

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

FLÁVIA MIRELLE SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DO GENE FATOR DE ALONGAMENTO
EUCARIÓTICO 1A (*eEF1A*) EM AMOSTRAS DE PACIENTES E EM LINHAGENS
CELULARES PROSTÁTICAS**

**PATOS DE MINAS - MG
MAIO DE 2019**

FLÁVIA MIRELLE SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS DO GENE FATOR DE ALONGAMENTO
EUCARIÓTICO 1A (*eEF1A*) EM AMOSTRAS DE PACIENTES E EM LINHAGENS
CELULARES PROSTÁTICAS**

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

MAIO DE 2019

FLÁVIA MIRELLE SILVA

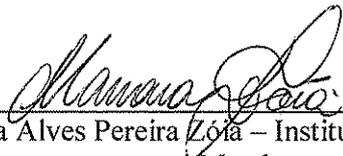
Quantificação dos transcritos do gene fator de alongamento eucariótico 1A (*eEF1A*) em amostras de pacientes e em linhagens celulares prostáticas

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

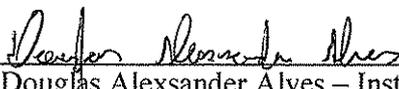
Banca examinadora:



Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – Instituto de Biotecnologia - UFU
Presidente



MSc. Mariana Alves Pereira Zola – Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro



MSc. Douglas Alexander Alves – Instituto de Biotecnologia - UFU
Membro

Patos de Minas-MG, 27 de maio de 2019.

DEDICATÓRIA

A Deus, em quem estão ocultos todos os
tesouros da sabedoria e da ciência.

Aos meus pais, Antônio Carlos e Ozana, e
minha irmã, Gabriela, por sempre me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada, por me conceder o dom da vida e saúde, por estar sempre ao meu lado guiando meus passos e por todas as bênção e proteção divina.

Aos meus pais e minha irmã pelo incentivo, apoio e ajuda, que foram essenciais para que conseguisse vencer mais essa etapa. Mãe, obrigada por todo amor, dedicação, suporte, paciência e por estar sempre presente em todos os momentos, especialmente aqueles que não tinha estrutura para suportar tudo sozinha. Eu amo vocês!

À minha orientadora, Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, pela oportunidade de realizar esse trabalho e fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela confiança e paciência, pela firmeza e objetividade quando foi preciso e por estar sempre disposta a ensinar. Você é uma cientista genial!

Ao meu namorado Rodrigo, por toda paciência, compreensão, carinho e amor. Obrigada por ser tão atencioso e por aguentar tantas crises de estresses e ansiedades. Você foi um grande parceiro ao meu lado!

Aos meus colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia – GBio por toda cooperação, em especial, à Dayanne e à Isabela por toda ajuda e disponibilidade. Um futuro brilhante os espera.

À todos os docentes, por contribuírem para minha formação pessoal e profissional, e à todos os técnicos e funcionários da UFU – Patos de Minas, pelo auxílio e suporte.

À MSc. Mariana Zóia e à MSc. Douglas Alexsander, pela disponibilidade de participarem da banca examinadora.

Aos meus amigos de todos os dias da faculdade, Dayanne, Willow, Isabela, Mikaelle, Iara, Leonardo e João Lucas, pela oportunidade de viver junto com vocês todas as experiências que a graduação me proporcionou. Obrigada Dayanne, pela amizade e companheirismo, pelas conversas e risadas, pelos melhores e mais duros conselhos, enfim, por simplesmente estar presente. Vou levá-los sempre no meu coração!

À todos que participaram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, o meu muito obrigada!!

RESUMO

O Câncer de Próstata (CaP) é, atualmente, o segundo tumor maligno não-cutâneo com maior incidência em homens, representando cerca de 29 % dos novos diagnósticos no mundo. Vários marcadores moleculares têm sido associados à gênese do CaP, contudo ainda carentes de especificidade. O gene fator de alongamento eucariótico1A (*eEF1A*) é considerado bastante promissor, uma vez que se encontra envolvido com a regulação do alongamento da tradução. Entretanto, seu papel no CaP ainda não foi completamente elucidado. Nesse sentido, avaliamos os transcritos do gene *eEF1A* em amostras de pacientes com CaP, Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e linhagens tumorais prostáticas por qPCR, buscando correlacionar os níveis de mRNA com os subtipos celulares e com o diagnóstico dos pacientes. Para isso, foram extraídos os RNAs totais das amostras de sangue, tecido prostático e das linhagens tumorais prostáticas PC3 (resistente à castração), LNCaP (hormônio-dependente) e RWPE-1 (não neoplásica). Foi empregado o método Cq comparativo e os dados normalizados com o gene de referência *B-2-microglobulina (B2M)*. A expressão relativa do mRNA do gene *eEF1A* nas amostras de tecido se mostrou significativamente maior em CaP (1,43 vezes) comparando-se com a HPB ($p < 0,05$). A partir da curva ROC, foi estabelecido o *cut-off* de 0,71 para os transcritos do gene com sensibilidade de 73,68% e especificidade de 60,0%. Quando categorizados, pacientes com os níveis relativos de mRNA superiores a 0,71 apresentaram a chance de ocorrência da doença 4,2 vezes maior (IC: 1,19-14,81; $p < 0,05$). A acurácia do teste foi de 70% (AUC = 0,70; $p = 0,02$). Não foi verificada nenhuma correlação entre os níveis transcricionais de *eEF1A* no tecido e os dados de PSA, Gleason e invasão tumoral. Os resultados para as amostras de sangue não demonstraram diferença estatística entre os grupos avaliados e não se correlacionaram com os dados clínico-patológicos. A expressão de *eEF1A* também se mostrou superior em LNCaP, quando comparada à RWPE-1 ($p < 0,05$). Entre as linhagens tumorais não foi verificada diferença estatisticamente significativa. Os dados apresentados sugerem que o *eEF1A* é um marcador essencial para a transformação maligna das células prostáticas, não estando envolvido com sua progressão. Contudo, estudos funcionais são necessários para validar nossa hipótese.

Palavras-chaves: Câncer de Próstata, Gene *eEF1A*, qPCR, Marcador molecular.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is currently the second non-cutaneous malignant tumor in men, accounting for about 29% of the new diagnoses. Different molecular markers have been described for PCa, although still lacking specificity. The eukaryotic elongation factor 1 (eEF1A) gene is a promising one, since it is involved with the regulation of translation elongation. However, the role of this gene in PCa has not yet been fully elucidated. For this reason, we evaluated the transcriptional levels of eEF1A in samples from patients with PCa benign prostatic hyperplasia (BPH) and in prostatic tumor cell lines by qPCR. mRNA levels were correlated with the diagnosis of patients and with cell subtypes. For this, total RNAs were extracted from blood samples, prostatic tissues and from PC3 (castration resistant), LNCaP (hormone-dependent) and RWPE-1 (non-neoplastic) cell lines. The comparative Cq method was used and data were normalized with the reference gene B-2-microglobulin (B2M). The relative expression of eEF1A mRNA in tissue samples was significantly higher in PCa (1.43 fold) compared to BPH ($p < 0.05$). The cut-off of 0.71 was established for the transcripts based on the ROC curve, with sensitivity of 73.68% and specificity of 60.0%. After categorization, patients with relative mRNA levels higher than 0.71 presented 4.2-fold higher chance to develop PCa (CI: 1.19-14.81; $p < 0.05$). The accuracy was determined by the AUC and was defined as 0.70 ($p = 0.02$). No correlation was found between the transcriptional levels of eEF1A in tissue and the PSA, Gleason and tumor invasion data. The results for the blood samples showed no difference between groups and did not correlate with clinicopathological data. No statistically significant difference was found among the tumor lines. Our data suggest that eEF1A is an essential marker for malignant transformation of prostatic cells and is not involved in its progression. However, functional studies are needed to validate our hypothesis.

Keywords: Prostate Cancer, Gene eEF1A, qPCR, Molecular marker.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa-tRNA: aminoacil tRNA
AR: Receptor de Andr geno
AUC:  rea Sob a Curva
B2M: Beta-2-Microglobulina
CaP: C ncer de Próstata
DEPC: Dietil Pirocarbonato
dNTPs: Desoxirribonucleot deos Fosfatados
DTCs: Células Tumorais Disseminadas
eEF1A: Fator de Alongamento Eucariótico 1A
eEF1A1: Fator de Alongamento Eucariótico 1 alfa 1
eEF1A2: Fator de Alongamento Eucariótico 1 alfa 2
eEF1B: Fator de Alongamento Eucariótico 1B
eEF1B $\alpha\gamma$: Fator de Alongamento Eucariótico 1B $\alpha\gamma$
eEF2: Fator de Alongamento Eucariótico 2
EGF: Fator de Crescimento Epidérmico
GDP: Difosfato de Guanosina
GEF: Fator de Troca de Nucleotídeos de Guanina
GTP: Trifosfato de Guanosina
HPB: Hiperplasia Prostática Benigna
HKG: *Housekeeping*
LHRH: Análogos do Hormônio Luteinizante
miRNA: microRNA
MMLV-RT: Enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murino de Moloney
mRNA:  cido Ribonucleico Mensageiro
PCA3: Antígeno 3 do Câncer de Próstata
PKC: Proteína Quinase C
PR: Prostatectomia Radical
PSA: Antígeno Prostático Específico
qPCR: Rea o em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA:  cido Ribonucleico
RNase: Ribonuclease
ROC: *Receiver Operating Characteristic*
RPMI-1640: Meio produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park
RT: Transcri o Reversa
TNM: *Tumor Node Metastasis*
TPA: Terapia de Priva o Androg nica
tRNA:  cido Ribonucleico Transportador

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
2.1 Aspectos gerais relacionados a tumores	10
2.2 O Câncer de Próstata.....	11
2.2.1 Diagnóstico, prognóstico e tratamento.....	13
2.3 Biomarcadores	14
2.4 Fator de alongamento eucariótico 1A (<i>eEF1A</i>)	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Grupo de estudo	19
3.2 Cultivo celular.....	20
3.3 Extração de RNA	20
3.4 Transcrição reversa	20
3.5 Ensaio de qPCR.....	21
3.6 Análises estatísticas	21
4 RESULTADOS	22
5 DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

O Câncer de Próstata (CaP) é uma doença complexa e heterogênea, sendo o tumor maligno não-epitelial mais comumente diagnosticado em homens no Brasil; o segundo mais prevalente no mundo (SHIN et al., 2018). A alta taxa de incidência, mortalidade e morbidade tornam essa neoplasia um enorme problema de saúde pública e suas chances de cura restritas aos casos diagnosticados precocemente (BERISH et al., 2018).

O CaP apresenta desenvolvimento lento, indolor, com poucos sintomas (BHAGIRATH et al., 2018). O direcionamento terapêutico exige esforços que incluem múltiplas abordagens, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia. No entanto, mesmo recebendo tratamento adequado e, a princípio respondendo às terapias, os pacientes podem progredir para um estágio mais avançado da doença resistente a estratégias antitumorais (YU-LEE et al., 2018).

Nesse contexto, a identificação dos mecanismos e processos relacionados à tumorigênese consiste no primeiro passo para o desenvolvimento de métodos diagnósticos não invasivos, com alta especificidade e sensibilidade, além de terapias e medidas preventivas mais eficazes. De fato, os marcadores disponíveis atualmente ainda apresentam limitações (KONGNYUY et al., 2018), evidenciando a necessidade de se melhor caracterizar molecularmente esses tumores. A síntese global de proteínas consiste em quatro estágios distintos complexamente regulados: iniciação, alongamento, término e reciclagem de ribossomos (BILANGES; STOKOE, 2007). Os fatores de alongamento são considerados umas das proteínas mais abundantes e onipresentes nas células e realizam um papel fundamental para assegurar a decodificação correta do mRNA para a biossíntese proteica.

O fator de alongamento eucariótico 1A (*eEF1A*) catalisa a primeira etapa do ciclo de alongamento. É uma proteína de ligação ao GTP e um importante componente do maquinário de tradução. Sua função canônica é fornecer aminoacil-tRNA ao ribossomo, em um complexo ternário ribossomal composto por aminoacil-tRNA-eEF1A-GTP (BECKER et al., 2013). Além de seu papel essencial na fase de alongamento peptídico, várias outras funções não canônicas já foram relatadas para o eEF1A incluindo a progressão tumoral, invasão, proliferação e migração, degradação de proteínas, apoptose, transformação oncogênica, patogênese viral e transporte nuclear.

Atualmente, sabe-se que o padrão de expressão dos genes pode propiciar informações valiosas sobre como o organismo está respondendo a estímulos externos e a eventuais patogenias. Vale ressaltar que o comportamento de eEF1A no CaP ainda é pouco descrito. Assim, o presente trabalho se propõe a quantificar os níveis relativos do mRNA desse gene em amostras de pacientes com CaP, Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e em linhagens prostáticas, para assim desvendar, em nível transcricional, o papel do eEF1A nessa neoplasia. Considerando o papel desempenhado pelo eEF1A, hipotetizamos que o gene *eEF1A* esteja superexpresso no CaP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais relacionados a tumores

O câncer corresponde a um conjunto complexo de doenças que podem se desenvolver em diferentes tecidos (KUIJER et al., 2018). Globalmente, é responsável por cerca de 1 em cada 6 mortes, sendo aproximadamente 18,1 milhões de pessoas diagnosticadas em 2018. A estimativa para a incidência, mundialmente, é de mais 24 milhões de novos casos em 2040 (WHO, 2018).

A replicação rápida e a invasividade das células do organismo decorre de erros em sistemas de controle e de manutenção do equilíbrio molecular. Essas células são capazes de induzir a formação de um microambiente transformado, alterando o metabolismo de nutrientes, a disponibilidade de oxigênio e a resposta da imunológica associada ao tumor (NCI, 2015).

Mutações em oncogenes e genes supressores de tumor são relacionados ao surgimento e progressão de neoplasias. Os proto-oncogenes são responsáveis por controlar o crescimento e a divisão celular. Já os genes supressores de tumor retardam a proliferação e sinalizam para apoptose ou morte celular programada (KARANIKI et al., 2015). Essas alterações comprometem a estrutura genômica, conferindo às células habilidades funcionais que possibilitam sua sobrevivência, proliferação e metastatização (ROSSI et al., 2018). De fato, os tumores malignos apresentam a capacidade de invadirem outros tecidos e órgãos adjacentes. A disseminação para outras regiões do corpo ocorre através da circulação sanguínea ou linfática. Os benignos não possuem essa característica e, em geral, quando removidos, não crescem novamente (INCA, 2018).

O desenvolvimento de tumores se relaciona a diversos fatores de risco, tanto externos quanto internos ao organismo (NCI, 2015). Os externos, responsáveis por 80% dos casos, incluem aspectos ambientais como exposição a substâncias químicas, radiações ionizantes e não ionizantes, agentes infecciosos, hábitos e estilo de vida, como tabagismo, obesidade, alcoolismo e alimentação (INSTITUTO MARIO PENNA, 2017). Os internos são geneticamente pré-estabelecidos e congruentes à propensão do organismo de se defender das agressões (FUNDAÇÃO DO CÂNCER, 2011).

Devido à capacidade de proliferação descontrolada afetando outras regiões do organismo, os diferentes tipos de câncer são classificados de acordo com a localização primária do tumor (WHO, 2018). Neste contexto, os principais são o câncer de boca, de colo de útero, de esôfago, de estômago, leucemia, colorretal, câncer de mama, de pele, de próstata, de pulmão e de tireoide (CRONIN et al., 2018).

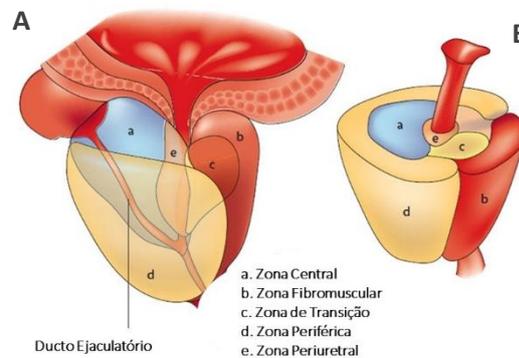
Em homens, a neoplasia não-cutânea que apresenta maior incidência é o câncer de próstata (CaP) e em mulheres o câncer de mama (TORRE et al., 2015). Em 2018/2019, estima-se cerca de 1.735.350 novos casos de câncer e 609.640 mortes nos Estados Unidos, sendo, 19% relacionados à tumores prostáticos (SIEGEL et al., 2018)

2.2 O Câncer de Próstata

A próstata é uma glândula do sistema geniturinário/reprodutor masculino, localizada abaixo da bexiga urinária, no compartimento subperitoneal entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal, envolvendo a porção inicial da uretra. É responsável por produzir e armazenar o fluido seminal que nutre e protege os espermatozoides (GEAVLETE et al., 2016). Sua formação inicia-se durante o processo de embriogênese por meio do brotamento epitelial do seio urogenital e apresenta tipos celulares denominados células epiteliais (células basal e luminal) e estromais (PENG; JOYNER, 2015). Em indivíduos mais jovens, apresenta o tamanho aproximado de uma noz, o qual varia com o avanço da idade do indivíduo (MARZO et al., 2007).

A glândula prostática é composta por uma base, um ápice, superfícies laterais anterior, posterior e inferior, sendo dividida em cinco regiões morfológicas distintas: zona central, zona fibromuscular, zona de transição, zona periférica e zona periuretral (Figura 1) (MARZO et al., 2007; LEE et al., 2011). O crescimento de lesões ocorre principalmente na zona de transição e na zona periférica é detectada a maioria dos casos de hiperplasia prostática benigna (HPB) (SHEN; ABATE-SHEN, 2000).

Figura 1: Representação das zonas estruturais da glândula prostática. A: próstata na sua posição anatômica, em transparência mostrando ducto ejaculatório. B: perspectiva da próstata isolada. O corte transversal evidencia suas zonas em relação a uretra.



Fonte: Adaptado de MARZO et al., 2007.

O CaP, HPB e prostatite são distúrbios que ocorrem regularmente na próstata. A prostatite é uma doença resultante da inflamação da glândula (PRAJAPATI et al., 2013). A HPB é uma neoplasia não maligna predominante na próstata, normalmente diagnosticada em idosos (HU et al., 2015). É caracterizada pelo crescimento do órgão, resultando no seu aumento volumétrico e consequente compressão da uretra, o que interfere no fluxo normal de urina, causando dores (BECHIS et al., 2014).

O CaP em estágio inicial, local ou regional responde bem aos tratamentos propostos, visto que é considerada uma neoplasia de crescimento lento. Trata-se de uma doença heterogênea, com lesões variando de indolores a muito agressivas. (BHAGIRATH et al., 2018). Os sintomas, apesar de não específicos, incluem fluxo urinário fraco ou interrompido, sangue no líquido seminal ou na urina, disfunção erétil, e fraqueza ou dormência nas pernas ou pés (INSTITUTO ONCOGUIA, 2017). Em contrapartida, em metástases do CaP, principalmente óssea, linfonodal e visceral, não há possibilidade de terapia curativa eficiente. Essa realidade se associa aos índices alarmantes de mortalidade associados ao CaP; a quinta maior causa de morbidade e mortalidade relacionada ao câncer no mundo (BERISH et al., 2018).

O primeiro sítio metastático da doença são os ossos (LU et al., 2018). A metástase óssea ocorre devido à reativação das células tumorais dormentes nestes locais e está relacionada à interação dessas com o microambiente ósseo. Ao ser sinalizado, pode controlar a troca entre a dormência e a proliferação das células tumorais disseminadas (DTCs), ocasionando uma evolução da metástase, tanto em seu grau de agressividade e invasão quanto na resistência a terapias antitumorais (YU-LEE et al., 2018).

A compreensão dos mecanismos responsáveis por provocar a dormência do CaP metastático levará ao desenvolvimento de técnicas para diagnóstico precoce, utilizando estratégias válidas e eficazes para evitar sua recorrência (BRIGANTI et al., 2014). Desta forma, é de extrema importância a existência de um teste de detecção precoce, não invasivo, de alta especificidade e sensibilidade oferecendo uma alta probabilidade de cura e melhor sobrevida dos pacientes com CaP em estágios iniciais (CARROLL et al., 2015).

2.2.1 Diagnóstico, prognóstico e tratamento

A dosagem dos níveis séricos do Antígeno Prostático Específico (PSA) é um dos parâmetros utilizados no rastreamento de anomalias prostáticas, associada ao exame de toque retal (INSTITUTO ONCOGUIA, 2017). O hormônio androgênico, após se ligar ao seu receptor, denominado receptor androgênico (AR), regula a expressão de diferentes genes que coordenam a proliferação e sobrevivência celular, dentre estes o PSA (SOEKMADJI et al., 2016) (CHANDRASEKAR et al., 2015). Apesar de amplamente utilizado, sua precisão diagnóstica ainda é questionável, uma vez que seus níveis elevados não são específicos a condições neoplásicas (WU et al., 2018).

A lesão é, portanto, confirmada pelo estudo histopatológico dos tecidos obtidos por biópsia e estadiamento conforme diferentes parâmetros (BHAGIRATH et al., 2018). O estadiamento baseia-se na extensão anatômica da lesão e estabelece o seu grau de disseminação. A classificação dos tecidos neoplásicos auxilia na determinação do prognóstico e na definição da estratégia de tratamento apropriada para o paciente. Existem dois tipos: (i) o estadiamento clínico, o qual estima a extensão da doença de acordo com os resultados dos exames realizados, e (ii) o estadiamento patológico que configura a análise da peça cirúrgica (INCA, 2018).

Para o CaP o sistema de estadiamento mais utilizado é o *Tumor Node Metastasis* (TNM), da *Union for International Cancer Control* (UICC) e *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) associado ao escore de Gleason. O sistema TNM prognostica a doença de acordo com a disseminação anatômica e da extensão do tumor primário (T), com a presença de linfonodos afetados (N) e com a ausência ou presença de metástases à distância (M) (UICC, 2019). Já no Escore de Gleason é avaliada a diferenciação celular e os padrões arquiteturais do CaP, variando de 1 a 5 (SINNOTT et al., 2016). O resultado baseia-se no somatório dos dois padrões mais frequentes observados na região tumoral do fragmento analisado, variando de 2 a 10 (JEĐROSZKA et al., 2017). Os escores com valores de 2 a 4 evidenciam neoplasias bem diferenciadas. Já os valores de 5 a 6 exibem uma maior probabilidade do reaparecimento do

CaP após tratamento primário e de 7 a 10 as células se mostram indiferenciadas, com respostas inadequadas a diferentes opções de tratamento (EPSTEIN et al., 2016).

Para a decisão terapêutica, considera-se, nesse contexto, a idade, os níveis de PSA, o estadiamento, o escore de Gleason e o estado geral de saúde do paciente (CULIG; SANTER, 2014). Estão disponíveis diferentes opções de tratamentos, concomitante com benefícios, riscos e efeitos colaterais. São amplamente empregadas a radioterapia, prostatectomia radical (PR), quimioterapia e hormonioterapia (BILL-AXELSON et al., 2011).

A radioterapia e PR são mais utilizados nos casos de CaP localizado (WOLFF et al., 2015). Na radioterapia é utilizado um feixe de radiação externo e invasivo, que além de atingir as células tumorais pode danificar outros órgãos. Além disso, também é empregada a braquiterapia, na qual ocorre a aplicação de sementes radiativas dentro da glândula prostática (NORUM; NIEDER, 2017; SHEN; ABATE-SHEN, 2010). A PR consiste em retirar completamente a próstata, as vesículas seminais e extremidades do canal deferente. É um procedimento agressivo que pode causar impotência sexual e incontinência urinária (GANDAGLIA et al., 2017; MARTÍN et al., 2016).

No câncer avançado, recorre-se à radioterapia ou prostatectomia associada à terapia hormonal. Para a doença metastática, prioriza-se a hormonioterapia ou quimioterapia. A hormonioterapia envolve a castração cirúrgica, procedimento que remove os testículos, e a terapia de privação androgênica (TPA), na qual ocorre o bloqueio da produção ou a ação da testosterona utilizando análogos do hormônio luteinizante (LHRH), antiandrogêneos e estrógenos. Na quimioterapia empregam-se medicamentos para regredir o tumor (LOEB et al., 2017; OHLMANN, 2017).

Contudo, verifica-se o encadeamento de complicações condizentes aos efeitos psicológicos, colaterais e de resistência do paciente (MICHAELSON et al., 2008). Dessa maneira, torna-se necessária a realização de estudos com o objetivo de buscar biomarcadores envolvidos no surgimento e progressão da doença, tal como investigar novos alvos para o seu tratamento (GEZER et al., 2015).

2.3 Biomarcadores

Um biomarcador é uma molécula biológica encontrada no plasma, fluidos corporais ou tecidos produzidos como resposta a alterações celulares, bioquímicas e moleculares, sejam estas normais, patológicas, ou decorrentes de processo terapêutico (WAGNER; SRIVASTAVA,

2012). Moléculas específicas associadas ao tumor podem ser definidas como metabólitos, proteínas, mRNAs e RNAs não-codificantes (SAINI, 2016; PRENSNER et al., 2012).

A descoberta de biomarcadores é fundamental para a pesquisa com aplicações clínicas, e dessa forma, é considerada uma ferramenta importante para diagnóstico, prognóstico, definição de alvos terapêuticos, rastreamento de doença e a triagem precoce (ZHANG et al., 2018). Já foram descritos: os biomarcadores transversais auxiliando no diagnóstico ou estadiamento, longitudinais utilizados no monitoramento da previsão e encadeamento da doença e aqueles que avaliam a resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica buscando uma melhora significativa no desfecho clínico do paciente (WERMUTH et al., 2018). Para sua caracterização são utilizadas diferentes metodologias como técnicas de imagens, testes bioquímicos, tecnologias ômicas (incluindo genômica, proteômica, metabolômica e lipidômica) e o estudo da biofisiologia do órgão, nas quais verifica-se seu desempenho, confiabilidade, sensibilidade e especificidade (KRAUS, 2018)

O PSA (caliceína humana 3), aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) é o biomarcador mais utilizado no CaP em sua triagem inicial. Contudo, como já descrito, apresenta especificidade questionável (OTERO et al., 2014). O antígeno 3 do câncer de próstata (*PCA3*) é um mRNA não-codificante específico da próstata, em condições de malignidade, detectado na urina e sangue periférico. Estudos mostram uma melhora significativa no diagnóstico com a associação do *PCA3* ao PSA, porém com eficiência limitada quando a doença já se encontra em estágio avançado. Além disso, não exibe interferência na sua expressão diante da idade do paciente, volume da próstata ou traumas anteriores (HENDRIKS et al., 2017). De fato, são moléculas que, potencialmente, podem solucionar problemas relacionados ao diagnóstico, prognóstico e tratamento do CaP, ao avaliar os riscos, monitorar e diferenciar estratégias e decisões na prática clínica (WERMUTH et al., 2018).

2.4 Fator de alongamento eucariótico 1A (*eEF1A*)

A genômica funcional desempenha um papel essencial na elucidação dos processos biológicos nos seres vivos. Neste contexto, os genes são encarregados por determinar e conduzir todas as características dos indivíduos (GRIFFITHS, 2015). As células em organismos multicelulares possuem sistemas que são regulados pela interação de produtos gênicos, estabelecendo redes complexas para suportar suas atividades. As proteínas produzidas e envolvidas em diferentes processos celulares podem ser reguladas tanto na transcrição quanto

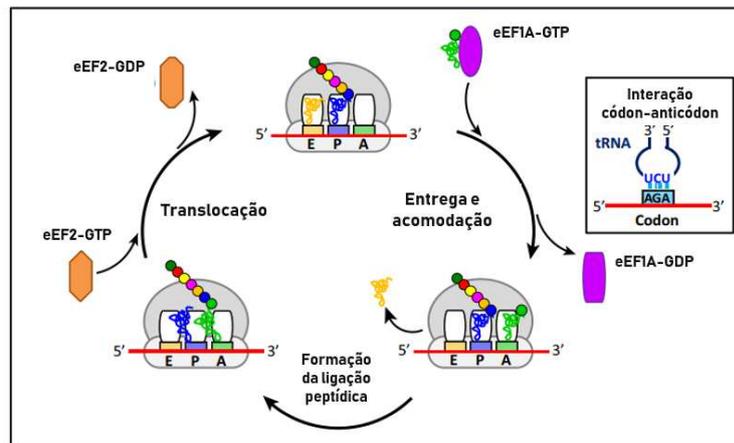
na tradução. Alterações na homeostase desses mecanismos podem conduzir a processos patológicos, dentre estes o câncer.

As células cancerígenas apresentam elevado metabolismo e biossíntese de proteínas (GRZMIL; HEMMING, 2012). A tradução do mRNA em proteínas celulares é mediada por ribossomos e pelos fatores de alongamento como autores-chave. Essa é tipicamente dividida em quatro etapas: iniciação, alongamento, término e reciclagem de ribossomos, todas altamente reguladas (BILANGES; STOKOE, 2007).

O fator de alongamento 1A (*eEF1A*) é uma proteína citoplasmática muito abundante e conservada em eucariontes e procariontes, cuja função é catalisar a ligação dependente de GTP do aminoacil tRNA (aa-tRNA) ao ribossomo na fase de alongamento peptídico da síntese proteica (BECKER et al., 2013). O *eEF1A* pertence à família das proteínas G, assim como seu ortólogo em bactérias EF-Tu, os quais podem sofrer mudanças conformacionais relacionadas aos fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) e hidrólise do GTP (TAYLOR et al., 2007).

Durante a tradução, o *eEF1A* é ativado após ligação ao GTP formando um complexo ternário com o aa-tRNA (DEVER; GREEN, 2012). Após a hidrólise do GTP, há a liberação do complexo *eEF1A*-GDP no ribossomo e a consequente ligação correta do aa-tRNA ao sítio A, direcionada pela complementariedade entre o anticódon e o códon do mRNA. A enzima peptidil-transferase catalisa a formação da ligação peptídica, deixando um tRNA desacetilado no sítio P e um peptidil-tRNA recém-formado no sítio A. Este estado pre-translocacional (PRE) é o substrato da GTPase *eEF2* que catalisa a mudança coordenada das moléculas de mRNA, tRNA e alterações conformacionais. Por conseguinte, o alongamento é completado e o sistema está ativo para o início de um novo ciclo (KAUL et al., 2011; BRULE; GRAYHACK, 2017) (Figura 2).

Figura 2 – Regulação do alongamento da tradução. O fator de alongamento eucariótico 1A (eEF1A) ligado ao GTP fornece um aminoacil tRNA (aa-tRNA) ao sítio A do ribossomo. O GTP é hidrolisado após reconhecimento de codon-anticodon e o eEF1A-GDP é libertado do ribossomo. Posteriormente, a enzima peptidil-tRNA catalisa a formação da ligação peptídica e a translocação do mRNA é mediada pelo fator de alongamento eucariótico 2 ligado ao GTP. O processo é repetido até que o ribossomo encontre um códon de terminação.



Fonte: Adaptado de BRULE; GRAYHACK, 2017.

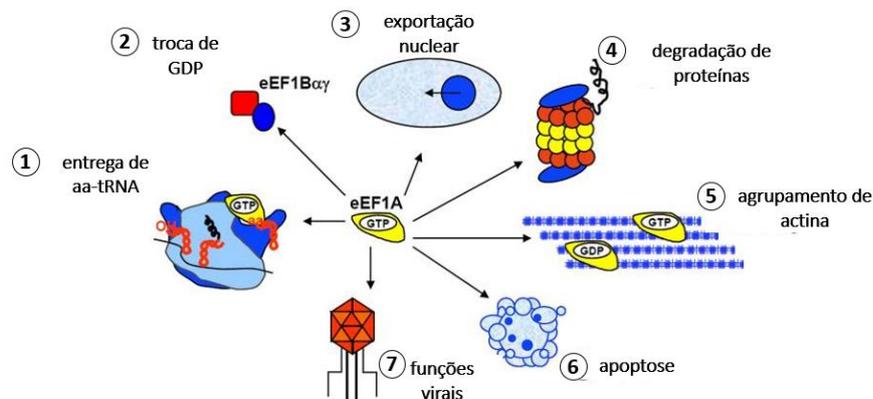
Estudos revelaram que o *eEF1A* forma estruturas cristalinas com três domínios: domínio I, domínio II e domínio III. O domínio I liga-se ao GTP, o domínio II encontra-se envolvido com a ligação do aa-tRNA e, simultaneamente, os domínios I e II interagem com eEF1B α (ABBAS et al., 2015; ANDERSEN et al., 2000). Nos mamíferos, assim como em vários outros vertebrados, são expressos dois parálogos de *eEF1A* altamente similares, designados por eEF1A1 e eEF1A2 (JAKOBSSON et al., 2017). Para a reativação do eEF1A ligado ao GDP é necessário a atividade do complexo eEF1B, que atua como um GEFs (JAKOBSSON et al., 2018).

Modificações pós-traducionais, incluindo a fosforilação por quinases específicas e metilação (BROWNE; PROUD, 2002; HAMEY et al., 2016) podem alterar o funcionamento do eEF1A. Destacam-se a proteína quinase C (PKC), que fosforila o *eEF1A* em treonina na posição 431 (Thr431) (SASIKUMAR et al., 2012), e o receptor do fator de crescimento transformador β tipo 1 (TbR-I), que adiciona grupamentos fosfato em resíduos de serina (Ser300). Demonstrou-se que Ser300 é um aminoácido importante para a ligação do aa-tRNA ao eEF1A (MIGLIACCIO et al., 2016). Além disso, a eEF1A de mamíferos é altamente metilado em cinco resíduos de lisina: Lys36, Lys55, Lys79, Lys165 e Lys318 (MAŁECKI et al., 2017).

Zhu e colaboradores (2009) demonstraram que o *eEF1A* não está envolvido apenas no processo de tradução, mas também desempenha funções não canônicas como o controle da

progressão tumoral, invasão, proliferação e migração de células neoplásicas. Também tem sido atribuído a esse marcador atividades associadas à degradação de proteínas, apoptose, transformação oncogênica, ligação/agrupamento de actina, patogênese viral e transporte nuclear (Figura 3) (MATEYAK; KINZY, 2010; BUNAI et al., 2006; HAMEY et al., 2018).

Figura 3 - Funções canônicas e não canônicas atribuídas ao Fator de Alongamento Eucariótico 1A (*eEF1A*). Sua função canônica é formar um complexo com o aminoacil tRNA (aa-tRNA) de forma dependente do GTP, fornecendo-o ao sítio A ribossômico (1). A troca de GDP é dada pelo GEF *eEF1B α* γ (2). As funções não canônicas incluem sua participação em processos de exportação nuclear (3), degradação de proteínas (4), ligação e agrupamento de actina (5), apoptose (6) e ciclo da vida viral (7).



Fonte: Adaptado de MATEYAK et al., 2010.

Diante de seu papel crucial em eventos diretamente relacionados à malignidade, o *eEF1A* apresenta uma importante atuação na gênese tumoral e na manutenção de células transformadas. Portanto, é considerado um marcador valioso que necessita ser melhor estudado no câncer, sobretudo no CaP.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Quantificar os transcritos do gene Fator de Alongamento Eucariótico 1A (*eEF1A*) em amostras de pacientes com Câncer de Próstata (CaP) e em linhagens tumorais prostáticas.

Objetivos específicos

- Cultivar as linhagens celulares prostáticas: RWPE-1 (não tumorigênica), LNCaP (tumoral - hormônio-dependente) e PC3 (tumoral resistente à castração);
- Definir os níveis relativos de mRNA do *eEF1A* em amostras de pacientes com CaP, HPB e nas linhagens cultivadas;
- Correlacionar os transcritos com os dados clínico-patológicos das pacientes;
- Correlacionar os transcritos com os fenótipos celulares;
- Definir o papel diagnóstico e/ou prognóstico do gene *eEF1A*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Grupo de estudo

Os pacientes incluídos no grupo de estudo foram aqueles com mais de 50 anos sem história familiar de CaP, e a partir dos 40 anos, nos casos de história familiar ou em pacientes de raça negra. Avaliou-se os sintomas do trato urinário inferior, que frequentemente estão relacionados à presença de HPB. Também foram considerados os resultados clínicos para o exame digital e para as dosagens bioquímicas do PSA sérico.

As amostras foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia, mediante autorização dos pacientes, os quais assinaram o Termo de Consentimento. O procedimento de coleta foi realizado dentro da rotina do setor cirúrgico, sem causar desconforto adicional. Todas as técnicas de manipulação do material biológico procederam de acordo com as normas do Código de Ética Médica e a identificação dos pacientes foi feita por seus números de prontuários (protocolo de aprovação do Comitê de Ética 005/2001).

As amostras de sangue periférico e tecido foram coletadas de pacientes submetidos à cirurgia de prostatectomia radical e ressecção transuretral (RTU) para os casos de carcinoma prostático e HPB, respectivamente. Os casos foram incluídos no grupo “Câncer” após a confirmação do diagnóstico anatomopatológico. Houve exclusão dos pacientes com padrão citopatológico de malignidade suspeitos ou indeterminados.

3.2 Cultivo celular

Utilizou-se as linhagens PC3 (carcinoma de próstata resistente à castração), LNCaP (carcinoma de próstata hormônio dependente), cultivadas em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) enriquecidas com soro fetal bovino a 10 % e RWPE-1 (não neoplásica) como controle das análises. Esta foi cultivada em meio de cultivo de queratinócitos enriquecido com 5,0 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 0,05 mg/mL de extrato de pituitária e soro fetal bovino a 10 %.

Todas as linhagens celulares foram incubadas a 37 °C com 5 % de CO₂, suplementadas com 50 µg/mL de gentamicina. O meio de cultura trocado em dias alternados até que as células atingissem 80 % de confluência.

3.3 Extração de RNA

Para as extrações do RNA total das amostras de tecido prostático e linhagens celulares, utilizou-se o TrizolReagent® (INVITROGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. Para as amostras de sangue foram adotados os passos previamente descritos por Neves e colaboradores (2012). A qualidade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5 %, por 40 min a 90 volts em tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X. As amostras foram coradas com GelRed 1X e visualizadas em Transluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (PG Instruments) e a razão 260 nm/280 nm foi utilizada também como parâmetro qualitativo. Posteriormente, o material foi armazenado em ultrafreezer à -80 °C.

3.4 Transcrição reversa

A transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se 1 µg de RNA total extraído, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Amersham Biosciences), 1 X de Tampão da MMLV-RT (Amersham Biosciences), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos randômicos (Invitrogen). O volume final de cada reação foi completado para 20 µL utilizando água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich), um reagente inibidor de RNase. Também foram preparadas reações controle para verificação de possíveis contaminantes exógenos.

As soluções foram incubadas em termociclador ProFlex (Life Technologies) a 37 °C por 1 hora e aquecida a 95 °C por 5 minutos para desnaturação do híbrido RNA-cDNA e para inativação da enzima MMLV-RT. O cDNA foi estocado a -20 °C até posterior amplificação.

3.5 Ensaio de qPCR

A PCR em Tempo Real (qPCR) foi realizada após a transcrição reversa no aparelho StepOnePlus Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). A reação de amplificação foi preparada com 5uL de master mix (SYBR®Green - Applied Biosystems), 5pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e 2uL de cDNA. A água ultrapura completou o volume final para 10uL.

A ciclagem incluiu o aquecimento a 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. Utilizou-se primers específicos para o gene *eEF1A* (5' GGCTACAACCCCGACACAGT 3' e 5' TTGAACCAAGGCATGTTAGCAC 3') normalizados com o gene de referência *B-2-microglobulina (B2M)* (5' CCTGCCGTGTGAACCATGT 3' e 5' GCGGCATCTTCAAACCTCC 3'). Para as análises foi utilizado o método Cq comparativo.

3.6 Análises estatísticas

Para as análises em pacientes, a quantificação dos transcritos foi correlacionada com o diagnóstico (CaP versus HPB), idade, níveis de PSA sérico, os estadiamentos anátomo patológico TNM e pontuação de Gleason pelo teste Mann–Whitney. O poder discriminatório foi estimado pela curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A área sob a curva (AUC) definiu a eficácia do marcador. Estes dados foram calculados pelo *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). As análises de Odds ratio (OR) foram realizadas no programa Bioestat.

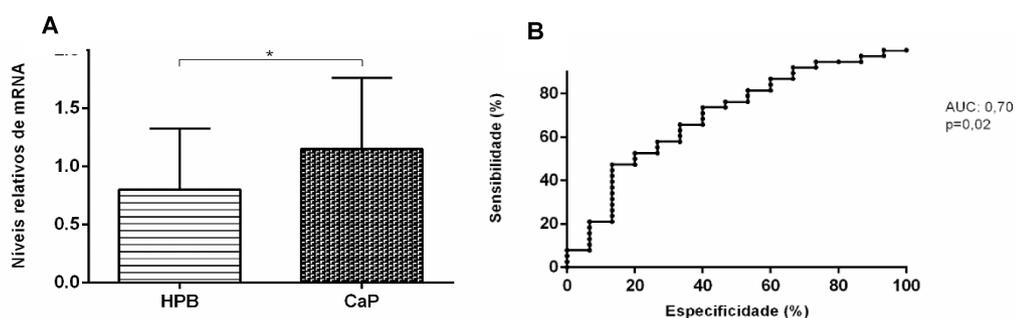
Para a diferenciação dos transcritos em linhagens celulares, após análise de distribuição dos dados, foi utilizado o teste ANOVA seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, conduzidos com o auxílio do *software* GraphPad Prism 7.0. Em todas análises foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Para quantificar os níveis relativos de mRNA do gene *eEF1A* em amostras biológicas (sangue periférico e tecido) e nas linhagens celulares foram realizados ensaios de qPCR. O RNA total foi extraído e as amostras que apresentaram razão das leituras de absorvância a 260 e 280 nm entre 1,8 e 2,0 foram transcritas reversamente.

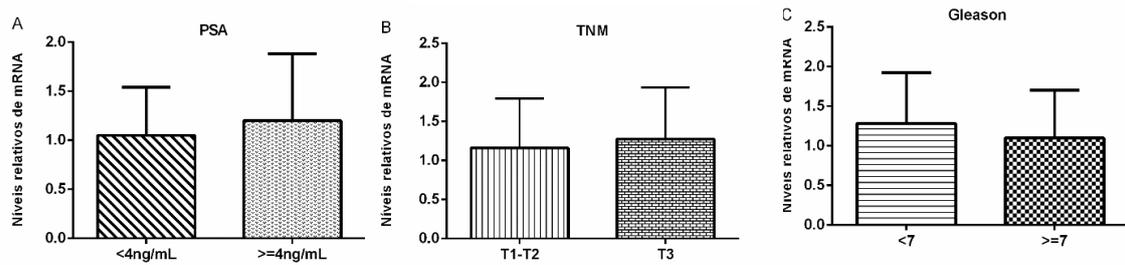
Nas amostras de tecido, os transcritos do gene se mostraram 1,43 vezes mais expressos no CaP do que na HPB ($p < 0,05$) (Figura 2A). Foi construída a curva ROC, na qual são plotadas a sensibilidade e especificidade de um método diagnóstico (MANDREKAR, 2010). A partir desses dados foi estabelecido o *cut-off* de 0,71 para os transcritos de *eEF1A*, com sensibilidade de 73,68% e especificidade de 60,0%. Quando categorizados, pacientes com os níveis relativos de mRNA superiores a 0,71 apresentaram a chance de ocorrência da doença 4,2 vezes maior (IC: 1,19-14,81; $p < 0,05$). A acurácia do teste foi de 70% (AUC = 0,70; $p = 0,02$) (Figura 2B).

Figura 2: Quantificação relativa dos níveis transcricionais do gene *eEF1A* em amostras de tecidos de pacientes com Câncer de Próstata (CaP) e Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). Em (A) a diferenciação dos transcritos conforme o diagnóstico dos pacientes e em (B) o poder diagnóstico do método inferido pela curva ROC. Os dados são apresentados como media \pm DP de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$.



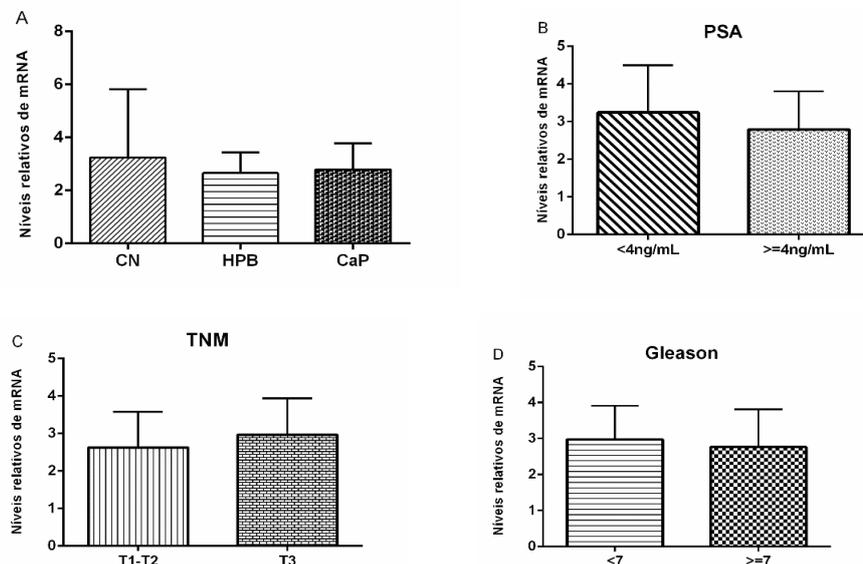
Posteriormente, os pacientes diagnosticados com CaP foram agrupados conforme os dados clínico-patológicos (Figura 3). Contudo, não foi verificada correlação entre os níveis transcricionais de *eEF1A* e os dados de PSA, Gleason e invasão tumoral.

Figura 3: Quantificação dos transcritos, por qPCR, do gene Fator de Alongamento Eucariótico 1A (*eEF1A*) em amostras de tecido de pacientes com Câncer de Próstata categorizados conforme os dados clínico-patológicos. Em (A) pacientes separados de acordo com a dosagem sérica do Antígeno Prostático Específico (PSA), em (B) categorizados segundo estadiamento e em (C) baseados no grau de Gleason.



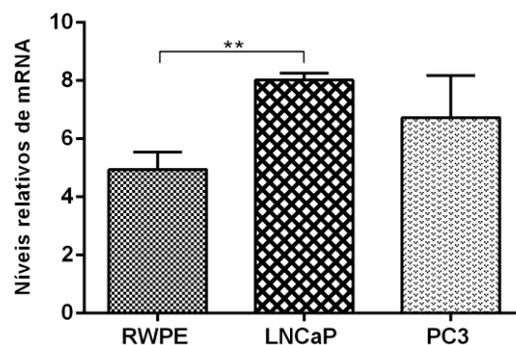
Já para as amostras de sangue, em relação aos níveis transcricionais, não foi verificada diferenças estatisticamente significantes entre os grupos avaliados (Figura 4A). Além disso, também não houve correlação com os dados clínico-patológicos (Figura 4B-D).

Figura 4: Quantificação relativa dos níveis transcricionais do gene Fator de Alongamento Eucariótico 1A (*eEF1A*) em amostras de sangue periférico de pacientes com Câncer de Próstata (CaP), Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e indivíduos jovens (CN). (A) Níveis relativos de mRNA para cada um dos grupos de pacientes. A expressão gênica foi posteriormente categorizada para os pacientes com CaP conforme: (B) níveis séricos de Antígeno Prostático Específico (PSA), (C) Invasão tumoral e (D) grau de Gleason.



Também foram cultivadas as três linhagens prostáticas RWPE-1 (não tumorigênica), LNCaP (tumoral hormônio dependente) e PC3 (tumoral resistente à castração). A expressão do gene *eEF1A* se mostrou significativamente maior na linhagem LNCaP quando comparada à RWPE-1 (Figura 5). Entre as linhagens tumorais não foi verificada diferença estatisticamente significativa.

Figura 5: Quantificação relativa dos níveis transcricionais do gene Fator de Alongamento Eucariótico 1A (*eEF1A*) por qPCR nas diferentes linhagens prostáticas: RWPE-1 (não tumorigênica), LNCaP (tumoral hormônio-dependente) e PC3(tumoral resistente à castração). Os dados são apresentados como média \pm DP de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$.



5 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença geneticamente heterogênea e multifatorial caracterizada pela desregulação de diferentes genes, em particular os que regulam processos moleculares importantes e inseridos no dogma central da biologia (HASSAN et al., 2018). Especial atenção tem sido dedicada aos mecanismos regulatórios inerentes a esses eventos, sobretudo sua relação com a tumorigênese (JOSEPH et al., 2004; KIDO et al., 2010). Durante a tradução, a principal função do eEF1A é catalisar a ligação dependente de GTP e transporte do aa-tRNA para o sítio ribossômico A (JAKOBSSON et al., 2018). Portanto, estudar e demonstrar o comportamento desse marcador no câncer se mostra particularmente interessante.

Já foi relatado que as duas isoformas do *eEFIA*, em níveis normais, atuam como proto-oncogenes, de modo que o aumento da expressão e do número de cópias de *eEFIA1* e *eEFIA2* desempenham um papel crítico na tumorigênese. *eEFIA1* é amplificado em alguns tumores cerebrais (ANAND et al., 2002; SCAGGIANTE et al., 2012), e o *eEFIA2* é relatado como sendo associado em câncer de mama (KULKARNI et al., 2007), pulmão de células não pequenas (KAWAMURA et al., 2014) ovário (PINKE et al., 2008) e gástrico (YANG et al., 2015). Além disso, a superexpressão do *eEFIA* também já foi associada à ocorrência de metástases (HUAIZHENG et al., 2013; TANIGUCHI et al., 1992). Contudo, seus mecanismos permanecem obscuros, assim como seu perfil no CaP.

No presente estudo quantificamos os níveis de mRNA do *eEFIA* em amostras de pacientes e em linhagens celulares prostáticas por meio da técnica de RT-qPCR. Ainda, correlacionamos a expressão do *eEFIA* com dados clínico-patológicos dos pacientes. A transcrição reversa é um método otimizado para investigar a expressão gênica. Detecta pequenas alteração de transcritos, permitindo sua utilização em diferentes tipos de amostras (NEVES et al., 2008). Utilizamos também ensaios de PCR em tempo real, a qual é considerada uma ferramenta de quantificação de alta sensibilidade, precisão, especificidade e eficiência na caracterização de padrões de expressão (ZHAN et al., 2014), inclusive já empregada na análise de marcadores moleculares do CaP (ARAÚJO, 2015).

Foi adotado o sistema semi-quantitativo pautado no método Cq comparativo, o qual necessita de um gene de referência como controle interno da reação para a normalização, fornecendo dados confiáveis e precisos referentes aos níveis de expressão do alvo (PETERS et al., 2004; BERNARD; WITTEWER, 2002; LIU et al., 2015). O gene de referência, também denominado *housekeeping* (HKG) ou normalizador, deve apresentar expressão constante entre as amostras analisadas (WANG et al., 2016). No presente estudo utilizamos o gene *B2M* como referência, previamente validado em ensaios com amostras prostáticas (DISS et al., 2006; MOTA, 2017; KATZ, 2014).

Foram detectados maiores níveis transcricionais do *eEFIA* em amostras de tecidos de pacientes com CaP, sugerindo seu potencial diagnóstico. A utilização de marcadores moleculares é promissora em oncologia. Além de serem mais específicos, essas moléculas permitem detectar alterações ainda não visíveis histologicamente, direcionando o tratamento e essenciais para a predição da sobrevida dos pacientes. De fato, as ferramentas biotecnológicas possibilitam a detecção dos padrões específicos da doença, englobando o estudo de genes que apresentam níveis de expressão mais elevados na presença de tumores sólidos e baixos níveis

em condições benignas, e com um avanço da especificidade para detectar neoplasias, inclusive o CaP (SHAPPELL, 2008).

De acordo com o INCA (2019), a detecção precoce do CaP é de fundamental importância para a cura. Sabe-se que o padrão de expressão gênica pode fornecer informações valiosíssimas para a antecipação diagnóstica, além de permitir um tratamento menos agressivo e mutilante. Para o *eEFIA* foi construída a curva ROC e calculada a AUC a fim de validar seu potencial diagnóstico (HAJIAN-TILAKI, 2013). Uma AUC de 0,5 simboliza um teste sem eficiência discriminativa, enquanto uma AUC de 1,0 indica um melhor desempenho do marcador (HOO et al., 2017). O valor 0,70 define o *eEFIA* como um biomarcador com capacidade preditiva para discriminar o CaP da doença benigna. Além disso, com base na curva ROC, foi estabelecido um valor de cut-off com 73,68% de sensibilidade e 60,0% de especificidade sendo, portanto, um moderado parâmetro diagnóstico.

O rastreamento do CaP vem sendo realizado pela dosagem do PSA, questionado por sua baixa especificidade (WANG et al., 2016). As ferramentas de diagnóstico ideal devem ser sensíveis, específicas, eficazes, não fornecer resultados falso-positivo, além de determinar se a terapia será efetiva e prever sua agressividade. Apesar de inúmeros marcadores já terem sido estudados e associados com o CaP, nenhum apresenta acurácia diagnóstica ideal para esta neoplasia (SZELISKI et al., 2018). Portanto, sugerimos o *eEFIA* como marcador complementar, e estudos adicionais são necessários visando descrever seu comportamento junto à dosagem sérica do PSA no diagnóstico do CaP.

Para avaliar o comportamento dos transcritos do *eEFIA* nos subtipos do CaP, foram também analisadas linhagens celulares prostáticas. A utilização de linhagens celulares na pesquisa sobre o câncer é interessante devido à sua capacidade de autorreplicação em meio de cultura e por representarem subgrupos da doença definidos pela expressão de diferentes marcadores (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). Foram quantificados os transcritos dos genes em uma linhagem hormônio-dependente (LNCaP) e resistente à castração (PC3). Em nosso estudo observamos que a expressão de *eEFIA* se mostrou significativamente elevada na linhagem tumoral hormônio-responsiva LNCaP quando comparada à RWPE-1, não diferindo dos dados observados para a PC3.

A linhagem tumorigênica LNCaP, derivada de metástase linfonodal são células que possuem baixo potencial de ancoragem e não estabelecem uma monocamada uniforme em cultivo celular (HOROSZEWICZ et al., 1980; WEBBER et al., 1997). São típicas do CaP em seu estágio inicial, uma vez que são células cancerosas hormônio dependente (XU et al., 2016). Os dados observados corroboram os obtidos para os pacientes, evidenciando o papel do *eEFIA*

na gênese no CaP. Nossos resultados, portanto, sugerem o *eEFIA* como um possível gene associado à transformação oncogênica na próstata.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a expressão gênica e o perfil diagnóstico do gene *eEFIA*. Os resultados obtidos mostraram sua maior expressão em tecidos de pacientes com CaP e na linhagem celular hormônio-dependente. Esse comportamento sugere o potencial do *eEFIA* como marcador associado à transformação maligna da próstata, com perfil diagnóstico em amostras de tecido. Contudo, estudos funcionais adicionais e análises em um número maior de pacientes são necessários para validar nossa hipótese.

REFERÊNCIAS

ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer. **Genes & Development**, v. 14, n. 19, p. 2410–2434, 1 out. 2000.

ABBAS, W.; KUMAR, A.; HERBEIN, G. The eEF1A Proteins: At the Crossroads of Oncogenesis, Apoptosis, and Viral Infections. **Frontiers in Oncology**, v. 5, 7 abr. 2015.

ANAND, N. et al. Protein elongation factor EEF1A2 is a putative oncogene in ovarian cancer. **Nature Genetics**, v. 31, n. 3, p. 301–305, jul. 2002.

ARAÚJO, L.H.A. **Aplicação de marcadores urinários no diagnóstico e prognóstico do câncer de próstata**. 2015. Tese (Doutorado em urologia) -Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. doi:10.11606/T.5.2015.tde-03022016-114756.

BECHIS, S. K. et al. Personalized Medicine for Management of Benign Prostatic Hyperplasia. **The Journal of urology**, v. 192, n. 1, p. 16–23, jul. 2014.

BECKER, M.; KUHSE, J.; KIRSCH, J. Effects of two elongation factor 1A isoforms on the formation of gephyrin clusters at inhibitory synapses in hippocampal neurons. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 140, n. 6, p. 603–609, dez. 2013.

BERISH, R. B. et al. Translational models of prostate cancer bone metastasis. **Nature Reviews Urology**, 16 maio 2018.

BERNARD, P. S.; WITTEWER, C. T. Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. **Clinical Chemistry**, n. 8, p. 8, 2002.

BHAGIRATH, D. et al. microRNA-1246 Is an Exosomal Biomarker for Aggressive Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 78, n. 7, p. 1833–1844, 1 abril 2018.

BILANGES B, STOKOE D. Mechanism of translational deregulation in human tumors and therapeutic intervention strategies. **Oncogene**.2007; 26: 5973–5990.

BILL-AXELSON, A. et al. Radical Prostatectomy versus Watchful Waiting in Early Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 18, p. 1708–1717, 5 maio 2011.

BRIGANTI, A. et al. Predicting the risk of bone metastasis in prostate cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 1, p. 3–11, fev. 2014.

BROWNE, G.J, PROUD CG. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem*. 2002; 269:5360–5368.

BUNAI, F. et al. Tetrahymena Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A (eEF1A) Bundles Filamentous Actin through Dimer Formation. **The Journal of Biochemistry**, v. 140, n. 3, p. 393–399, 1 set. 2006.

CARROLL, P. R. et al. Prostate Cancer Early Detection, Version 2.2015. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 13, n. 12, p. 28, 2015.

CHANDRASEKAR, Thenappan et al. Targeting molecular resistance in castration-resistant prostate cancer. **Bmc Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-10, 1 set. 2015.

CRONIN, K. A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics: Annual Report National Cancer Statistics. **Cancer**, v. 124, n. 13, p. 2785–2800, 1 jul. 2018.

CULIG, Z.; SANTER, F. R. Androgen receptor signaling in prostate cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 33, n. 2–3, p. 413–427, set. 2014.

DE CARVALHO, W. J. Quantificação Relativa dos níveis transcricionais dos genes LSP1 e RNASEL em tecido prostático e sangue periférico de pacientes com Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna. p. 67, 2009.

DEVER, T. E.; GREEN, R. The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 7, jul. 2012.

DISS, J. K. J. et al. Brn-3a neuronal transcription factor functional expression in human prostate cancer. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 83–91, mar. 2006.

EDGE, S.B. et al. American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging manual, 7. Aufl. Springer, New York, 2009.

EDMONDS, B. T. et al. Elongation factor-1 α is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. p. 10, 1996.

EPSTEIN, J. I. et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. **European Urology**, v. 69, n. 3, p.428-435, mar. 2016.

FUNDAÇÃO DO CÂNCER. 2011. **Principais causas do câncer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org.br/principais-causas-do-cancer/>>. Acesso em: 24 set. 2018.

GANDAGLIA, G. et al. Adjuvant and Salvage Radiotherapy after Radical Prostatectomy in Prostate Cancer Patients. **European Urology**, v. 72, n. 5, p. 689–709, nov. 2017.

GEAVLETE, P.; NIȚĂ, G.; GEAVLETE, B. Endoscopic Electroresection of Benign Prostatic Adenoma (TURP). In: **Endoscopic Diagnosis and Treatment in Prostate Pathology**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 9–66.

GEZER, U. et al. Androgen Stimulation of PCA3 and miR-141 and Their Release from Prostate Cancer Cells. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 16, n. 4, p. 488–493, 2015.

GRIFFITHS, Anthony J. F. et al. **Introdução à Genética**. 10. ed. Tradução Idilia Vanzellotti. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

GRZMIL M, HEMMINGS BA. Translation regulation as a therapeutic target in cancer. *Cancer Res.*2012; 72:3891–3900.

HAIJIAN-TILAKI, K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 4, n. 2, p. 627–635, 2013.

HAMEY, J. J. et al. Novel N-terminal and Lysine Methyltransferases That Target Translation Elongation Factor 1A in Yeast and Human. **Molecular & Cellular Proteomics: MCP**, v. 15, n. 1, p. 164–176, jan. 2016.

HAMEY, J. J.; WILKINS, M. R. Methylation of Elongation Factor 1A: Where, Who, and Why? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 3, p. 211–223, mar. 2018.

HASSAN, MD. K. et al. The expression profile and prognostic significance of eukaryotic translation elongation factors in different cancers. **PLOS ONE**, v. 13, n. 1, p. e0191377, 17 jan. 2018.

HENDRIKS, R. J.; VAN OORT, I. M.; SCHALKEN, J. A. Blood-based and urinary prostate cancer biomarkers: a review and comparison of novel biomarkers for detection and treatment decisions. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 20, n. 1, p. 12–19, mar. 2017.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, ago. 2011.

HOO, Z. H.; CANDLISH, J.; TEARE, D. What is an ROC curve? **Emergency Medicine Journal**, v. 34, n. 6, p. 357–359, jun. 2017.

HOROSZEWICZ, J S et al. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Progress in clinical and biological research*, v. 37, p. 115–32, Jan. 1980.

HU, J. et al. Role of inflammation in benign prostatic hyperplasia development among Han Chinese: A population-based and single-institutional analysis. **International Journal of Urology**, v. 22, n. 12, p. 1138–1142, dez. 2015.

HUAIZHENG L. et al. Increased expression of elongation factor-1 α is significantly correlated with poor prognosis of human prostate cancer. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, 44(5), 277–283. doi: 10.3109/00365599.2010.492787.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA .Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. O que é o câncer?. 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 8 mai. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. Sintomas. 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/sintomas>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER– INCA. **Estadiamento**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54>. Acesso em 30 out. 2018.

INSTITUTO MARIO PENNA.2017. **O que causa o câncer?**. Disponível em: <<http://www.portaldocancer.org.br/noticia/o-que-cao-a-o-cancer/>>. Acesso em: 24 set. 2018.

INSTITUTO ONCOGUIA. Sinais e sintomas do câncer de próstata. 2017. Disponível em: < <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-do-cancer-de-prostata/1188/288/> >. Acesso em: 10 mai. 2018.

INSTITUTO ONCOGUIA. Diagnóstico do Câncer de Próstata. 2017. Disponível em: < <http://www.oncoguia.org.br/conteudo/diagnostico/773/149/> >. Acesso em: 18 mai. 2018.

JAKOBSSON, M. E. et al. Methylation of human eukaryotic elongation factor alpha (eEF1A) by a member of a novel protein lysine methyltransferase family modulates mRNA translation. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 14, p. 8239–8254, 21 ago. 2017.

JAKOBSSON, M. E. et al. Regulation of eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A) by dynamic lysine methylation. **RNA Biology**, v. 15, n. 3, p. 314–319, 4 mar. 2018.

JAKOBSSON, M. E. et al. The dual methyltransferase METTL13 targets N terminus and Lys55 of eEF1A and modulates codon-specific translation rates. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, dez. 2018.

JĘDROSZKA, D. et al. Markers of epithelial-to-mesenchymal transition reflect tumor biology according to patient age and Gleason score in prostate cancer. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, 4 dez. 2017.

JOSEPH, P. et al. Expression profile of eukaryotic translation factors in human cancer tissues and cell lines. **Molecular Carcinogenesis**, v. 40, n. 3, p. 171–179, jul. 2004.

KATZ, B. S. **Estudo dos genes e microRNAs relacionados à transição epitélio-mesenquimal no adenocarcinoma de próstata**. 2014. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

KARANIKI, S. et al. DNA damage response and prostate cancer: defects, regulation and therapeutic implications. **Oncogene**, v. 34, n. 22, p. 2815–2822, maio 2015.

KAUL, G, PATTAN G, RAFEEQUI, T. Eukaryotic elongation factor-2 (eEF2): its regulation and peptide chain elongation. *Cell Biochem Funct*. 2011; 29: 227-234

KAWAMURA M. et al. O significado prognóstico do fator de alongamento eucariótico 1 alfa-2 em câncer de pulmão de não pequenas células. *Anticancer Res*. 34 (2): 651-8. Epub 2014/02/11. 34/2/651 [pii]. pmid: 24510995.

KIDO, T. et al. Expression of the Y-Encoded TSPY is Associated with Progression of Prostate Cancer. **Genes**, v. 1, n. 2, p. 283–293, 14 set. 2010.

KONGNYUY, M. et al. PSA kinetics following primary focal cryotherapy (hemablation) in organ-confined prostate cancer patients. **World Journal of Urology**, v. 36, n. 2, p. 209–213, fev. 2018.

KRAUS, V. B. Biomarkers as drug development tools: discovery, validation, qualification and use. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 14, n. 6, p. 354–362, jun. 2018.

KUIJER, M. L. et al. Cancer subtype identification using somatic mutation data. **British Journal of Cancer**, 16 mai. 2018.

LAMBERTI, A. et al. The translation elongation factor 1A in tumorigenesis, signal transduction and apoptosis: Review article. **Amino Acids**, v. 26, n. 4, jul. 2004.

LEE, C.H. et al. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565–575, set. 2011.

LIU, J. et al. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in *Panax ginseng* at Different Stages of Growth and in Different Organs. **Plos One**, v. 9, n. 11, e112177, 2015.

LOEB, S. et al. Testosterone Replacement Therapy and Risk of Favorable and Aggressive Prostate Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 13, p. 1430–1436, 1 maio 2017.

LU, X. et al. An in vivo screen identifies PYGO2 as a driver for metastatic prostate cancer. **Cancer Research**, 16 mai. 2018.

MAŁECKI, J. et al. The novel lysine specific methyltransferase METTL21B affects mRNA translation through inducible and dynamic methylation of Lys-165 in human eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A). **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 8, p. 4370–4389, jan. 2017.

MANDREKAR, J. N. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 9, p. 1315–1316, set. 2010.

MARTÍN, O. D. et al. Single port radical prostatectomy: current status. **Journal of Robotic Surgery**, v. 10, n. 2, p. 87–95, jun. 2016.

MARZO, A. M. et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256–269, abr. 2007.

MATEYAK, M. K.; KINZY, T. G. eEF1A: Thinking Outside the Ribosome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 28, p. 21209–21213, 9 jul. 2010.

MATIN, Farhana et al. A Plasma Biomarker Panel of Four MicroRNAs for the Diagnosis of Prostate Cancer. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, abr. 2018.

MICHAELSON, M. D. et al. Management of Complications of Prostate Cancer Treatment. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 58, n. 4, p. 196–213, 2008.

MIGLIACCIO, N. et al. Ser/Thr kinases and polyamines in the regulation of non-canonical functions of elongation factor 1A. **Amino Acids**, v. 48, n. 10, p. 2339–2352, out. 2016.

MOTA, S. T. S. **Expressão diferencial do gene PBRM1 e sua qualificação clínica em tumores de próstata**. 2017. 56 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NIH. **What is cancer?**. 2015. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>>. Acesso em: 8 mai. 2018.

NEVES, A. F. et al. Prostate cancer antigen 3 (PCA3) RNA detection in blood and tissue samples for prostate cancer diagnosis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 4, 1 jan. 2013.

NEVES, A.F. et al. **Combined analysis of multiple mRNA markers by RT-PCR assay for prostate cancer diagnosis**. *Clin Biochem*. Canadá, v.41, n. 14-14, p. 1191-1198, Out. 2008.

NORUM, J.; NIEDER, C. Treatments for Metastatic Prostate Cancer (mPC): A Review of Costing Evidence. **PharmacoEconomics**, v. 35, n. 12, p. 1223–1236, dez. 2017.

OHLMANN, C.-H. Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom: Empfehlungen zur primären Hormon- oder Hormonchemotherapie. **Der Urologe**, v. 56, n. 11, p. 1424–1429, nov. 2017.

OTERO, R.J. et al. Prostate cancer biomarkers: An update. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, n. 3, p. 252–260, abr. 2014.

PENG, Y.-C.; JOYNER, A. L. Hedgehog signaling in prostate epithelial-mesenchymal growth regulation. **Developmental biology**, v. 400, n. 1, p. 94–104, 1 abr. 2015.

PETERS, I. R. et al. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. **Journal of Immunological Methods**, v. 286, n. 1–2, p. 203–217, mar. 2004.

PINKE D.E. et al. O significado prognóstico do fator de alongamento eEF1A2 no câncer de ovário. *Gynecol Oncol*.2008; 108 (3): 561-8. Epub 2008/01/01. S0090-8258 (07) 00906-7 [pii] pmid: 18164751.

PRAJAPATI, A. et al. Prostate Stem Cells in the Development of Benign Prostate Hyperplasia and Prostate Cancer: Emerging Role and Concepts. **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-10, 2013.

PRENSNER, J. R. et al. Beyond PSA: The next generation of prostate cancer biomarkers. **Science translational medicine**, v. 4, n. 127, p. 127rv3, 28 mar. 2012.

ROSSI, G. et al. Tau mutations serve as a novel risk factor for cancer. **Cancer Research**, p. canres. 3175.2017, 1 jan. 2018.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular oncology (Dordrecht)**, v. 39, n. 2, p. 97–106, abr. 2016.

SASIKUMAR, A. N.; PEREZ, W. B.; KINZY, T. G. The Many Roles of the Eukaryotic Elongation Factor 1 Complex. **Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA**, v. 3, n. 4, p. 543–555, jul. 2012.

SCAGGIANTE, B. et al. Dissecting the expression of EEF1A1/2 genes in human prostate cancer cells: the potential of EEF1A2 as a hallmark for prostate transformation and progression. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 1, p. 166–173, jan. 2012.

SHAPPELL, S. B. Clinical Utility of Prostate Carcinoma Molecular Diagnostic Tests. **Reviews in Urology**, v. 10, n. 1, p. 44–69, 2008.

SHEN, M. M.; ABATE-SHEN, C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes & Development**, v. 24, n. 18, p.1967-2000, set. 2010.

SHIN, S.-H. et al. Aberrant expression of CITED2 promotes prostate cancer metastasis by activating the nucleolin-AKT pathway. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4113, dez. 2018.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018: Cancer Statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7–30, jan. 2018.

SINNOTT, J. A. et al. Prognostic Utility of a New mRNA Expression Signature of Gleason Score. **Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 23, n. 1, p. 81–87, 1 jan. 2017.

SOBIN, L.H. et al. TNM classification of malignant tumours, 7. Aufl. Blackwell, Oxford, 2010.

SOEKMADJI, C. et al. Modulation of paracrine signaling by CD9 positive small extracellular vesicles mediates cellular growth of androgen deprived prostate cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 32, p. 52237–52255, 8 ago. 2016.

SZELISKI K. et al. Modern urology perspectives on prostate cancer biomarkers. **Central European Journal of Urology**, v. 71, n. 4, 2018.

TANIGUCHI S. et al. Rat elongation factor 1 alpha: sequence of cDNA from highly metastatic fos transferred cell line. *Nucl Acids Res* 1992; 19:6949

TAYLOR, D. J. et al. Structures of modified eEF2·80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. **The EMBO Journal**, v. 26, n. 9, p. 2421–2431, 2 maio 2007.

THORNTON, S. et al. Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, n. 9, p. 536–548, 1 set. 2003.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012: Global Cancer Statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, mar. 2015.

UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL – UICC. **What is TNM ?**. 2019. Disponível em: <<https://www.uicc.org/resources/tnm>>. Acesso em: 07 jan. 2019.

WAGNER, P. D.; SRIVASTAVA, S. New Paradigms in Translational Science Research in Cancer Biomarkers. **Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 159, n. 4, p. 343–353, abr. 2012.

WANG, F.-B. et al. Prostate cancer antigen 3 moderately improves diagnostic accuracy in Chinese patients undergoing first prostate biopsy. **Asian Journal of Andrology**, v. 19, n. 2, p. 238–243, 2017.

WANG, X. et al. Validation of internal reference genes for relative quantitation studies of gene expression in human laryngeal cancer. **Peerj**, v. 4, e2763, 2016.

WEBBER, M M., BELLO, D., QUADER, S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *The Prostate*, v. 30, n. 1, p. 58–64, 1 Jan. 1997.

WERMUTH, P. J. et al. Existing and novel biomarkers for precision medicine in systemic sclerosis. **Nature Reviews Rheumatology**, 22 mai. 2018.

WOLFF, R. F. et al. A systematic review of randomised controlled trials of radiotherapy for localised prostate cancer. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 16, p. 2345–2367, nov. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 24 set. 2018.

XU, Y. et al. IgG silencing induces apoptosis and suppresses proliferation, migration and invasion in LNCaP prostate cancer cells. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 21, n. 1, p.1-10, dez. 2016.

YANG S. et al. A superexpressão do fator 1 de alongamento eucariótico alfa-2 está associada a pior prognóstico em pacientes com câncer gástrico. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015; 141 (7): 1265–75. Epub 2015/01/21. pmid: 25601347.

YU, S. Q. et al. The diverse and contrasting effects of using human prostate cancer cell lines to study androgen receptor roles in prostate câncer. *Asian Journal of Andrology*, v. 11, p. 39-48, 2009.

YU-LEE, L.-Y. et al. Osteoblast-Secreted Factors Mediate Dormancy of Metastatic Prostate Cancer in the Bone via Activation of the TGF β RIII–p38MAPK–pS249/T252RB Pathway. **Cancer Research**, 7 mar. 2018.

ZHAN, C. et al. Identification of reference genes for qRT-PCR in human lung squamous-cell carcinoma by RNA-Seq. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 4, p. 330–337, abr. 2014.

ZHANG, L. et al. Combining micro-RNA and protein sequencing to detect robust biomarkers for Graves' disease and orbitopathy. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, mai. 2018.

ZHU, G. et al. Inhibition of Proliferation, Invasion, and Migration of Prostate Cancer Cells by Downregulating Elongation Factor-1 α Expression. p. 8, [s.d.].