigo. Pai obrigada por conseguir mesmo por telefone me acalmar nos piores momentos, não sei como terminaria o curso sem isso, nunca desisti mesmo quando eu já tinha desistido. Mãe, não sei nem por onde começar, a senhora, assim como o papai, nunca poupou esforços para me manter aqui, para que eu vivesse isso da melhor forma, e mesmo com nossas discordâncias sobre isso, eu vivi isso graças a senhora. Vocês sempre foram minhas inspirações, então meus amores, meu maior agradecimento é para vocês.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é a neoplasia mais comum entre homens no Brasil, após o câncer de pele não melanoma. O Antígeno Prostático Específico (PSA) tem sido o biomarcador mais utilizado para a triagem e diagnóstico da doença, no entanto, é questionado por sua baixa especificidade, uma vez que seus níveis também se alteram em condições não patológicas. Portanto, ainda se mostra necessária a busca por novos biomarcadores, capazes de prever a ocorrência e desenvolvimento do CaP. Os Receptores Toll-like (TLRs) são proteínas associadas à resposta imune, capazes de reconhecer uma diversidade de padrões moleculares, inclusive relacionados a tumores. O presente trabalho objetivou quantificar os transcritos do gene *TLR9* em amostras de tecidos de 22 pacientes com CaP por qPCR. Foi utilizado o método Cq comparativo, validado após a obtenção da curva padrão relativa. Não foi verificada correlação entre os níveis de mRNA de *TLR9* e os dados clínico-patológicos dos pacientes. Em suma o presente trabalho evidenciou a expressão do gene *TLR9*, sendo necessária uma análise com um número maior de indivíduos, para que assim seja possível estabelecer seu comportamento no CaP.

Palavras chave: Câncer. Próstata. Biomarcadores. *Toll-like*. *TLR9*.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the most common neoplasm among men in Brazil after non-melanoma skin cancer. Prostate specific antigen (PSA) has been the most used biomarker for the screening and diagnosis of the disease, however, presents low specificity, since its levels also change in non-pathological conditions. Therefore, it is still necessary to search for new biomarkers, capable of predicting the occurrence and development of PCa. Toll-like Receptors (TLRs) are proteins associated to the immune system and can recognize a high diversity of molecular patterns, including cancer molecules associated to tumors. The present work aimed to quantify TLR9 transcripts in tissues samples of 22 PCa patients by qPCR. The comparative C_q method was used, validated after relative standard curve construction. No correlation was identified between TLR9 mRNA levels and the clinical-pathological data of patients. In summary, the present study demonstrated the expression of the TLR9 gene in tissues of patients with prostate cancer. Further analyses are necessary with a greater number of individuals in order to establish the behavior of TLR9 in PCa.

Keywords: *Cancer. Prostate. Biomarkers. Toll-like TLR9.*

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AJCC: American Joint Committee on Cancer
B2M: β -2-microglobulina
CaP: Câncer de Próstata
cDNA: DNA complementar
CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
DAMPs: Padrões moleculares associados ao dano
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
HPB: Hiperplasia Prostática Benigna
 $\text{I}\kappa\beta$: Inibidor do NF- $\kappa\beta$
IKK β : Fator nuclear kappa β quinase- β
IFN: Interferon
IL: Interleucina
IP-10: Proteína indutível por interferon 10
IRAK: Quinase associada ao receptor IL-1
LPS: Lipopolissacarídeo
LRR: Região rica em leucina
MAPKs: Proteínas quinases ativadas por mitógeno
mRNA: RNA mensageiro
MyD88: Fator de diferenciação mieloide
NF- $\kappa\beta$: Fator nuclear kappa β
NIP: Neoplasia intraepitelial
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
pb: Pares de base
PCA3: Antígeno 3 do câncer de próstata
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pDCs: Células dendríticas plasmocitóides
PSA: Antígeno prostático específico
qPCR: PCR em tempo real
RNA: Ácido ribonucleico
RT-PCR: Transcrição reversa seguida por PCR
STAT: Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TAK1: Quinase ativadora de TGF- β 1
TGF- β 1: Fator de transformação do crescimento beta 1
TIR: Toll-IL-1 – domínio do Toll ligado a uma interleucina 1
TLR: Receptor do tipo Toll
TLR+: TLR positivo
TNM: Tumor-nó-metástase
TRAF6: Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 O Câncer e o acometimento da próstata	10
2.2 O sistema imune e receptores do tipo Toll.....	12
2.3 TLR9 e o câncer.....	15
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4 CAUSUÍSTICA E MÉTODOS	16
4.1 Grupo de estudo	16
4.2 Extração RNA total de Tecido Prostático	17
4.3-Transcrição Reversa	17
4.4- PCR para validação das amostras	17
4.5- PCR em tempo real	18
4.6- Análises Estatísticas	18
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

O câncer tem sido nos últimos anos uma das doenças com o maior índice de mortalidade. Estima-se que em 2018 cerca de 600 mil pessoas serão diagnosticados com essa enfermidade, entre estas, aproximadamente 60 mil serão de próstata (INCA, 2018).

Com tratamentos ainda muito invasivos e nem sempre eficientes, o diagnóstico precoce se torna imprescindível à cura. Além dos métodos clínicos já estabelecidos, emerge, atualmente, a necessidade de biomarcadores capazes de detectar, em nível molecular, as transformações celulares malignas, além de prever sua evolução e agressividade.

O antígeno prostático específico (PSA) é um exemplo de proteína utilizada para o rastreamento e acompanhamento de pacientes. Entretanto, seus níveis séricos se alteram não somente no Câncer de Próstata (CaP), mas também em prostatites e Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). Portanto, a pesquisa por essas moléculas continua premente, visando uma maior especificidade e acurácia. Destacam-se também a busca por marcadores que possam auxiliar no prognóstico, direcionando melhor as estratégias terapêuticas para os pacientes diagnosticados com a doença.

O conhecimento de como a resposta imunológica atua no surgimento, desenvolvimento e na progressão do CaP, ativando diferentes vias de sinalização, é de extrema importância para o desenvolvimento de novas terapias. Nesse contexto, os receptores do tipo Toll (TLRs) surgem como uma alternativa promissora, pois são expressos, em sua maioria, em células imunitárias e seu papel no ambiente tumoral vem sendo descrito, contudo, ainda não esclarecido no CaP.

Diversas pesquisas têm mostrado que a expressão e sinalização do TLR9 estão relacionadas com a regulação tumoral, incluindo a da próstata. Entender o perfil de expressão dos transcritos desse gene no CaP poderá, portanto, direcionar e auxiliar na compreensão do comportamento molecular desses tumores. O presente trabalho visou quantificar o mRNA do *TLR9* em pacientes com CaP correlacionando com dados clínicos (idade e PSA) e histopatológicos (Gleason e invasão). Não foi verificada associação entre os dados, sugerindo que um maior número de pacientes seja analisado, assim como seja avaliado o perfil proteico do alvo em estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Câncer e o acometimento da próstata

A carcinogênese é o mecanismo no qual as células normais, que são organizadas em tecidos e órgãos, se transformam ao sofrerem mutações que podem provocar danos em um ou mais genes (ONCOGUIA, 2017; INCA, 2018). O câncer é uma doença de caráter genético somado aos fatores ambientais e comportamentais de cada indivíduo. Baseia-se no crescimento desordenado das células e ocorre quando os sistemas de reparo e de defesa falham em induzir a apoptose (ALMEIDA, 2017).

A velocidade com que as células se dividem e suas semelhanças com o tecido original definem a malignidade do tumor. Os benignos são caracterizados como uma massa celular que se multiplica mais lentamente e que se assemelha ao seu tecido original, sem riscos à vida do paciente. Os casos de tumores malignos são definidos pela multiplicação de células anormais de modo descontrolado e ininterrupto, que acaba por invadir os tecidos e os órgãos, podendo espalhar-se (metástase), prejudicando seu funcionamento (ALMEIDA, 2017; INCA, 2018). São definidos como carcinoma os de origem epitelial e de sarcomas os provenientes de tecidos conjuntivos (GIANINI, 2004). Apesar de terem uma divisão mais rápida, esse processo pode demorar anos e passa por diversos estágios (MEADOWS, ZHANG, 2015; INCA, 2018).

No primeiro estágio há ocorrência de mutações provocadas por agentes cancerígenos promovendo efeitos ainda não detectados clinicamente. Em seguida, no estágio da carcinogênese, as células mutadas se tornam malignas após modificações genéticas contínuas. O terceiro é a progressão do tumor com sua multiplicação desordenada levando o paciente às primeiras manifestações clínicas com a alteração dos tecidos próximos ou, em casos mais avançados, a invasão de órgãos distantes (ONCOGUIA, 2017).

Existem poucos métodos de tratamento para o câncer, geralmente muito invasivos. O método cirúrgico continua sendo o mais amplamente praticado, além da radioterapia, a qual é fundamentada na destruição das células por radiação. Já a quimioterapia é baseada no uso de substâncias citotóxicas, classificada em curativa, adjuvante, neoadjuvante, paliativa e sinérgica (GIANINI, 2004; ALMEIDA, 2017).

Durante a década de 1980 o câncer ocasionava 10% das mortes por doença no Brasil, sendo a quinta com o maior número de óbitos registrados. Com o decorrer dos anos essa se

tornou a segunda com maior índice de óbitos, atrás apenas das doenças circulatórias (NAKASHIMA et al, 2011). O câncer de próstata (CaP) é, no Brasil, a neoplasia sólida mais comum entre os homens e a segunda mais incidente, após o câncer de pele não melanoma, cujo crescente número de casos diagnosticados nos últimos anos pode ser explicado pelo diagnóstico precoce e pela melhor difusão de informações sobre sua prevenção. Um dos fatores de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia é a idade do paciente. Dados indicam que cerca de três quartos de sua ocorrência são em homens com mais de 65 anos. Outros fatores incluem o histórico familiar e raça do indivíduo (SOUSA; MORAES; BEZERRA, 2013; INCA, 2018).

A próstata é um órgão com o tamanho aproximado de uma noz, que se encontra à frente do reto e abaixo da bexiga, envolvendo a porção inicial da uretra. Trata-se de uma glândula que é constituída por um terço de tecido fibromuscular e dois terços glandulares sendo dividida em zona periférica e zona central (AMARAL, 2011; INCA, 2018).

O Antígeno Prostático Específico (PSA), sintetizado por todas as células epiteliais da próstata, é o biomarcador para a neoplasia mais utilizado por oncologistas. Com sua detecção verificou-se uma melhora na triagem e diagnóstico da doença (BAROUKI, 2011; DIMAKAKOS; ARMAKOLAS; KOUTSILIERIS, 2014). Os programas estabelecem que o valor limítrofe de 4 nanogramas por mililitro (ng/ml). Entretanto, um elevado número de pacientes com níveis séricos superiores não apresenta CaP. Além disso, 25% dos pacientes com níveis inferiores ao limite foram diagnosticados com o tumor (WALLIS, HAIDER, NAM, 2017). Portanto, sua especificidade é questionável, uma vez que alterações são verificadas em prostatites ou infecções urinárias, além de não distinguir uma neoplasia benigna de uma maligna (OTERO et al, 2013; DIMAKAKOS; ARMAKOLAS; KOUTSILIERIS, 2014).

Nesse sentido, há uma premente necessidade de busca por novos biomarcadores mais específicos para o diagnóstico e para uma triagem mais eficaz do CaP, buscando reduzir o número de falso-positivos (WALLIS; HAIDER; NAM, 2017). Nos últimos anos foram realizados estudos visando implementar novos biomarcadores para o tratamento e diagnóstico dessa doença incluindo o *PCA3* (antígeno 3 do câncer de próstata), o proPSA e o [-2] proPSA (OTERO et al, 2013). Receptores do tipo Toll-like (TLRs), por estarem envolvidos no sistema imune inato e adaptativo e com a ocorrência e progressão de tumores sólidos, incluindo o de próstata (REN et al, 2007), também se mostram como possível biomarcadores.

O avanço nos estudos referentes à imunologia tumoral tem permitido a tradução dos mecanismos celulares em alternativas clínicas para muitos pacientes com câncer (RAVAL et

al, 2014). Biomarcadores presentes no sistema imune, como é o caso dos receptores do tipo Toll (TLR), induzem vias de sinalização da resposta inata pró-inflamatória, modulando assim a evolução da doença. Além de responderem a antígenos e a moléculas endógenas, esses receptores são ativados em células hematopoiéticas por reações celulares à infecção, estresse e lesões teciduais. Tumores sólidos, como o de próstata, expressam esses receptores, sugerindo seu papel na biologia tumoral (BHATTACHARJEE e SHIZUO AKIRA, 2004; MOREIRA et al, 2015).

2.2 O sistema imune e receptores do tipo Toll

O sistema imune é capaz de discriminar entre o próprio e o não-próprio, além de reconhecer as células que sofrem mutação no cenário de desenvolvimento do câncer. Dessa forma, uma compreensão contínua e mais detalhada do funcionamento dos mecanismos do sistema imune inato e adaptativo, além da sua interação com o microambiente tumoral é fundamental para o desenvolvimento e utilização de novas e promissoras técnicas terapêuticas (WESTDORP et al, 2014; RAVAL et al, 2014).

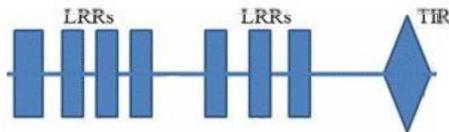
Com a multiplicação de células tumorais, torna-se imprescindível que o sistema imune tenha um bom funcionamento, para evitar a progressão do tumor, assim como auxiliar na eficácia de medicamentos. O sistema imunitário é composto da imunidade inata e adaptativa, ambas com papéis essenciais. A primeira tem uma resposta imediata no reconhecimento das células cancerígenas e reage na sua destruição de forma rápida. Já a segunda é ativada posteriormente e desencadeia respostas mediadas por células T e B (CRESCIOLI et al., 2016; MEADOWS, ZHANG, 2015).

Inicialmente acreditava-se que o sistema imune tinha como função apenas proteger o organismo contra diferentes doenças. No entanto, pode-se afirmar que essa definição se tornou mais ampla, já que este sistema se relaciona também com a progressão e a gravidade, não apenas com a ocorrência de patologias (COYNE, GULLEY, 2014).

Receptores do tipo Toll são expressos principalmente em células imunitárias e conseguem reconhecer uma variedade de padrões moleculares associados a agentes patogênicos (XU et al, 2013). Já foram encontrados cerca de 10 TRLs em humanos e 12 em camundongos, com alvos já descritos (FANG et al, 2010). Essas proteínas são um componente da resposta imune inata que auxilia na detecção e na ativação de células dendríticas (WANG, 2006).

Os TLRs são proteínas transmembranares compostas de um domínio extracelular, com uma região rica em leucina (LRR) e um domínio TIR (Toll-IL-1 – domínio do Toll ligado a uma interleucina 1) conservado que tem como funcionalidade a transdução da via de sinalização e funções efetoras (Figura 1).

Figura 1: Estrutura geral de um receptor do tipo Toll.



Fonte: ZHOU et al., 2017.

As LRRs presentes nos TLRs são capazes de reconhecer regiões conservadas de patógenos, ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Além disso, podem ser ativados também por padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são ligantes endógenos ou moléculas que sinalizam danos no tecido (PILA et al., 2016).

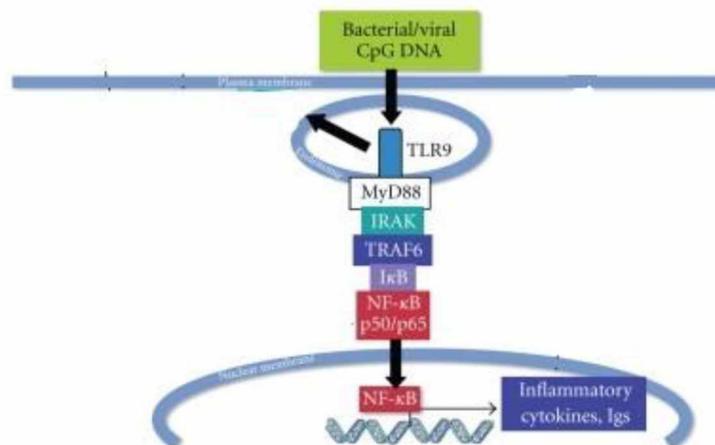
Esses padrões podem ser encontrados em diferentes regiões subcelulares, o que caracteriza a localização distinta entre esses receptores. Nesse sentido, os TLRs 1, 2 e 6, que estão presentes na membrana citoplasmática e possuem uma porção extracelular, podem diferenciar proteínas de choque térmico, glicolipídios e glicoproteínas (TLR1 e TLR2) e lipoproteínas diácidas (TLR2 e TLR6). Já os TLRs 3, 7, 8 e 9 são encontrados em vesículas intracelulares e geralmente distinguem ácidos nucleicos. Para o TLR4, que reconhece o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), foi observado sinais em duas regiões subcelulares (membrana plasmática e o endossoma) (PILA et al., 2016; MCGUIRE, ARTHUR, 2015; KÖBERLIN, HEINZ, SUPERTI-FURGA, 2016). As respostas desencadeadas (degranulação, fagocitose, citotoxicidade mediada por células) são diferentes de acordo com o tipo receptor presente e com o tipo de célula envolvida na resposta (FEI et al., 2016; XU, SACHDEV, 2016).

O TLR9 reconhece regiões de CpG não metiladas dos genomas de procariotos e de vírus de DNA (WANG, 2006). Além disso, sabe-se que essa proteína reconhece o açúcar do DNA e não suas bases, sugerindo que seu alvo primário não são os nucleotídeos (BARNIE et al., 2014). O gene que codifica para TLR9 está localizado no cromossomo 3p21.3 e tem localização descrita no endossomo e lisossomo, sendo encontrado em maior número em células B, células dendríticas plasmocitóides (pDCs) e macrófagos. Quando ativado, inicia a sinalização intracelular que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (CHEN et

al.,2015). Estudos mais recentes demonstraram que a fosforilação de uma de suas tirosinas e outras modificações pós-tradicionais de TLRs, como a clivagem proteolítica no ectodomínio endossomal, são essenciais para a regulação da produção dessas citocinas. Portanto, para que o TLR9 se torne ativo é necessário que haja sua clivagem. Caso não ocorra, o receptor será lançado para a superfície tornando-se hiperativo, podendo, assim, induzir a autoimunidade (HASAN et al., 2016; RÖMMLER et al., 2015)

Em linhas gerais, o domínio LRR do TLR9 reconhece o DNA e proteínas do domínio TIR se ligam ao fator de diferenciação mieloide (MyD88), iniciando assim a via de sinalização do receptor. Em seguida, o domínio N-terminal ativado do MyD88 atrai e interage com a quinase 4 associada ao receptor IL-1 (IRAK-4) que, subsequentemente fosforila as IRAK1 e IRAK2. Estas quinases fosforiladas são responsáveis pela ativação do fator 6 associado ao fator de necrose tumoral (TRAF6). Este, por sua vez, recruta a quinase ativadora de TGF- β 1, (TAK1), que fosforila o inibidor do fator nuclear kappa β quinase- β (IKK β) e as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs). Então, IKK β fosforilado induz a degradação de I κ β , permitindo que o NF- κ B (fator nuclear kappa β) citoplasmático se difunda para o núcleo celular. Em seguida, este se liga aos sítios específicos do DNA regulando a transcrição de genes importantes. A resposta inflamatória se inicia sintetizando as citocinas pró-inflamatórias, como demonstrado na Figura 2 (HSU et al., 2014; DEGUINE e BARTON, 2014; CHEN et al.,2015; ZHOU et al., 2017).

Figura 2: Representação da via de sinalização via TLR9. Ao reconhecer moléculas de DNA com regiões de CpG não metilados, o TLR9 se liga ao MyD88 desencadeando o início da cascata de sinalização que envolverá o fator de transcrição NF- κ B, que regula a expressão de mediadores pró-inflamatórios e de sobrevivência.



A ativação da via dependente de MyD88 também pode ser realizada a partir do reconhecimento de ilhas CpG no DNA por meio da produção direta de IFN- β , o qual promove a fosforilação de STAT1 e a produção de IP-10 através do receptor IFN- α/β (sinalização autócrina). Além disso, TLR9 pode controlar a produção de proteínas anti-inflamatórias, como IL-10, restaurando, assim, a homeostase do organismo (HSU et al., 2014).

De fato, o TLR9 tem se mostrado um alvo promissor no desenvolvimento de vacinas mais eficazes contra doenças autoimunes, infecciosas e também contra o câncer. A direta ativação de células dendríticas por agonistas de TLR, incluindo o TLR9, modula a resposta imune, sobretudo auxiliando no combate à progressão tumoral (KRIEG, 2007). Contudo, estudos adicionais são necessários para melhor compreender seu papel no complexo ambiente tumoral.

2.3 TLR9 e o câncer

Nos últimos anos a expressão de TLR9, responsável por reconhecer CpGs não metilados, tem sido associada a tumores, incluindo o de próstata. Estudos com câncer de pulmão demonstraram a relação entre a expressão e sinalização da via do TLR9 e o aumento do número de células tumorais. Além disso, sua modulação mediada pelo microRNA-7, inibindo sua atividade, sugere diferentes mecanismos moleculares envolvidos em sua regulação (XU et al., 2013; MOREIRA et al., 2015; YUAN et al., 2017). Quando expresso no microambiente tumoral, o receptor estimula vias pró-inflamatórias relacionadas à oncogênese (ZAMBIRINIS et al., 2015; YUAN et al., 2018).

Tem sido descrito o papel de TLR9 na indução de NF- $\kappa\beta$, promovendo a transição epitélio-mesenquimal em tumores de mama triplo negativo (MESEURE et al., 2016). No CaP, Moreira e colaboradores (2015) demonstraram que a quimioterapia e a irradiação podem provocar estresse genotóxico, culminando com a regulação positiva de TLR9. Nesse sentido, tumores prostáticos TLR+ se mostraram menos diferenciados, sendo mais agressivos e passíveis de recidiva.

Sugere-se que o TLR9 se encontra envolvido na regulação de processos-chave associados à oncogênese. Assim, a diminuição de sua expressão pode promover a transformação maligna via deficiência da resposta imunológica, evidenciando sua importância no estudo de tumores (PARROCHE et al., 2016).

De fato, o receptor exerce um papel relevante na progressão tumoral, contudo não elucidado no CaP. Correlacionar seus níveis transcricionais com dados clínico-patológicos de pacientes com a doença se apresenta, portanto, como o primeiro passo na compreensão de alterações moleculares que orquestram a agressividade desses tumores.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral: Detectar os transcritos dos genes *TLR9* no tecido de pacientes com câncer de próstata do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Objetivos Específicos:

- ✓ Estabelecer o perfil de expressão gênica dos genes *TLR9* em pacientes com câncer de próstata;
- ✓ Compreender a relação entre o perfil transcricional do gene e as características clínicas dos pacientes com Câncer de Próstata.

4 CAUSUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Grupo de estudo

Foram incluídos os pacientes com mais de 50 anos e sem história familiar de CaP, e a partir dos 40 anos para aqueles com casos diagnosticados na família ou para homens de raça negra. Os sintomas do trato urinário inferior, o exame digital e as dosagens bioquímicas do PSA no sangue periférico também foram considerados nesse estudo. Com a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o protocolo 005/2001 e a autorização dos pacientes, por meio da assinatura do Termo de Consentimento, a equipe médica e ambulatorial, do departamento de Urologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, coletou as amostras durante o procedimento cirúrgico, sem maiores incômodos ao paciente.

No presente estudo foram coletadas 22 amostras de tecido de paciente que apresentavam CaP submetidos à prostatectomia radical. Os pacientes possuíam idade entre 41 e 75 anos (média de 63,6 anos) e foram considerados apenas aqueles cujo diagnóstico anatomopatológico foi confirmado como positivo para a malignidade.

A classificação histológica com pontuação de Gleason foi agrupada em Gleason ≥ 7 (36,7%), e Gleason < 7 (54,5%). Já na classificação por TNM foram observados tumores de próstata T1/T2 em 81,8% dos casos e T3 em 13,6%. Os níveis séricos médios de PSA para os pacientes foram de 8,72 ng/mL (variando de 0 para 18,16 ng/mL).

4.2 Extração RNA total de Tecido Prostático

Seguindo-se as recomendações do fabricante, utilizou-se o Trizol Reagent® (INVITROGEN) para extração do RNA total das amostras de tecido prostático. Foi analisada a qualidade do material por eletroforese em gel de agarose e quantificado por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi conduzida em gel de agarose 1,5 % e as amostras resolvidas por 1 hora a 100 volts, utilizando-se como tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X, corado com gel red 1X e visualizado por luz ultravioleta (sistema de vídeo documentação *ImageSystem* – VDS, Amersham Biosciences).

4.3 Transcrição Reversa

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 1 μ g de RNA total, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Biosciences), 200 μ M de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros como *primers* randômicos. O volume final de cada reação foi completado para 20 μ l com água tratada com DEPC. A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37°C por 1 hora e aquecida a 95°C por 5 minutos para desnaturação do híbrido RNA-cDNA e também para inativação da enzima MMLV-RT. Reações controle foram realizadas para a verificação de possíveis contaminantes exógenos.

4.4 PCR para validação das amostras

Um fragmento de 534pb do gene *β -2-Microglobulina (B2M)* foi amplificado para confirmação da qualidade do cDNA obtido a partir das amostras coletadas. Os oligonucleotídeos iniciadores (5'-AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA-3' e 5'-TGTTGATGTTGGATAAGAGAA-3') foram adicionados a uma concentração de 5pmol aos demais reagentes da reação sendo: 1X PCR buffer (20 mM Tris-HCl – pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 50% v/v) (Invitrogen), 200 μ M de dNTPs (Invitrogen), 1 U Platinum®Taq DNA polymerase (Invitrogen), 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 2 μ L de cDNA e água mili-Q utilizada para completar o volume final da reação para 20 μ L. A reação ocorreu

em 28 ciclos, sendo cada ciclo composto de 95°C por 4 min, 94°C por 40 s, 59°C por 40s, 72°C por 50s e 72°C por 5 min em termo ciclador PTC-100 (MJ Research Inc.). O produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com gel red 1X.

4.5 PCR em tempo real

Para a reação de qPCR foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene alvo *TLR9* (5'-CCACGGCCTGGTGAAGT-3' e 5'-GGGTGCTGCCATGGAGAA) e para o gene de referência *β2M* (5'-CCTGCCGTGTGAACCATGT-3' e 5'-GCGGCATCTTCAAACCTCC-3'). Para a determinação da eficiência de amplificação do alvo obtida uma curva padrão relativa para a validação do método Cq comparativo.

Todas as reações foram realizadas no aparelho 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) e as análises processadas pelo seu software específico. Para estimar a eficiência (E) de um ensaio de qPCR foi realizado o seguinte cálculo: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$. A curva foi construída a partir de uma alíquota de cDNA proveniente de 1 µg de RNA total extraído de amostra de tecido de pacientes com CaP, amplificadas em duplicata. Foram realizadas diluições em série dessas amostras nas seguintes concentrações: 1/1, 1/4, 1/16, 1/64, 1/256; e três pontos, no mínimo, foram usados na construção do gráfico de regressão linear.

As reações de qPCR foram preparados para um volume final de 10µL, onde 2µL das diluições de cDNA, 5.0 µL de Master Mix SYBR®Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems) composto por: AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD, dNTPs com dUTP/dTTP, referência passiva e tampão otimizado e 3.0 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. Foram utilizados os parâmetros universais para a ciclagem.

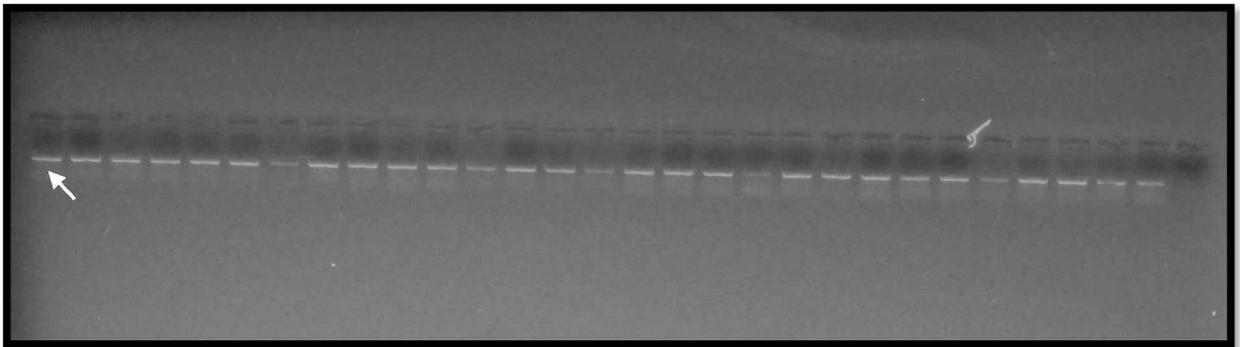
4.6 Análises Estatísticas

Todos os dados obtidos foram posteriormente analisados utilizando o teste de Mann-Whitney para a comparação com dados clinicopatológicos. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 3 encontra-se representado um gel de agarose para a amplificação do gene *B2M* a partir do RNA total extraído de tecidos de pacientes com CaP. Foi detectado o fragmento esperado de 534 pb. Como este gene codifica uma proteína de expressão constitutiva na célula, seus transcritos foram detectados em todas as amostras analisadas. O controle negativo de reação não mostrou nenhuma amplificação, o que garante ausência de contaminantes.

Figura 3: Avaliação da qualidade do RNA extraído das amostras de tecido de Câncer de Próstata a partir da amplificação do gene de referência *β -2-microglobulina*. A última coluna representa o controle negativo. Como esperado, verifica-se a presença do fragmento de 534 pb (indicado pela seta) nas amostras analisadas.



A amplificação de sequências expressas utilizando a técnica de RT-PCR tem se mostrado sensível para fins diagnósticos. Hinz e colaboradores (2017) demonstraram que essa metodologia tem maiores vantagens em relação as demais. A RT-PCR apresenta maior eficiência não somente por sua sensibilidade, mas por ser mais rápida, flexível, acessível e econômica (LLANES et al., 2002; PARK et al., 2016).

Com a RT-PCR é possível a detecção de moléculas específicas de mRNA que podem indicar a presença de células tumorais no tecido, linfonodos, medula óssea, sangue periférico ou outros fluidos corporais (REZAEEJAM et al., 2015; PARK et al., 2016). Interessante ressaltar que muitas modificações moleculares não são visíveis morfologicamente e, portanto, o método pode anteceder o diagnóstico histopatológico (LLANES et al., 2002).

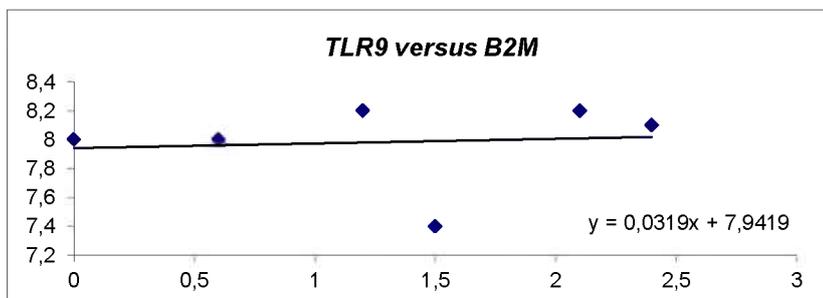
Para a detecção de transcritos do *TLR9* nas amostras de CaP foram efetuados ensaios de qPCR a partir do cDNA já validado. Foi utilizada a metodologia de Cq comparativo. A técnica de qPCR é a principal ferramenta utilizada atualmente para análises quantitativas, como avaliação de expressão gênica, alteração no número de cópias do DNA e análises de polimorfismos. Quando comparada com a PCR convencional, apresenta várias vantagens,

como a quantificação na fase logarítmica da reação (fase exponencial) e não no *end-point*, onde alguns dos reagentes estão esgotados e o produto amplificado começa sua degradação. Além disso, é mais precisa, tem alta sensibilidade, boa reprodutibilidade, dinamismo e quantificação confiável, além de não utilizar gel de agarose (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

Com o desenvolvimento da RT-qPCR houve um avanço no diagnóstico do câncer, por meio de dados significativos e quantitativos da expressão gênica (PARK et al., 2016). A RT-qPCR, por apresentar uma boa acessibilidade metodológica, está se tornando o meio mais utilizado para fins de diagnóstico e na busca de novos biomarcadores (REZAEEJAM et al., 2015; RYDBIRK et al., 2016).

Para a quantificação do gene *TLR9* por PCR em tempo real, nas amostras coletadas, foi necessária a obtenção da curva padrão relativa, garantindo a eficiência da amplificação e a validação do método Cq comparativo. Os *slope* da curva padrão foi próximo de -3,32, indicando uma reação com 100% de eficiência e produzindo, portanto, um aumento de 10 vezes nos amplicons a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ($\log_2 10 = 3,3219$). Valores que diferiram desse ponto foram excluídos, pois indicaram má qualidade da amostra ou erro de pipetagem. Para cada curva padrão o software procurou o melhor ajuste entre os pontos, calculando a regressão linear e fornecendo o R² (ideal $R^2 \geq 0,97$). A eficiência das reações foi calculada pelas diluições de uma amostra de cDNA de tecido de CaP e o gráfico foi gerado por regressão linear no software Microsoft Excel® que representam essa eficiência (Figura 4).

Figura 4: Validação do método Cq comparativo para a quantificação dos transcritos do gene *TLR9* em amostras de pacientes com Câncer de Próstata.

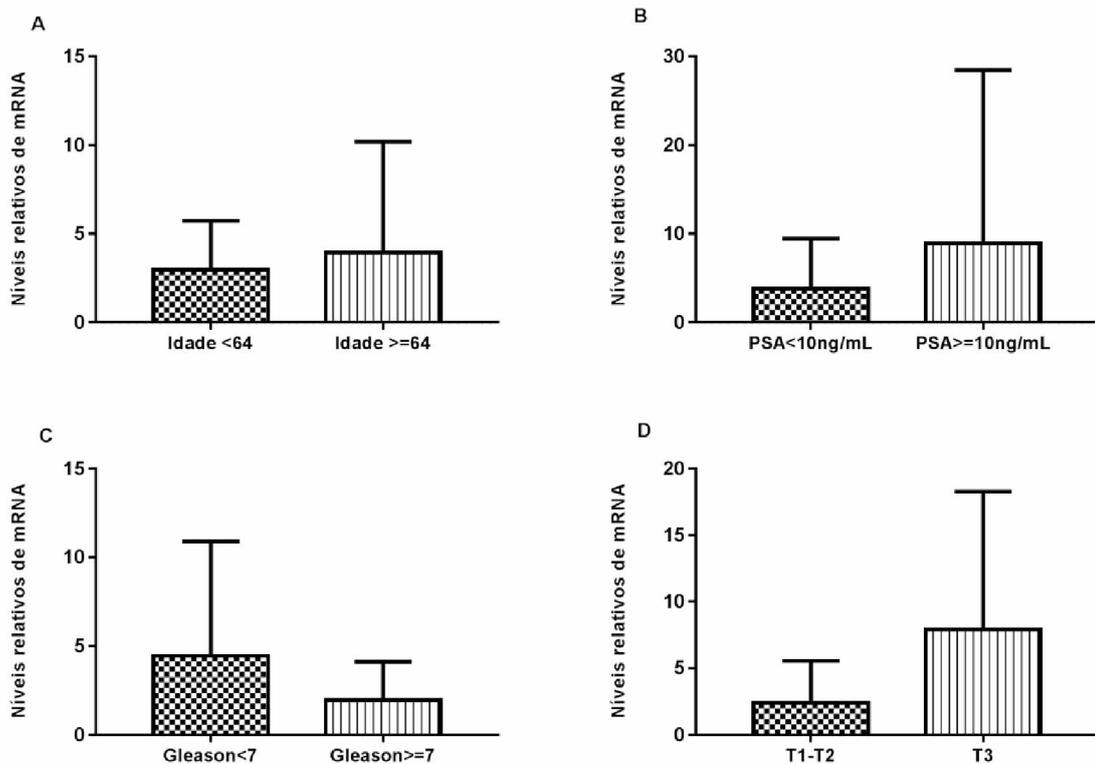


A curva padrão relativa é necessária para se garantir a comparação do gene alvo com o de referência (MA et al., 2006; CARVALHO et al., 2010). Nesse sentido, é construída para

solucionar problemas teórico-práticos dos resultados da quantificação relativa de transcritos (LARIONOV et al., 2005).

Após validação, a expressão do gene *TLR9* foi determinada nos pacientes diagnosticados com CaP, agrupada conforme os dados clínicos (idade e PSA) e patológicos (Gleason e invasão tumoral) (Figura 5). Assim como o histórico familiar e a raça, a idade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do CaP. A probabilidade de se desenvolver a doença aumenta significativamente após os 50 anos, sendo que aproximadamente 60% dos diagnósticos correspondem a homens com idade superior a 65 anos (ONCOGUIA, 2017). Já a associação com o PSA evidencia a possibilidade de recidiva da doença, assim como a possível correlação do gene alvo com a via androgênica (ONCOGUIA, 2017; WALLIS, HAIDER, NAM, 2017; INCA, 2018).

Figura 5: Quantificação relativa dos níveis transcricionais do gene *TLR9* em pacientes com Câncer de Próstata. A expressão de mRNA encontra-se categorizada conforme: (A) idade; (B) níveis séricos de Antígeno Prostático Específico (C) grau de Gleason e (D) Invasão tumoral.



A pontuação de Gleason é uma análise histopatológica importante para a predição da agressividade do tumor prostático. Nesse sentido, quanto maior o escore, mais indiferenciada é a lesão, o que aumenta as suas chances de invasão e metástase (EPSTEIN et al., 2015; SINNOTT, 2016; KWELDAM, KWAST e LEENDERS, 2018). Marcadores correlacionados

ao Gleason são associados, em geral, a um pior prognóstico e podem se mostrar possíveis alvos de terapias promissoras. Apesar de extremamente importante para o prognóstico do indivíduo, a pontuação de Gleason não deve ser analisada sozinha. Consideram-se também os níveis de PSA, resultados do exame de toque retal e o estadiamento tumoral (POSIELSKI; RICHARDS, 2018). O estadiamento, o último parâmetro analisado no presente estudo, define o tamanho do tumor primário (T), o comprometimento linfonodal (N) e a presença de metástase à distância (M), conhecido como TNM (ONCOGUIA, 2017; BOEKER et al., 2016; KANG et al., 2017; POSIELSKI; RICHARDS, 2018). Apesar de sua relevância clínica e de apresentar uma tendência no aumento dos transcritos em pacientes com idade superior a 64, com PSA \geq 10ng/mL, e maior grau tumoral comprovado pela pontuação de Gleason e TNM no presente grupo de estudo não foi identificada a correlação dos transcritos de *TLR9* com os dados clínico-patológicos.

A limitação do presente estudo consiste no pequeno número de pacientes analisados. Portanto, tornam-se necessárias análises posteriores para que o impacto clínico dos transcritos do gene *TLR9* seja elucidado.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo apresentou o perfil de expressão gênica do *TLR9* em amostras de tecidos de pacientes diagnosticados com CaP e submetidos a prostatectomia radical. Foi realizada a análise da correlação entre os níveis de mRNA e os dados clínicos, contudo, sem significância. Sugerimos que análises posteriores sejam conduzidas para elucidar o papel do *TLR9* no CaP.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. R. C. de. **Farmacêuticos em oncologia: uma nova realidade**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017. 650 p.

AMARAL, R. A.. **Aplicabilidade da sequência de difusão no diagnóstico do câncer de próstata: revisão de literatura**. In: III CONGRESSO DE RADIOLOGIA CIMAS. Apresentação de trabalho em congresso. Guarulhos, 2011.

APPLIED BIOSYSTEMS. *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*, 2004.

BENAFIF, S.; EELES, R. Genetic predisposition to prostate cancer. **British Medical Bulletin**, Oxford University Press, v. 120, n. 1, p.75-89, 6 out. 2016.

BARNIE, P. A. et al. CpG-oligodeoxynucleotides suppress the proliferation of A549 lung adenocarcinoma cells via toll-like receptor 9 signaling and upregulation of Runt-related transcription factor 3 expression. **Biomedical Reports**, 2014.

BAROUKI, M. P. El. Rastreamento do cancer de prostate em homens acima de 50 anos através do exame diagnostic de PSA. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**, São Paulo, 2012.

BHATTACHARJEE e SHIZUO AKIRA, R. Toll-Like Receptor Signaling: Emerging Opportunities in Human Diseases and Medicine. **Current Immunology Reviews**, 2004.

BOEKER, M. et al. TNM-O: ontology support for staging of malignant tumours. **Journal of Biomedical Semantics**, 2016.

CHEN, Z. et al. Association between toll-like receptors 9 (TLR9) gene polymorphism and risk of pulmonary tuberculosis: meta-analysis. **Bmc Pulmonary Medicine**, 2015.

COYNE, G. O.; GULLEY, J. L. Adding fuel to the fire: Immunogenic intensification. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, 2014.

CRESCIOLI, S. et al. IgG4 Characteristics and Functions in Cancer Immunity. **Curr Allergy Asthma Rep**, 2016.

DEGUINE, J.; BARTON, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. **F1000prime Rep**, 2014.

DIMAKAKOS, A.; ARMAKOLAS, A.; KOUTSILIERIS, M. Novel Tools for Prostate Cancer Prognosis, Diagnosis, and Follow-Up. **Biomed Research International**, Athens, Greece, 2014.

EPSTEIN, J.I. et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. **European Urology**, 2015.

FANG, J. et al. The role of TLR2, TLR3, TLR4, and TLR9 signaling in the pathogenesis of autoimmune disease in a retinal autoimmunity model. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 51, n. 6, p. 3092, 2010.

FAY, A. P et al. **Sboc**. Câncer de próstata: Doença inicial e recorrência bioquímica. Brasil, 2017. Disponível em: <https://www.sboc.org.br/images/diretrizes/diretrizes_pdfs/Cancer_de_prostata.pdf>. Acesso em: 26 maio 2018.

FEI, C. et al. Biochemical and Functional Insights into the Integrated Regulation of Innate Immune Cell Responses by Teleost Leukocyte Immune-Type Receptors. **Biology**, 2016.

GIANINI, M. M.. Siqueira. Câncer e gênero: enfrentamento da doença. **Boletim Eletrônico da Sociedade Brasileira de Psico-Oncologia**, 2004.

GOMELLA, L. G.; JOHANNES, J.; TRABULSI, E. J. Current prostate cancer treatments: effect on quality of life. **Urology**, 2009.

HASAN, M. et al. TLR9 stability and signaling are regulated by phosphorylation and cell stress. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, 2016.

HINZ, S. et al. Detection of circulating tumor cells with CK20 RT-PCR is an independent negative prognostic marker in colon cancer patients – a prospective study. **Bmc Cancer**, 2017.

HSU, K. et al. TLR9 Ligands Induce S100A8 in Macrophages via a STAT3-Dependent Pathway which Requires IL-10 and PGE₂. **Plos One**, [s.l.], 2014.

INCA. Carcinogênese: mecanismo de desenvolvimento dos tumores. 2018. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/situacao/arquivos/carcinogenese.pdf>>. Acesso em: 02 abr. 2018.

KANG, M. et al. Validation of the 8th edition of the UICC/AJCC staging system for nasopharyngeal carcinoma treated with intensity-modulated radiotherapy. **Oncotarget**, 2017.

KÖBERLIN, M. S; HEINZ, L. X; SUPERTI-FURGA, G. Functional crosstalk between membrane lipids and TLR biology. **Current Opinion in Cell Biology**, 2016.

KRIEG, A. M. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. **Journal of Clinical Investigation**, 2007.

KWELDAM, C.F., KWAST, T.V.D. e LEENDERS, G.J.V. On cribriform prostate cancer. **Translational Andrology and Urology**, 2018.

LARIONOV, et al. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BioMed Central**, 2005.

LLANES, L. et al. The clinical utility of the prostate specific membrane antigen reverse-transcription/polymerase chain reaction to detect circulating prostate cells: an analysis in healthy men and women. **BJU international**, v. 89, n. 9, p. 882-885, 2002.

LOPES, J. A. G.; BORGES-CANHA, M.; PIMENTEL-NUNES, P.. Innate immunity and hepatocarcinoma: Can toll-like receptors open the door to oncogenesis?. **World Journal Of Hepatology**, Pleasanton, Ca, v. 3, n. 8, p.162-182, jan. 2016.

MCGUIRE, V. A.; ARTHUR, J. S. C. Subverting Toll-Like Receptor Signaling by Bacterial Pathogens. **Frontiers in Immunology**, Division of Cell Signalling and Immunology, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, 2015.

MEADOWS, G.G., ZHANG H. Effects of Alcohol on Tumor Growth, Metastasis, Immune Response, and Host Survival. **Alcohol Research: Current Reviews**, 2015.

MOREIRA, D. et al. TLR9 signaling through NF- κ B/RELA and STAT3 promotes tumor-propagating potential of prostate cancer cells. **Oncotarget**, 2015.

NAKASHIMA et al. Cancer mortality trends in Rio Branco, Acre State, Brazil, 1980-2006. SciELO Public Health. **Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca**, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

ONCOGUIA. Carcinogênese. 2017. Disponível em: <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/carcinogenese/6851/844/>>. Acesso em: 02 abr. 2018.

OTERO J. R. et al. Prostate cancer biomarkers: An update. **Elsevier**, 2013.

PARADOWSKA, E. et al. TLR9 -1486T/C and 2848C/T SNPs Are Associated with Human Cytomegalovirus Infection in Infants. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 4, 2016.

PARK, H. S. et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Using Cytokeratin-19 Real-Time RT-PCR. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, Korea, 2016.

PARROCHE, P. et al. TLR9 re-expression in cancer cells extends the S-phase and stabilizes p16^{INK4a} protein expression. **Oncogenesis**, [s.l.], v. 5, n. 7, 25 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2016.49>.

PILA, E. A. et al. A Novel Toll-Like Receptor (TLR) Influences Compatibility between the Gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the Digenean Trematode *Schistosoma mansoni*. **Plos Pathog**, [s.l.], 2016.

RAVAL, R. R. et al. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 **SITC primer**, 2014.

REN, T. et al. Functional expression of TLR9 is associated to the metastatic potential of human lung cancer cell. **Cancer biology & therapy**, 2007.

REZAEIJAM, H. et al. Candidate gene biosensors of mice and human exposure to ionizing radiation by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. **Journal of Cancer Therapeutics and Research**, Tehran, Iran, v. 11, n. 3, p.549-557, 9 out. 2015.

RÖMMLER, F. et al. Guanine-Modified Inhibitory Oligonucleotides Efficiently Impair TLR7- and TLR9-Mediated Immune Responses of Human Immune Cells. **Plos One**, [s.l.], 2015.

RYDBIRK, R. et al. Assessment of brain reference genes for RT-qPCR studies in neurodegenerative diseases. **Scientific Reports**, 2016.

SIMCHONI, N.; CUNNINGHAM-RUNDLES, C. TLR7- and TLR9-Responsive Human B Cells Share Phenotypic and Genetic Characteristics. **The Journal of Immunology**, [s.l.], 2015.

SINNOTT, J.A. Prognostic Utility of a New mRNA Expression Signature of Gleason Score. **Clinical Cancer Research**, 2016.

SOLASSOL, J. et al. Clinical Relevance of Autoantibody Detection in Lung Cancer. **Journal of Thoracic Oncology**, Montpellier, 2011.

SOUSA, M. N. A.; MORAES, S. L. de L.; BEZERRA, A. L. D. CÂNCER DE PRÓSTATA E PREVENÇÃO: conhecimentos e dificuldades na percepção de homens. **Revista Eletrônica da Fainor**, Vitória da Conquista, v. 6, n. 2, p.162-174, dez. 2013.

TEILLAC, P.; MONGIAT-ARTUS, P. Câncer de próstata: destaques de 2006. **Suplementos urológicos europeus**, v. 6, n. 12, p. 728-736, 2007.

WALLIS, C. J. D.; HAIDER, Masoom A.; NAM, Robert K. Role of mpMRI of the prostate in screening for prostate cancer. **Translational Andrology and Urology**, Toronto, Canada, v. 3, n. 6, p.464-471, 14 abr. 2017

WANG, R. Regulatory T cells and toll-like receptors in cancer therapy. **Cancer Research**, v. 66, n. 10, p. 4987-4990, 2006.

WESTDORP, H. et al. Immunotherapy for prostate cancer: lessons from responses to tumor-associated antigens. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 191, 2014.

XU, J.; SACHDEV, U. The Toll of Vascular Insufficiency: Implications for the Management of Peripheral Arterial Disease. **Journal of Immunology Research**, [s.l.], 2016.

XU, L. et al. MicroRNA-7–regulated TLR9 signaling–enhanced growth and metastatic potential of human lung cancer cells by altering the phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3/Akt pathway. **Molecular biology of the cell**, 2013.

ZAMBIRINIS, C. P. et al. TLR9 ligation in pancreatic stellate cells promotes tumorigenesis. **Journal of Experimental Medicine**, 2015.

ZHOU, Y. et al. TLR9 e sua via de sinalização na esclerose múltipla. **Journal of the neurological sciences**, v. 373, p. 95 a 99 de 2017.

