

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

DAYANNE SILVA BORGES

**EFEITO CELULAR E PERFIL DIAGNÓSTICO DE PEPTÍDEO LIGANTE À
REGIÃO PROMOTORA DO GENE *PCA3* NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2018

DAYANNE SILVA BORGES

**EFEITO CELULAR E PERFIL DIAGNÓSTICO DE PEPTÍDEO LIGANTE À
REGIÃO PROMOTORA DO GENE *PCA3* NO 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**

DAYANNE SILVA BORGES

**Efeito celular e perfil diagnóstico de peptídeo ligante à região promotora do gene
PCA3 no 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.

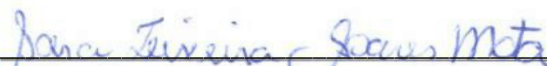
Banca examinadora:



Profa. Dra Thaise Gonçalves de Araújo – UFU
Presidente



Profa. MSc. Mariana Alves Pereira Zóia – UFU
Membro



MSc. Sara Teixeira Soares Mota – UFU
Membro

Patos de Minas - MG, 11 de dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, por sua proteção, pelo seu amor incondicional, pela saúde, coragem e força para atingir todos os meus objetivos. Por ser meu guia e importar com cada detalhe em minha vida! Sem Ele seria impossível superar todos os obstáculos, batalhar para o meu crescimento, execução dos meus deveres e tornar possível a realização de sonhos e metas!

À minha família, meus pais, Edna e Nildo, meus irmãos, Déborah e Daniel, meus avós Maria e Pedro, pelo apoio, incentivo ao ingresso na Universidade Federal de Uberlândia, a participação em eventos e na busca de todos os meus sonhos, como também colaborando para a busca da minha melhor versão como pessoa e estudante. Amo muito todos vocês. Dedico essa conquista e mais essa realização a todos vocês!

Ao meu namorado e meu amor, Murilo, que sempre esteve ao meu lado durante toda essa fase de batalhas e conquistas dentro da Universidade. Obrigada pela compreensão, paciência, pelo enorme apoio, por desejar o meu sucesso e por estar sempre disposto a me ajudar em qualquer fase da minha vida. Obrigada por passar todos os momentos, de perto, ao longo desses sete anos de namoro. O meu amor por você é incalculável!

Ao grupo de pesquisa GBio, por todos os ensinamentos e por conhecer tantos profissionais dedicados e que amam a ciência!

À Adriane, Flávia, Paulinha, Douglas e a todos os outros que me auxiliaram nos experimentos e por sanarem as minhas dúvidas durante os momentos de extrema preocupação e euforia!

A todos os meus colegas, Willow, Leonardo, Pedro, João Lucas e Iara por sempre serem do mesmo grupo de seminários e de estudos, que apesar de todos os percalços todos contribuíram para meu aprendizado tanto profissional quanto pessoal. E aos outros que conheci durante essa caminhada!

Aos meus amigos, Flávia e Willow. À Flávia, por sua dedicação, por todos os momentos que passamos juntas, principalmente em 2018, ano que nossa amizade se tornou sólida. Admiro sua fé e o empenho em tudo que faz, fora e dentro da Universidade, você é uma menina de luz, merece tudo de bom na sua vida! Ao Willow que sempre esteve ao meu lado desde o primeiro período, sem sua ajuda nada teria sido como foi, obrigada por todos os ensinamentos, conselhos, por sofrer junto comigo, por ser meu parceiro de estudo e fechar várias vezes a biblioteca. Muito obrigada pela

amizade e companheirismo de vocês dois. Vou guardar vocês sempre em minha memória e coração! Meu carinho por vocês é imenso!

À minha orientadora maravilhosa, Thaise, a pessoa mais importante para a execução dessa pesquisa! Meu exemplo de pessoa, cientista, professora e orientadora. Obrigada por TUDO que você me ensinou, durante as disciplinas e durante todo o trajeto no GBio, pela paciência, apoio e conselhos. Não sei descrever tamanha gratidão que tenho por você! Parabéns por se dedicar em tudo que faz! Sempre levarei você em meu coração!

À minha coorientadora, Luciana, que sempre me ajudou e ensinou bastante sobre pesquisa e sobre a vida. Obrigada Lu, por toda ajuda nos ELISAs e outros experimentos! Meu carinho por você é enorme!

Ao corpo docente do curso de Biotecnologia. Obrigada por todos os momentos vividos e por todos os ensinamentos! Todos são excelentes profissionais que me orgulho de ter sido aluna!

À Universidade Federal de Uberlândia, onde conquistei a minha maior vitória, a minha graduação em um curso de excelência!

RESUMO

O Câncer de Próstata (CaP) é a segunda maior causa de morte relacionada ao câncer em homens. A inespecificidade do antígeno prostático específico em diagnosticar a doença evidencia a necessidade de novos marcadores e o Gene 3 do Câncer de Próstata (*PCA3*) é expresso especificamente neste órgão, sendo superexpresso no CaP. Apesar de utilizado na prática clínica, seu controle molecular permanece desconhecido. Nesse sentido, utilizamos, previamente, a tecnologia de *Phage Display* para a descoberta de ligantes à região promotora do *PCA3*. Neste estudo, objetivamos avaliar o efeito celular do fago expressando o peptídeo recombinante *PCA3p4* em linhagens prostáticas e sua utilização enquanto ferramenta diagnóstica para o CaP. Os fagos purificados foram utilizados no tratamento das linhagens RWPE-1 (não-tumorigênica), LNCaP (hormônio-responsiva) e PC-3 (hormônio-refratária). Considerando que se trata de um peptídeo que se assemelha a um fator de transcrição, sua capacidade de induzir a proliferação celular foi avaliada por MTT em tratamentos por 24 e 48 horas nos títulos 10^5 , 10^7 e 10^9 . Além disso, foi analisado o perfil do peptídeo enquanto alvo de anticorpos circulantes para o diagnóstico do CaP por ELISA. Após 24 horas, os fagos titulados a 10^5 induziram a proliferação em LNCaP e PC-3, quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Após 48 horas, a proliferação foi verificada apenas em LNCaP com os fagos titulados a 10^7 . Para a RWPE-1 observou-se o efeito antiproliferativo em ambos os tratamentos. Para os ensaios com amostras séricas de pacientes, o peptídeo fusionado à partícula viral diferenciou os pacientes com CaP daqueles com Hiperplasia Prostática Benigna ($p < 0,05$). Além disso, a reatividade sorológica, dentro do grupo CaP, foi superior em pacientes com tumores avançados (Gleason ≥ 7). Nossos resultados abrem novos caminhos na elucidação dos mecanismos regulatórios que controlam o gene *PCA3*, para assim, desenhar possíveis estratégias para o tratamento do CaP.

Palavras-chave: Câncer de Próstata. IncRNA. Peptídeo recombinante. ELISA.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the second leading cancer-related cause of death in men. The non-specificity of prostate-specific antigen in diagnosing the disease evidences the need for new markers. Prostate Cancer Gene 3 (PCA3) is expressed specifically in the prostate, being super expressed in PCa. Although used in clinical practice, its molecular control remains unknown. In this sense, we previously used Phage Display technology to select ligands to the promoter region of PCA3. In this study, we aimed to evaluate the cellular effect of phage particles expressing the recombinant peptide PCA3p4 in prostatic cell lines and its use as a diagnostic tool for PCa. Purified bacteriophages were used in the treatment of RWPE-1 (non-tumorigenic), LNCaP (hormone-responsive) and PC-3 (hormone-refractory) cell lines. Considering that it is a peptide that resembles a transcription factor, its ability to induce cell proliferation was evaluated by MTT in treatments for 24 and 48 hours in titers 10^5 , 10^7 and 10^9 . In addition, the profile of the peptide as a target of circulating antibodies for the diagnosis of PCa by ELISA was analyzed. After 24 hours, the phage titrated at 10^5 induced proliferation in LNCaP and PC-3, when compared to the control ($p < 0.05$). After 48 hours, the proliferation was only verified on LNCaP with phage titrated at 10^7 . For RWPE-1 the antiproliferative effect was observed in both treatments. For the assays with serum samples from patients, the peptide fused to the viral particle differentiated patients with PCa from those with Benign Prostatic Hyperplasia ($p < 0.05$). In addition, the serological reactivity within the PCa group was higher in patients with advanced tumors (Gleason ≥ 7). Our results open new ways in elucidating the regulatory mechanisms that control the PCA3 gene, in order to design possible strategies for the treatment of PCa.

Key words: Prostate Cancer. lncRNA. Recombinant peptide. ELISA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ L: microlitro
ADAR: enzimas adenosinas desaminases dependente de RNA
ADT: terapia de privação androgênica
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
AR: receptor de andrógeno
AUC: área sob a curva
bFGF: fator básico de crescimento de fibroblastos
CaP: câncer de próstata
cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar
DHT: diidrotestosterona
DNA: ácido desoxirribonucleico
EGF: fator de crescimento epidérmico
EGF-R: receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT: transição epitélio-mesênquima
EP: extrato de pituitária
ER- β : receptor de estrógeno β
FBS: soro fetal bovino
FGF-R: receptor de fator de crescimento de fibroblastos
HPB: hiperplasia prostática benigna
HPV-18: vírus do papiloma humano 18
IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
KLK3: calicreína humana 3
LB: meio Luria Bertani
LHRH: hormônio liberador do hormônio luteinizante
lncRNA: RNA longo não codificante
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
ncRNA: RNA não codificante
OPD: o-fenilenodiamina dicloridrato
PBS: tampão fosfato-salino
PCA3: gene 3 do câncer de próstata
PD: *Phage Display*
PDCD: proteínas de morte celular programada
PRUNE2: gene *prune homolog 2*
PSA: antígeno prostático específico
RNA: ácido ribonucleico
ROC: *Receiver Operating Characteristic*
RPMI-1640: *Roswell Park Memorial Institute medium*
SB: solução de bloqueio
SDS: dodecil sulfato de sódio
snRNP: pequena ribonucleoproteína nuclear
ssDNA: DNA fita simples
TCB: tampão carbonato-bicarbonato
TGF- α : fator de transformação do crescimento alfa
TGF- β : fator de transformação do crescimento beta
TNM: tumor, linfonodo, metástase
TR: ultrassonografia transretal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Aspectos gerais relacionados a tumores	11
2.2 A próstata e sua transformação oncogênica.....	13
2.3 Diagnóstico e estadiamento do Câncer de Próstata	15
2.4 Estratégias para o tratamento do Câncer de Próstata.....	17
2.5 Biomarcadores para o câncer de próstata.....	18
2.6 <i>Phage Display</i>	20
2.7 Proteína de morte celular programada (PDCD7).....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Purificação do fago <i>PCA3p4</i>	24
3.2 Cultivo celular.....	25
3.3 Teste de MTT.....	25
3.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em amostras de soro.....	26
3.5 Análises estatísticas	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Proliferação celular mediada pelo fago <i>PCA3p4</i>	28
4.2 Perfil diagnóstico/prognóstico do fago <i>PCA3p4</i>	29
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

O Câncer de Próstata (CaP), também conhecido como doença da terceira idade, é o tumor não-epitelial mais comumente diagnosticado nos homens americanos e brasileiros (CUZICK et al., 2014). Os índices são alarmantes e as chances de cura restritas aos casos diagnosticados precocemente. Muitos estudos têm sido feitos na tentativa de compreender os complexos mecanismos moleculares envolvidos em sua gênese e progressão.

A identificação de RNAs não codificantes (ncRNAs) envolvidos no surgimento e avanço de tumores tem revolucionado a pesquisa e aberto novos caminhos na oncologia molecular. O Gene 3 do Câncer de Próstata (*PCA3*) é expresso especificamente na próstata e apresenta-se superexpresso no CaP em relação aos tecidos com hiperplasia prostática benigna (HPB) e tecidos normais (BOURDOUMIS et al., 2010). A arquitetura molecular desse gene e suas funções-chave no processo maligno sugerem seu papel como um oncogene não codificante (HESSELS; SCHALKEN, 2009). O fato do *PCA3* ser um ncRNA superexpresso no CaP e ser próstata-específico o torna particularmente interessante e crucial na compreensão dessa neoplasia. Sua importância como marcador molecular no diagnóstico do CaP tem sido descrita em amostras biológicas como urina, sangue periférico, biópsias e fluido prostático (KOK et al., 2002; VAN GILS et al., 2005; KLECKA et al., 2010). No entanto o conhecimento acerca das funções deste transcrito no desenvolvimento e na progressão da doença ainda é restrito e sua regulação transcricional permanece desconhecida.

As pesquisas baseadas em *Phage Display* (PD) representam uma área em expansão. Durante o centenário de sua existência, esse método apresentou perspectivas terapêuticas baseadas em biotecnologia, fornecendo moléculas com ampla aplicabilidade clínica, além de permitir a identificação de ligantes envolvidos em processos regulatórios. Essa plataforma se tornou uma das principais na descoberta de novas drogas, além de permitir conhecer as doenças em nível molecular.

De nítida natureza biotecnológica, essa técnica auxilia na descoberta de moléculas que possibilitam a entrega de drogas (fármacos citotóxicos, inibidores de metaloproteases, citocinas) e novos modelos têm sido criados nesse formato. Além disso, é extensivamente utilizada no mapeamento de epítomos identificando interações essenciais em diversas patologias, incluindo o câncer. A habilidade de se isolar

moléculas funcionais a partir de um amplo repertório de bacteriófagos recombinantes torna o PD uma ferramenta poderosa para se encontrar ligantes raros. Descobertas-chave envolvendo diferentes doenças surgiram a partir de estudos *in vitro*, o que evidencia a importância da biotecnologia nos assuntos que se referem à saúde pública.

Nosso grupo de pesquisa selecionou, em estudo anterior (ALVES et al., 2016), um peptídeo recombinante (*PCA3p4*) ligante à região promotora do gene *PCA3* e, por análises de bioinformática, verificou-se que o peptídeo se alinha com a proteína de morte celular programada 7 (*PCDC7*). Sua atividade celular foi presentemente avaliada pelo ensaio de MTT a fim de se definir o perfil proliferativo das linhagens LNCaP, PC-3 e RWPE-1 após tratamento com os fagos expressando o *PCA3p4*. Além disso, testes imunoenzimáticos também permitiram definir o perfil diagnóstico e prognóstico dos peptídeos. Nossos resultados abrem promissores caminhos para a elucidação de vias oncogênicas associadas ao CaP e, por conseguinte, possibilita o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais relacionados a tumores

Câncer é o termo utilizado para designar um extenso grupo de doenças heterogêneas que podem afetar qualquer órgão ou tecido do corpo (KUIJER et al., 2018). É responsável por uma em cada seis mortes no mundo, sendo que mais de 14 milhões de pessoas são diagnosticadas todos os anos. A estimativa para 2030 é de mais de 21 milhões de novos casos (ONUBR, 2017).

Os eventos celulares normais ocorrem ordenadamente, de modo que a proliferação celular nos primeiros anos de vida possibilita o desenvolvimento do indivíduo (ONCOGUIA, 2015). Os proto-oncogenes são genes reguladores que têm como função controlar os eventos de crescimento e divisão de células normais. Os genes supressores de tumor atuam regulando negativamente o ciclo celular ou induzindo apoptose. Modificações nesses genes, portanto, estão diretamente associadas à carcinogênese, uma vez que conduzem à transformação celular maligna (WEBBER; BELLO; QUADER, 1997).

Células malignas possuem a capacidade de se desprenderem da massa tumoral e migrarem para outros sítios, o que não ocorre nas benignas. No processo de migração a disseminação ocorre por meio da corrente sanguínea ou de vasos linfáticos para órgãos distantes do local inicial do tumor, formando as metástases, uma das principais causas de morte por câncer. De modo geral, as células transformadas são menos especializadas nas suas funções e comprometem o funcionamento dos órgãos e tecidos nos quais se estabelecem (ALMEIDA et al., 2005).

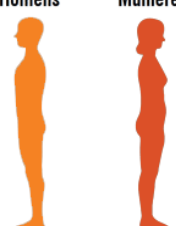
Cerca de 10% dos casos de câncer são hereditários e o restante, aproximadamente 90%, é definido como esporádico (A.C.CAMARGO CANCER CENTER, 2017). No segundo caso, o surgimento da doença depende da intensidade e duração da exposição a agentes causadores que podem ser externos ou internos ao organismo e, em geral, estão interligados. Os fatores externos relacionam-se ao meio ambiente e aos próprios hábitos do indivíduo. Nesse contexto são incluídos os carcinógenos físicos, químicos e biológicos (ANAND et al., 2008).

Os fatores internos são pré-definidos e estão ligados à capacidade do organismo de se defender das agressões ao seu material genético. Nesse sentido, a idade também se apresenta como fator de risco, uma vez que o envelhecimento ocasiona mudanças que aumentam a vulnerabilidade à transformação (FUNDAÇÃO DO CÂNCER, 2011; ANAND et al., 2008).

Como o câncer possui a habilidade de afetar várias regiões do corpo, são definidos muitos subtipos anatômicos e moleculares, os quais direcionam as estratégias clínicas de tratamento (WHO, 2017). Existem mais de 100 tipos que são nomeados de acordo com o seu local de formação. Os principais são: 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 (FUNDAÇÃO DO CÂNCER, 2017).

No Brasil, a neoplasia de maior incidência em homens é o Câncer de Próstata (CaP) e em mulheres o de mama. Para 2018, espera-se cerca de 68 mil novos casos para o CaP e de 59 mil para tumores mamários (Figura 1) (INCA, 2018). Nos EUA, o número estimado é mais de 1,7 milhões de novos casos de câncer e aproximadamente 610 mil mortes pela doença, sendo 4,83% correspondente aos tumores na glândula prostática (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

Figura 1: Estimativa da incidência de câncer na população brasileira para o ano de 2018.

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Mama Feminina	59.700	29,5%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%		Cólon e Reto	18.980	9,4%	
Cólon e Reto	17.380	8,1%		Colo do Útero	16.370	8,1%	
Estômago	13.540	6,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%	
Cavidade Oral	11.200	5,2%		Glândula Tireoide	8.040	4,0%	
Esôfago	8.240	3,8%		Estômago	7.750	3,8%	
Bexiga	6.690	3,1%		Corpo do Útero	6.600	3,3%	
Laringe	6.390	3,0%		Ovário	6.150	3,0%	
Leucemias	5.940	2,8%		Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%	
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%		Leucemias	4.860	2,4%	

Fonte: INCA, 2018.

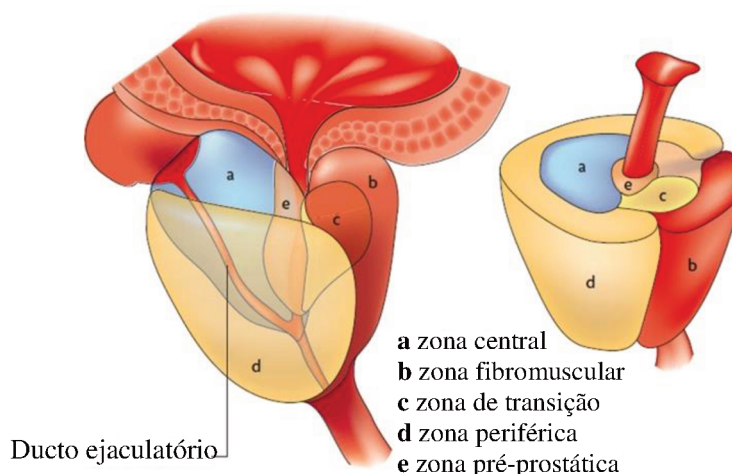
2.2 A próstata e sua transformação oncogênica

O CaP é a neoplasia geniturinária mais comum em homens em todo o mundo (WAN et al., 2016). Representa cerca de 25% dos novos diagnósticos e é a segunda maior causa de morte relacionada ao câncer em homens (XU et al., 2016). Além disso, aproximadamente 62% dos pacientes diagnosticados no mundo apresentam 65 anos de idade ou mais (SBCO, 2017).

A formação da próstata ocorre durante a embriogênese tardia pelo brotamento ductal a partir do seio urogenital. É considerado um evento indutivo e dependente da síntese testicular de androgênio (PRINS; PUTZ, 2008). A próstata é uma estrutura endodérmica masculina localizada abaixo da bexiga, circundando a região cervical da uretra e à frente do reto, sendo responsável pela produção de componentes importantes do fluido seminal (MANNING et al., 2013). Ao redor da glândula há um estroma responsável por produzir fatores de crescimento importantes para o seu desenvolvimento normal e neoplásico, sendo formado por fibroblastos, músculo liso, nervos e vasos linfáticos (CHUNG et al., 2014)

A glândula possui uma estrutura composta por cinco zonas: zona fibromuscular, zona central, zona periférica, zona pré-prostática e zona de transição (Figura 2). Grande parte das lesões ocorre na zona periférica (d) e na zona de transição (c) é detectada a maioria dos casos de Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) (MARZO et al., 2007).

Figura 2: Representação das zonas estruturais da glândula prostática.



Fonte: Adaptado de MARZO et al., 2007.

Em nível histológico a glândula prostática contém um epitélio pseudoestratificado com dois compartimentos: estromal e epitelial. O epitelial possui três tipos celulares diferenciados: luminal, basal e neuroendócrino. As células basais estão localizadas abaixo do epitélio luminal, expressam p63 e citoqueratinas de alto peso molecular como a 5 e a 14. As células luminiais secretam Antígeno Prostático Específico (PSA) e fosfatase ácida prostática. Ao contrário das basais, as luminiais são dependentes de andrógeno e apresentam marcadores como citoqueratinas de baixo peso molecular, incluindo a 8 e a 18 (SHEN; ABATE-SHEN, 2010).

No órgão ocorrem, frequentemente, três tipos de distúrbios: CaP, HPB e prostatite. A prostatite é uma doença inflamatória que pode ser bacteriana (aguda ou crônica), não bacteriana e prostatodinia (OLIVEIRA; AMARAL; FERRAZ, 2005).

A HBP e o CaP são as condições fisiopatológicas mais comuns em homens idosos (PRAJAPATI et al., 2013). A primeira é uma doença não maligna caracterizada pelo aumento benigno da glândula resultante da interrupção da sinalização entre as células epiteliais e as estromais. O crescimento destas células acarreta a interferência no fluxo urinário decorrente da compressão do canal da uretra gerando desconforto e irritabilidade no músculo detrusor da bexiga (BARCLAY et al., 2005). O CaP e a HPB possuem semelhanças em relação ao crescimento dependente de hormônio, à resposta à terapia anti-andrógenos e aos fatores de risco, como inflamação e distúrbios metabólicos. Mais de 80% dos homens com CaP possuem também HBP, porém não há correlação quanto à etiologia. Em ambas, a prevalência é em homens idosos e a

incidência aumenta com a idade (BASU et al., 2015; KIM; LARSON; ANDRIOLE, 2016).

2.3 Diagnóstico e estadiamento do Câncer de Próstata

O diagnóstico e acompanhamento das alterações prostáticas podem ser realizados através do toque retal, dosagem do PSA, ultrassonografia transretal (TR) e biópsia. O toque retal é o método de detecção mais utilizado, porém, limita-se a identificar alterações teciduais apenas nas porções posterior e lateral da próstata. Cerca de 40% a 50% dos tumores permanecem fora do alcance do teste. Podem falhar na identificação de tumores confinados ao órgão, ainda em um estágio curável (BRASIL, 2002; KHANDURI et al, 2017).

O PSA foi descrito primeiramente em 1970 e é considerado um biomarcador útil para detectar o CaP, para avaliar as respostas ao tratamento e para acompanhamento dos pacientes (LIU et al., 2015). O PSA é uma serina protease de 34 KDa pertencente à família das calicreínas, é regulado por androgênio e codificado pelo gene *KLK3* (calicreína humana 3) (PAL et al., 2013). Células epiteliais do tecido normal e tumoral prostático produzem essa proteína, a qual tem como função inibir a coagulação do sêmen, permitindo a movimentação dos espermatozoides (CORIC et al., 2015).

Em situações de anormalidade, o PSA cai na circulação sanguínea e tem seus níveis séricos aumentados. Porém, essa elevação não ocorre somente em situações de malignidade, mas em outras alterações como na HPB e prostatite (RIFFENBURGH; AMLING, 2003).

Quando há irregularidades no toque retal e/ou na dosagem do PSA é realizada a biópsia. Durante esse procedimento utiliza-se a ultrassonografia transretal para mapear as regiões do órgão e para guiar as agulhas. O exame de TR é capaz de detectar tumores na zona periférica da glândula (LOPES et al., 2015; YACOUB et al., 2012).

Após a biópsia e confirmação do tumor, realiza-se um estudo patológico do tecido prostático para a definição do tipo histológico e grau de diferenciação celular, os quais impactam no prognóstico da doença e na escolha do melhor tratamento para o paciente. Os sistemas utilizados para classificar o CaP são o estadiamento e o Escore de Gleason (INCA, 2017; FILHO; DAMIÃO, 2010).

O estadiamento é utilizado para descrever a localização do tumor, sua disseminação e o comprometimento de outros órgãos (ONCOGUIA, 2017). Existem

dois tipos: o clínico e o patológico. No primeiro há uma estimativa da extensão da doença com base nos resultados dos exames realizados pelo paciente. No segundo a extensão da doença é determinada com maior precisão ao considerar a análise da peça cirúrgica (INCA, 2018).

Para o CaP o sistema de estadiamento mais utilizado é o sistema TNM (do inglês *Tumor Node Metastasis* - tumor, linfonodo, metástase-), da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Tabela 1). Para esta neoplasia, os critérios utilizados pelo TNM são: extensão do tumor primário (T); se ocorreu disseminação do tumor para os linfonodos próximos (N); ausência ou presença de metástases à distância (M), além dos níveis do PSA e pontuação de Gleason (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Tabela 1: Classificação *Tumor Node Metastasis* (TNM) para o Câncer de Próstata.

T- Tumor primário	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência do tumor primário
T1	Tumor clinicamente não palpável ou visível por método de imagem
T1a	Tumor incidental- achado histopatológico em $\leq 5\%$ do tecido de ressecção
T1b	Tumor incidental- achado histopatológico em $> 5\%$ do tecido de ressecção
T1c	Tumor identificado por biópsia por agulha (PSA elevado)
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor engloba metade de um dos lobos ou menos
T2b	Tumor engloba mais da metade de um lobo, mas não os dois
T2c	Tumor engloba ambos os lobos
T3	Tumor além da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (unilateral ou bilateral)
T3b	Tumor envolve a vesícula seminal (uma ou ambas)
T4	Tumor fixo ou invade estruturas adjacentes além das vesículas seminais: colo vesical, esfíncter externo, reto, músculos elevadores ou parede pélvica
N- Envolvimento linfonodal regional	
Nx	Linfonodos regionais não avaliados
N0	Sem metástases para linfonodos regionais
N1	Metástases linfonodais regionais
M- Metástases a distância	
Mx	Metástases a distância não avaliadas
M0	Ausência de metástase a distância
M1	Metástase a distância
	M1a- Linfonodos não regionais
	M1b- Ossos
	M1c- Outros órgãos

Fonte: Adaptado de FILHO; DAMIÃO, 2010.

Desde a década de 60, o *Escore de Gleason* é o principal sistema de graduação histopatológica para o CaP. Este método permite a identificação de características como: extensão do tumor, agressividade biológica e ocorrência de metástases com base nos diferentes padrões, variando de 1 a 5. Clinicamente, diante da heterogeneidade dos tumores, o escore baseia-se no somatório dos dois padrões mais frequentemente observados nas lesões variando de 2 a 10 (EPSTEIN et al., 2016; SINNOTT et al., 2016).

Os escores de 2 a 4 representam as neoplasias bem diferenciadas com um crescimento mais lento e baixo risco metastático. Quando de 5 a 6 são moderadamente diferenciados e de 7 a 10 são indiferenciados e agressivos (CALVETE et al., 2003). Dessa forma, a busca de novos métodos de diagnóstico precoce é indispensável, pois quando o tumor é descoberto em estágio inicial há maiores chances de cura.

2.4 Estratégias para o tratamento do Câncer de Próstata

Após a confirmação do diagnóstico, os regimes de tratamento para o CaP dependem do perfil da doença (localizada ou metastática) e da presença de comorbidades. Dentre as estratégias adotadas destacam-se prostatectomia, radioterapia, hormonoterapia, orquiectomia e quimioterapia (TONON; SCHOFFEN, 2009).

A prostatectomia consiste em um processo cirúrgico que remove parcialmente ou completamente a próstata. Esse procedimento é realizado quando o fluxo urinário é afetado com o aumento do volume do tumor (DENMEADE; ISAACS, 2002).

A radioterapia pode ser aplicada externamente ou internamente. Na primeira, é adotado um feixe de radiação, geralmente raios X, com a função de impedir o crescimento das células transformadas. Já a radioterapia intersticial ou braquiterapia, baseia-se no implante de sementes radioativas dentro da glândula. Apresenta uma maior eficiência, porém pode causar impotência sexual e incontinência urinária (VIANI; STEFANO; AFONSO, 2009; SHEN; ABATE-SHEN, 2010).

Pacientes que necessitam de um cuidado especial são submetidos ao monitoramento da progressão clínica da doença para evitar intervenções desnecessárias. Nesse cenário, define-se a observação vigilante, geralmente aplicada a idosos com comorbidade significativa. Já homens que foram diagnosticados e apresentam câncer de baixo risco, assintomáticos ou com poucos sintomas, adota-se a vigilância ativa, a qual é baseada na contínua dosagem dos níveis de PSA, biópsias repetidas e, em alguns

casos, rastreio de biomarcadores (HEIDENREICH et al., 2011; TEFEKLI; TUNC, 2013).

A hormonioterapia induz à apoptose as células tumorais retardando a progressão do adenocarcinoma, com a ablação de testosterona e diidrotestosterona (DHT), hormônios responsáveis pela proliferação celular na próstata. A terapia de privação androgênica (ADT) pode ser realizada por castração química com análogos do Hormônio Liberador de Hormônio Luteinizante (LHRH), estrógenos e antiandrógenos. Outra metodologia adotada para a diminuição da testosterona no organismo é a orquiectomia bilateral, cirurgia para a remoção dos testículos, órgão responsável pela maior produção deste andrógeno (MONTEIRO, 2006; NYQUIST; DEHM, 2013).

A quimioterapia baseia-se na utilização de medicamentos citotóxicos como Docetaxel, Cabazitaxel, Mitoxantrona e Estramustina, que visam a destruição do tumor e seus metabólitos para o aumento da sobrevida, redução dos sintomas e consequente melhoria da qualidade de vida (ONCOGUIA, 2017). A adversidade da quimioterapia é a não discriminação entre células saudáveis e malignas, ocasionando numerosos efeitos colaterais (PACHNICKI et al., 2012).

Portanto, apesar dos avanços médicos e tecnológicos, ainda se torna necessária a caracterização de um diagnóstico específico e de um tratamento efetivo (WANG; LIU; YAO, 2014). A identificação de novos biomarcadores surge como uma alternativa para o direcionamento não só terapêutico, mas também para a elucidação de processos regulatórios-chave em tumores prostáticos (DENG et al., 2017).

2.5 Biomarcadores para o câncer de próstata

Durante a carcinogênese são produzidos biomarcadores, definidos como moléculas específicas associadas ao tumor, como metabólitos e proteínas, além de células tumorais circulantes e RNAs não codificantes (ncRNA). Estes desempenham um papel crucial na regulação da malignidade (DENG et al., 2017).

A dosagem de PSA é amplamente utilizada como um teste de triagem inicial para o CaP e como monitoramento da resposta ao tratamento, contudo, questionado quanto à sua especificidade (BOO et al., 2015). Nesse contexto, é necessário o estudo de novos biomarcadores que sejam capazes de diagnosticar precisamente o CaP, além de permitir seu acompanhamento e direcionar as estratégias terapêuticas (PANG et al., 2017).

Os RNAs longos não codificantes (lncRNAs) são expressos em várias doenças humanas, inclusive no câncer, atuando em mecanismos como o silenciamento epigenético e regulação transcricional. Suas funções oncogênicas ou supressoras de tumores os correlacionam diretamente com a patogênese de várias neoplasias, incluindo colorretal, de rim, de mama, endometrial, testicular, de próstata e hematológicas (PRENSNER; CHINNAIYAN, 2011; SMOLLE et al., 2017).

Bussemakers e seus colaboradores (1999) descreveram o Gene 3 do Câncer de Próstata (*PCA3*) como um marcador específico desse tumor. Trata-se de um lncRNA, localizado no cromossomo 9q21-22 em orientação *antisense* em relação ao gene *Prune Homolog 2 (PRUNE2)* (HESSELS et al., 2003). O gene *PCA3* apresenta quatro éxons e três íntrons, além de variantes de *splicing* do éxon 2 e diversos sítios de poliadenilação. Os éxons 1, 3, 4a e 4b estão presentes em 65% dos seus transcritos (WANG; LIU; YAO, 2014).

A expressão do *PCA3* correlaciona-se diretamente à sinalização androgênica (hormônio-dependente) estando superexpresso em mais de 95% dos casos de CaP (FERREIRA et al., 2012). Seus transcritos são rotineiramente detectados na urina após a massagem prostática ou exame de toque retal (PROGENSA, Gen-Probe, San Diego, CA) (QIU et al., 2013). Este teste molecular foi aprovado em 2002 pela *Food and Drug Administration* (STEPHAN; RALLA; JUNG, 2014) e é indicado para homens com idade igual ou superior a 50 anos que tiveram uma ou mais biópsias anteriores negativas (MCGRATH et al., 2016).

O *PCA3* encontra-se envolvido no controle da sobrevivência de células neoplásicas da próstata, bem como na regulação hormonal via receptor de andrógeno (AR) e na modulação da transição epitélio-mesênquima (EMT) (SMOLLE et al., 2017). Ademais, controla a expressão de importantes genes envolvidos em diferentes vias como a angiogênese (Fator A de crescimento vascular endotelial –VEGFA); adesão celular (proteína 1 supressora de metástase-MTSS1 e integrina β -1-ITGB1); transdução de sinal (receptor proteico tirosina-quinase-ERBB2; subunidade α reguladora de fosfatidilinositol 3-quinase-PIK3R1; proteína quinase-1 ativada por mitógeno-MAP2K1) e apoptose (Bcl-2) (LEMOS et al., 2016). Considerando seu papel regulatório, o gene *PCA3* coordena a edição do RNA longo heterogêneo do gene supressor de tumor *PRUNE2* (SALAMEH, 2015).

Mesmo sendo considerado um biomarcador específico para CaP, ainda se torna crucial elucidar a atuação do *PCA3* na biologia do adenocarcinoma prostático e na

progressão tumoral (FERREIRA et al., 2012). Portanto, compreender o funcionamento molecular do *PCA3* torna-se primordial, uma vez que permitirá esclarecer a biologia do CaP e desenvolver novas alternativas para o tratamento dessa doença.

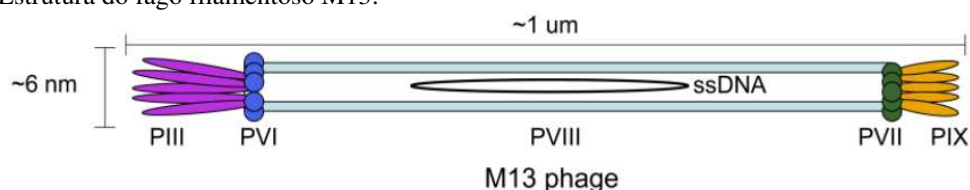
2.6 Phage Display

O Phage Display (PD) é uma técnica de genômica funcional descrita pela primeira vez por Smith em 1985, embasando as pesquisas que receberam o Prêmio Nobel de Química em 2018 (THE NOBEL PRIZE, 2018). Consiste na utilização de vetores, os bacteriófagos (fagos), para codificação e apresentação de polipeptídeos fusionados às proteínas do capsídeo, sem alteração da capacidade infectante para a propagação viral. A metodologia envolve o rastreamento de alvos, permitindo a busca por ligantes específicos (KRUMPE; MORI, 2006; HAMZEH-MIVEHROUD, 2013).

Os fagos filamentosos são os vetores mais utilizados no processo de clonagem e expressão de peptídeos/proteínas, devido à sua simplicidade estrutural e genômica (TAN et al., 2016). Possuem a capacidade de infectar organismos procariotos, principalmente *Escherichia coli*, através do *pilus* conjugativo, codificado pelo plasmídeo F e que atua como um receptor para infecção (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

Os fagos filamentosos mais utilizados no PD pertencem à família *Inoviridae*, o principal representante é o fago M13, constituído por um DNA fita simples (ssDNA) circular com 6407 nucleotídeos. Seu capsídeo é envolvido por 2700-3000 cópias da proteína pVIII e cinco cópias de cada uma das quatro proteínas (pIX, pVII, pVI, pIII), presentes em suas extremidades (Figura 3). Na tecnologia de PD, as mais utilizadas são a pIII e a pVIII (TAN et al., 2016).

Figura 3: Estrutura do fago filamentosos M13.



Fonte: TAN et al., 2016.

O ciclo de reprodução dos fagos, em geral, pode ocorrer de duas formas: lisogênico ou lítico. No ciclo lisogênico, o fago infecta e se mantém em estado de

latência, incorporando seu DNA ao genoma da bactéria. Desse modo, o material genético do vírus é replicado juntamente com o do hospedeiro. No ciclo lítico, a produção de novas partículas virais culmina com a lise bacteriana (WEINBAUER, 2004). O M13, utilizado no PD, não possui ciclo lítico, causando apenas um decréscimo na taxa de crescimento das bactérias infectadas (TAN et al., 2016).

Esses vírus lisogênicos possuem sítios de clonagem que permitem a inserção de genes que codificam cadeias leves e pesadas de anticorpos (ARAÚJO et al., 2014), pequenos peptídeos (AINA et al., 2002), bibliotecas de DNA complementar (cDNA) (HUFTON et al., 1999), enzimas, fatores de transcrição, citocinas e domínios extracelulares de receptores (TAN et al., 2016). Os peptídeos fusionados às proteínas virais também são utilizados no desenvolvimento de vacinas, na inibição de enzimas, na modulação da resposta imunológica, para o tratamento de diferentes patologias, incluindo o câncer (DEUTSCHER, 2010).

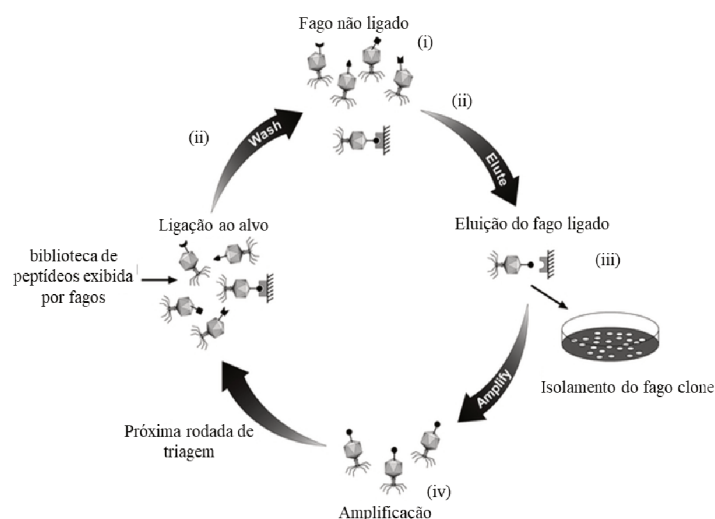
A síntese das proteínas do capsídeo ocorre no citoplasma das células hospedeiras, sendo posteriormente direcionadas à região do periplasma, local em que ocorre a montagem e liberação das novas partículas virais. Fusionados às proteínas do capsídeo encontram-se os peptídeos cuja sequência de DNA é inserida na região de restrição próxima ao gene que codifica para a pIII. Como a inserção ocorre na porção N-terminal não há comprometimento da montagem do vírus (BENHAR, 2001; HUFTON et al., 1999). O inserto é incorporado nas novas partículas virais amplificadas a partir da bactéria infectada. Assim, a sequência exógena é expressa juntamente com a proteína viral, deixando-a disponível para interagir com alvos específicos (SHEEHAN; MARASCO, 2015).

Portanto, há uma relação direta entre o fenótipo exibido e o genótipo encapsidado, o que facilita a caracterização, seleção e identificação dos peptídeos selecionados (HAMZEH-MIVEHROUD et al., 2013). Estes podem se ligar a diversos alvos biológicos, tais como anticorpos, receptores, enzimas, moléculas de adesão e ácidos nucleicos (KELLY et al., 2008; CHOI et al., 2008; CHAN et al., 2014; BRATKOVIC, 2010; MOLEK; STRUKELJ; BRATKOVIC, 2011).

Para isso são utilizadas bibliotecas que apresentam de 10^6 a 10^{11} variantes (peptídeos), submetidas a um processo conhecido como biosseleção ou *biopanning*, que pode ser realizado tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esse procedimento é executado em quatro etapas: a ligação dos fagos a um alvo pré-determinado, a lavagem dos não específicos, recuperação ou eluição dos ligantes e, finalmente, a amplificação em

Escherichia coli para aumentar o número de cópias dos fagos de interesse (Figura 4). Cada ciclo é, em geral, repetido de três a cinco vezes (NIXON; SEXTON; LADNER, 2014; TAN et al., 2016).

Figura 4: Representação das etapas do *biopanning*. Este é constituído por quatro etapas: (i) exposição da biblioteca ao alvo para a captura dos recombinantes, (ii) remoção dos fagos não-ligantes por sucessivas lavagens, (iii) eluição dos fagos que se ligaram ao alvo e (iv) estes são amplificados ao infectarem cepas de *E. coli*.



Fonte: Adaptado de KRUMPE; MORI, 2006.

Em tumores, o PD é utilizado para selecionar peptídeos específicos e com alta seletividade a diferentes alvos em células transformadas (RASMUSSEN et al., 2002). Dentre os ensaios já realizados destacam-se aqueles voltados para a produção de anticorpos monoclonais como estratégia de tratamento e direcionamento de drogas (VISPO et al., 2016; RUOSLAHTI, 2017; XING et al., 2018) e para a identificação de peptídeos miméticos a moléculas específicas em câncer de próstata e testículo (FOSSA et al., 2004).

2.7 Proteína de morte celular programada (PDCD7)

No ano de 1999, Park e colaboradores identificaram e caracterizaram, *in vitro*, o transcrito ES18 em células-tronco embrionárias murinas utilizando uma biblioteca de cDNA. O ES18 se mostrou superexpresso nos linfonodos, timo e testículos analisados. Atualmente, é conhecido por HES18 ou PDCD7, pertencendo a um grupo de genes codificadores de proteínas de morte celular programada (PDCD), incluindo PDCD1, PDCD4 e PDCD5 (PENG et al., 2018).

O gene PDCD7 localiza-se no cromossomo 15q22.31 sendo composto por cinco éxons. Em sua proteína são encontrados os aminoácidos ácido glutâmico, prolina e leucina; interagindo com a pequena ribonucleoproteína nuclear (snRNP) U11, componente do spliceossomo (WILL et al., 2004; LEVINE; DURBIN, 2001). Apresenta o motivo LXXLL, característico de fatores de transcrição sinalizadoras de localização nuclear (PARK et al., 1999).

Quando superexpressa há o aumento do índice apoptótico de células T (PARK et al., 1999; PENG et al., 2018). Em tumores a expressão de PDCD7 já foi relacionada à diminuição da proliferação e migração celular em câncer de cabeça e pescoço, assim como à agressividade e pior prognóstico para pacientes com leucemia mieloide aguda (TIAN et al., 2014). Portanto, compreender o funcionamento molecular mediado por PDCD7 se mostra crucial na biologia tumoral, uma vez que não há informações sobre seu papel no CaP.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito modulatório do fago mimético *PCA3p4* nas linhagens tumorais prostáticas LNCaP (hormônio-dependente) e PC-3 (hormônio-independente) e seu potencial diagnóstico/prognóstico no Câncer de Próstata.

Objetivos específicos

- Cultivar as linhagens tumorais prostáticas LNCaP e PC-3 e a não tumorigênica RWPE-1;
- Purificar o fago *PCA3p4*;
- Tratar as linhagens com diferentes títulos virais e determinar o efeito proliferativo do fago *PCA3p4* frente às células cultivadas;
- Definir o potencial do fago *PCA3p4* como estratégia para o diagnóstico e ou prognóstica do Câncer de Próstata.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Purificação do fago *PCA3p4*

Para a amplificação do fago *PCA3p4*, 20 mL de meio Luria Bertani (LB) suplementado com 20mg/ml de tetraciclina foi infectado com uma colônia isolada de *E. coli* ER2738. Este meio foi mantido a 37°C a 230 rpm por aproximadamente 250 minutos até atingir a densidade ótica DO600nm=0,3. Após esse período, inoculou-se 10µL do estoque de fagos sob a mesma agitação a 37 °C por 16 horas.

Posteriormente, as partículas virais foram purificadas conforme os seguintes passos: (i) a cultura anteriormente crescida foi centrifugada (Hermle) a 10000 rpm a 4 °C por 10 minutos; (ii) o sobrenadante foi recolhido em um novo tubo no qual foi adicionado uma solução de PEG/NaCl 2,5 M (1/6 do volume de meio utilizado), mantido a 4°C por 16 horas; (iii) no dia seguinte, o tubo contendo sobrenadante de fagos e PEG/NaCl 2,5 M foi centrifugado a 4 °C por 15 minutos a 10000 rpm; (iv) coletou-se o precipitado, sobre o qual foi adicionado Tampão fosfato-salino (PBS) 1X para sua homogeneização, seguida de nova centrifugação a 4 °C por 10 minutos a 14000 rpm; (v) o homogenato foi transferido para novo microtubo e foi adicionado 166,67 µl de PEG/NaCl 2,5 M com incubação por 4 °C por 1 hora; (vi) centrifugou-se a 4 °C por 10 minutos a 14000 rpm; (vii) o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100 µL de PBS 1X para homogeneização do precipitado; (viii) estocagem a 4 °C. Para a quantificação do título viral as leituras no espectrofotômetro (PG Instruments) foram realizadas em 269nm e 320nm e foi utilizada a fórmula (F1).

(F1)

$$Partículas\ virais/\mu l = \frac{(A_{269nm}) - (A_{320nm})}{7222} \times 6 \times 10^{16}$$

A= Absorbância em espectrofotômetro

3.2 Cultivo celular

Para a realização dos experimentos *in vitro* as três linhagens celulares prostáticas foram mantidas em garrafas de cultura, incubadas a 37 °C com 5 % de CO₂. A linhagem RWPE-1 (não tumorigênica) foi usada como controle nas análises. Seu cultivo foi em *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) (Gibco), suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) (Gibco) e 1 µL/mL de gentamicina (Cultilab) e enriquecido com 5 ng/mL fator de crescimento epidérmico (EGF) (Gibco) e 0,05 ng/mL de extrato de pituitária (EP) (Gibco). As linhagens LNCaP (hormônio-responsiva) e PC-3 (hormônio-refratária) foram cultivadas em *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI-1640) (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB e 1 µL/mL de gentamicina (Cultilab). O meio de cultura foi trocado em dias alternados até que as células atingissem 80 % de confluência.

3.3 Teste de MTT

A fim de avaliar a atividade proliferativa mediada pelo fago *PCA3p4* foi realizado o teste de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). Após atingirem 80 % de confluência, as células foram tripsinizadas, centrifugadas por 5 min a 1.000 rpm e ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura completo. Após contagem em Câmara de Neubauer pelo teste de exclusão do azul de tripan, foram utilizadas no experimento 10⁴ células/poço. O plaqueamento foi feito em uma placa de 96 poços com meio de cultura completo, mantida a 37 °C e 5 % CO₂.

No dia seguinte, foi realizado o tratamento com diferentes titulações de fagos (10⁵, 10⁷ e 10⁹ fagos/poço). O experimento foi conduzido em 24 e 48 horas. Após esses períodos, adicionou-se 20 µl de MTT a 5mg/mL, mantido por 4 horas, quando então foram adicionados 50 µl de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20 % /N-dimetilformamida 50%, mantida por 16 horas.

Após essa incubação, as amostras foram lidas a 570 nm em leitora Thermo Plate, TP-Reader. Os cálculos de viabilidade celular foram realizados utilizando a fórmula F2. (F2). Os valores obtidos para o tratamento com o fago *PCA3p4* foram normalizados com as leituras referentes ao fago selvagem (sem peptídeo fusionado à pIII). Poços com células não tratadas foram utilizadas como controle do experimento.

(F2)

$$\text{Razão normalizada (\%)} = \frac{\text{AP4/MCP4}}{\text{AS/MCS}} \times 100$$

AP4 = Média da absorbância em nm do fago *PCA3p4*

MCP4 = Média da absorbância do controle do fago *PCA3p4*

AS = Média da absorbância em nm do fago selvagem

MCS = Média da absorbância do controle do fago selvagem

3.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA) em amostras de soro

A análise do perfil do peptídeo como alvo de anticorpos circulantes, em amostras de soro foi realizada pelo teste de ELISA. Foram avaliadas 67 amostras sorológicas, sendo 37 de pacientes com CaP, 20 com HPB e 10 pacientes saudáveis. As características dos pacientes utilizados estão descritas na Tabela 1.

Para o ELISA, Placas Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 10^{11} fagos diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (TCB) (1 M Na_2CO_3 , 1 M NaHCO_3) por 16 horas a 4 °C. Os poços sem fagos foram sensibilizados com a solução de bloqueio (SB) TCB-Leite em pó desnatado 2%. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com o tampão PBS-Tween 0,1% com posterior adição de bloqueio. Procedeu-se a incubação por 1h a 37 °C sendo as placas posteriormente lavadas com PBS-Tween 0,1% por cinco vezes. Adicionou-se as amostras de soro diluídas 1:100 em SB mantidas por 1h a 37 °C. Novamente, as placas foram lavadas por cinco vezes com o tampão PBS-Tween 0,1% para então ser adicionado o anticorpo Anti-IgG marcado com peroxidase diluído 1:5000 em SB. Após incubação por 1h a 37 °C, as placas foram lavadas por cinco vezes com tampão PBS-Tween 0,1% e reveladas com o-fenilenodiamina dicloridrato (OPD) diluído em tampão citrato (0,03 M $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, 0,098 M Na_2HPO_4) (pH= 5) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A leitura foi realizada em leitora de microplaca (Robonik) a 492 nm.

Tabela 1: Características dos pacientes

Características	CaP		HPB	
	Nº.	%	Nº.	%
Idade (ano)				
Média \pm DP	67,88 \pm 8,45		63,78 \pm 8,79	
Mediana (intervalo)	67 (50-85)		64,5 (47-76)	
<65	11	42,3	9	50
\geq 65	15	57,7	9	50
PSA (ng/mL)				
Média \pm DP	19,38 \pm 41		8,77 \pm 6,56	
Mediana (intervalo)	7,3 (0,3-202,2)		6,09 (2,1-24,6)	
<10	15	65,2	10	66,7
\geq 10	8	34,8	5	33,3
Gleason score				
<7	14	58,3		
\geq 7	10	41,7		
TNM				
pT1	2	11,1		
pT2	14	77,8		
pT3	2	11,1		

DP= desvio padrão

3.5 Análises estatísticas

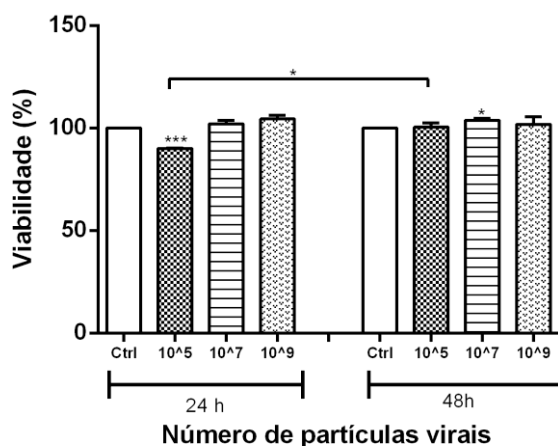
Os dados obtidos foram analisados pelo software GraphPad Prism 7.0. Para os ensaios foi utilizado o teste ANOVA com múltiplas comparações. Foi calculada a Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e área sob a curva (AUC) visando estimar a eficácia de um marcador discriminativo. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Proliferação celular mediada pelo fago *PCA3p4*

O ensaio de proliferação celular foi realizado utilizando o método de MTT com as três linhagens celulares prostáticas, LNCaP, PC-3 e RWPE-1, visando avaliar o efeito do fago *PCA3p4* sobre as células prostáticas. Após 48 horas de tratamento, os recombinantes titulados a 10^7 fagos/poço aumentaram a viabilidade celular na linhagem LNCaP (Figura 1), quando comparadas ao controle sem tratamento. Comparando-se os tempos de tratamento, o título 10^5 induziu menos a proliferação após 24 horas, em relação a 48 horas ($p < 0,05$).

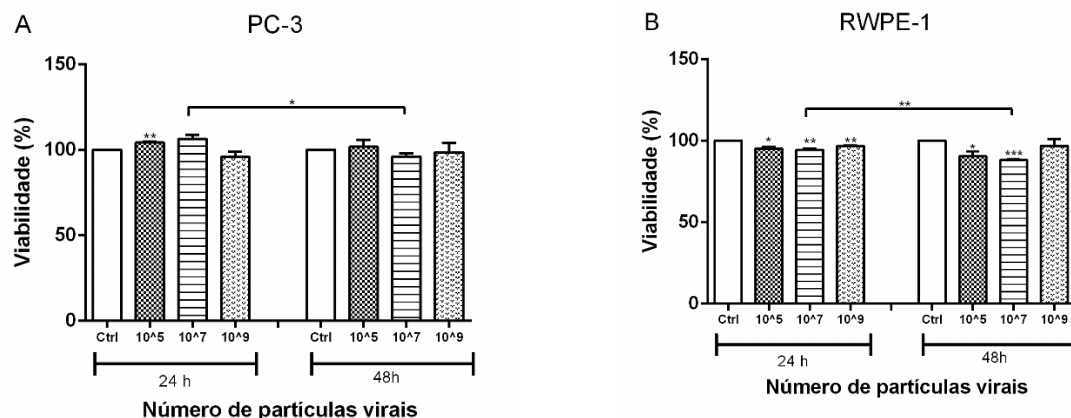
Figura 1: Ensaio de MTT em modelo celular para câncer de próstata hormônio-dependente (LNCaP). Os experimentos foram conduzidos após 24 e 48 horas de tratamento e os valores normalizados com os obtidos para o fago não-recombinante. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).



Após 24h de tratamento, os recombinantes titulados a 10^5 fagos/poço aumentaram a viabilidade celular da linhagem PC-3 quando comparados ao controle sem tratamento ($p < 0,001$) (Figura 2A). Quando comparado a 48 horas, o título 10^7 induziu menos a proliferação do que após 24 horas, ($p < 0,05$).

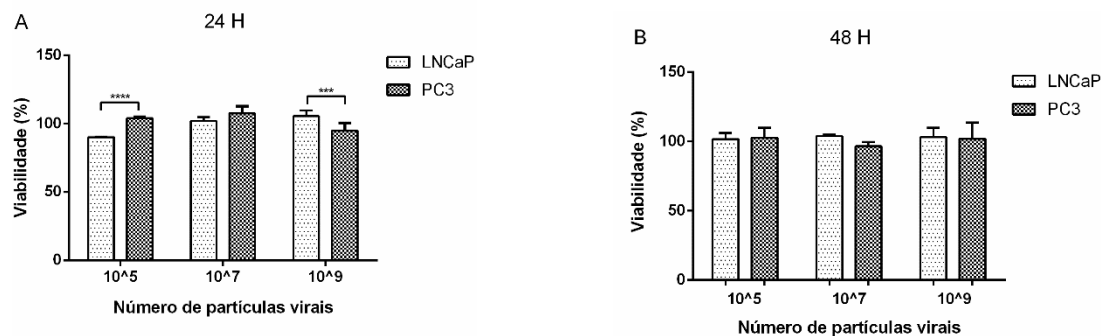
Já para a RWPE-1 não foi verificado efeito proliferativo e sim uma redução na viabilidade das células quando estas foram tratadas com os vírus titulados a 10^5 e 10^7 , por 24 e 48 horas (Figura 2B). Sendo que, a 10^7 a inibição foi maior após 48 horas.

Figura 2: Ensaio de MTT em modelo celular para câncer de próstata hormônio-independente (PC-3) e células não tumorigênicas (RWPE-1). Em (A) tratamento com o fago recombinante *PCA3p4* em PC-3 e em (B) em RWPE-1. Os experimentos foram conduzidos após 24 e 48 horas de tratamento e os valores normalizados com os obtidos para o fago não-recombinante. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).



Ao compararmos os dois modelos de CaP, em 24 horas de tratamento, a titulação 10^5 induziu a maior proliferação de PC-3 quando comparada à LNCaP ($p < 0,05$). Quando tratadas com fagos titulados a 10^9 a maior proliferação foi observada em LNCaP ($p < 0,05$) (Figura 3A). Para 48 horas os resultados comparativos não se mostraram significativos (Figura 3B).

Figura 3: Análise comparativa do efeito proliferativo do fago recombinante *PCA3p4* sobre as linhagens tumorais prostáticas LNCaP (hormônio-dependente) com suplementação e PC-3 (hormônio-independente). Em (A) tratamento por 24 horas e em (B) por 48 horas. (***) $p < 0,001$.

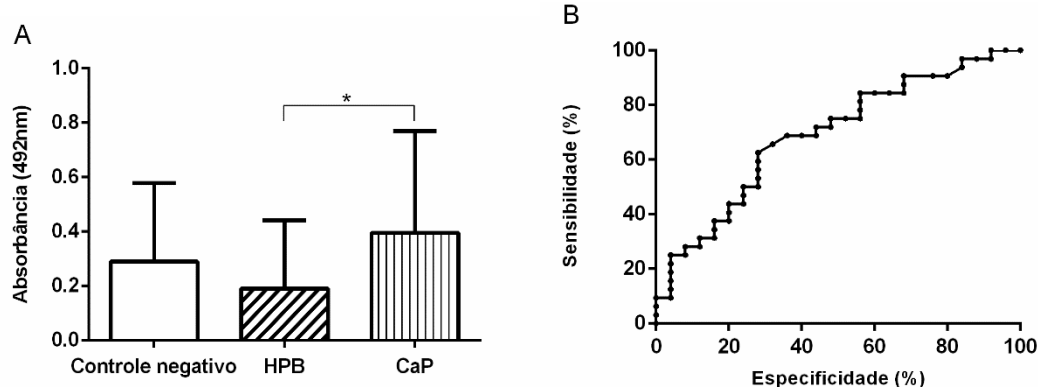


4. 2 Perfil diagnóstico/prognóstico do fago *PCA3p4*

A fim de se definir seu comportamento enquanto molécula diagnóstica, o fago *PCA3p4* foi utilizado em ensaios de ELISA com soro de pacientes com CaP ($0,30 \pm 0,38$), HPB ($0,27 \pm 0,27$) e de indivíduos saudáveis ($0,29 \pm 0,29$) (Figura 4). O fago *PCA3p4* conseguiu diferenciar os pacientes com CaP daqueles com HPB (* $p < 0,05$)

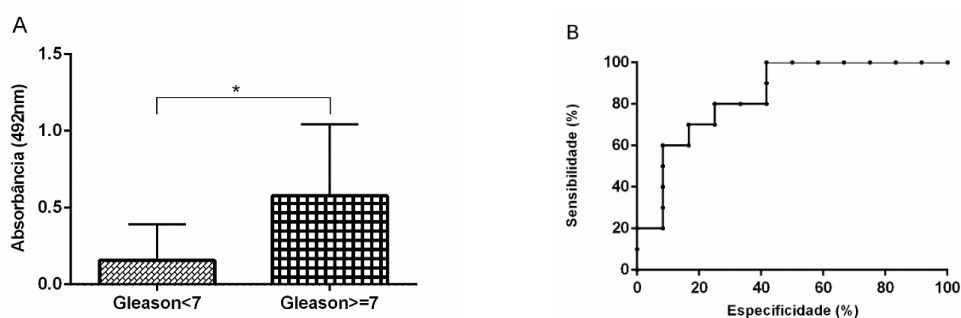
(Figura 4A). A curva ROC foi construída, apresentando $AUC=0,69$ ($p=0,014$) (Figura 4B).

Figura 4: Ensaio imunoenzimático em amostras séricas de pacientes com Câncer de Próstata (CaP), Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) e indivíduos saudáveis. Em (A) a absorbância dos anticorpos circulantes dos pacientes ao peptídeo recombinante *PCA3p4*. Em (B) gráfico representativo da Curva ROC (CaP x HPB) referente ao Fago *PCA3p4*. * $p<0,05$.



Analisando apenas os pacientes com CaP e visando correlacionar a reatividade sérica ao peptídeo *PCA3p4* com a agressividade da doença, os pacientes foram categorizados conforme o Escore de Gleason (Figura 5), em Gleason <7 ($0,15 \pm 0,22$) e Gleason ≥ 7 ($0,58 \pm 0,46$). Interessantemente, houve uma maior absorbância no grupo de pacientes que apresentavam Gleason ≥ 7 (* $p<0,05$), sugerindo o valor prognóstico do PDCD7 no CaP (Figura 5A). Novamente a curva ROC foi construída e o peptídeo apresentou significativa capacidade em discriminar pacientes com CaP avançado daqueles com a doença inicial (Figura 5B). A AUC foi de 0,84 e $p=0.0069$.

Figura 5: Ensaio imunoenzimático em amostras séricas de pacientes com Câncer de Próstata Em (A) a absorbância dos anticorpos circulantes dos pacientes com CaP categorizados conforme o Escore de Gleason ao peptídeo recombinante *PCA3p4*. Em (B) gráfico representativo da Curva ROC predizendo o valor discriminatório do fago *PCA3p4*. * $p<0,05$.



5 DISCUSSÃO

Definido como um oncogene, estudos correlacionando o gene *PCA3* ao diagnóstico do CaP (WANG et al., 2017; CUI et al., 2016; HESSELS et al., 2003; HESSELS; SCHALKEN, 2009), à previsão do resultado da biópsia da próstata (DERAS et al., 2008) e às características patológicas da doença (NEVES et al., 2013) descrevem sua importância enquanto ferramenta clínica. Contudo, especial atenção tem sido dedicada ao seu funcionamento molecular. O gene *PCA3* encontra-se envolvido com a sobrevivência e proliferação de células tumorais prostáticas, modulando a sinalização do AR (FERREIRA et al., 2012; RUSSEL et al., 2018).

Além disso, o *PCA3* regula genes envolvidos no processo de EMT. Neste, as células são reguladas negativamente para marcadores epiteliais, como citoqueratina 18, e positivamente para os marcadores mesenquimais, como vimentina (LEMOS et al., 2016). Conseqüentemente, as células malignas se desprendem do local primário por perder a interação célula-célula, invadindo tecidos adjacentes e causando as metástases (FORONI et al., 2012).

Salienta-se ainda que o *PCA3* regula a expressão do supressor de tumor *PRUNE2* através da formação do complexo *PCA3* e o RNA nuclear heterogêneo do *PRUNE2*. A depleção de sua tradução ocorre pela ligação das enzimas adenosinas desaminases dependente de RNA (ADAR) no RNA de dupla fita, modificando a adenosina em iosina. Essa edição é responsável pelo aumento da proliferação e transformação celulares (SMOLLE et al., 2017). Nesse contexto, o *PCA3*, além de ser um biomarcador diagnóstico, controla a biologia do CaP, o que o torna importante alvo para estudos moleculares (SALAMEH et al., 2015; SMOLLE et al., 2017).

De fato, ainda permanece desconhecido o controle transcricional do *PCA3*. Elucidar as moléculas envolvidas na ativação ou inativação de sua região promotora se mostra, portanto, interessante, pois oferece ferramentas para a regulação de sua expressão. Em estudo anterior, Alves e colaboradores (2016) utilizaram a metodologia de PD para a seleção de peptídeos recombinantes ligantes à região promotora do gene. Com seu aspecto biotecnológico e terapêutico, o PD é capaz de identificar novos alvos diagnósticos e terapêuticos. Além disso, a versatilidade dessa tecnologia permite compreender os mecanismos moleculares inerentes a patologias, inclusive o câncer.

O método já foi previamente utilizado para a busca de biomarcadores diagnósticos para artrite reumatoide (ARAUJO et al., 2015), para a diferenciação dos quatro sorotipos do vírus da dengue (LEBANI et al., 2017), para a caracterização de subgrupos de pacientes com câncer de mama (LARSEN et al., 2015), para a detecção de biomarcadores lipídicos apolares para diagnóstico de tuberculose (CHAN et al., 2013), para o rastreamento e identificação de peptídeos ligantes específicos a células do câncer de ovário (ZHOU et al., 2015), para a seleção de peptídeo para a entrega de drogas contra câncer de pulmão (GILLESPIE et al., 2016) e, juntamente com técnicas de microarranjos, para o mapeamento da interação entre fator de transcrição e DNA (FRECKLETON et al., 2009).

Dentre os peptídeos selecionados, o *PCA3p4* alinhou com a proteína PDCD7 e, no presente trabalho, objetivamos avaliar a resposta de células prostáticas após tratamento com os fagos recombinantes, além de definir a capacidade de anticorpos circulantes em reconhecê-lo. Hipotetizando o papel do PDCD7 enquanto fator de transcrição, três linhagens de células de próstata foram tratadas com os fagos recombinantes e o efeito proliferativo avaliado pelo teste de MTT.

A utilização de linhagens celulares em estudos sobre o câncer é possível, pois estas são capazes de se autorreplicarem em meio de cultura mantendo a expressão de seus marcadores, a resposta hormonal, a sensibilidade a drogas e a malignidade (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). No presente estudo, o teste de MTT foi utilizado para verificar o efeito modulatório do peptídeo apresentado nas proteínas do capsídeo viral frente as linhagens prostáticas LNCaP, PC-3 e, como controle, a RWPE-1. Outras pesquisas também utilizaram o teste de MTT para avaliar a citotoxicidade de moléculas e compostos em diversos cânceres, como o efeito de extrato etanólico vegetal em Câncer de Mama (BRAGA et al., 2018), em células HeLa (BURDON; GILL; RICE-EVANS, 1993), efeitos de bloqueadores dos canais de sódio em CaP (WANG et al., 2018), efeitos celulares do miR-144-3p em CaP (ZHENG et al., 2018) e o efeito celular de sinvastatina induzido por irinotecano em CaP (ALQUDAH; MANSOUR; MHAIDAT, 2018).

O teste de MTT é um ensaio colorimétrico utilizado para verificar a viabilidade celular através da emissão de cor do produto gerado. A reação colorimétrica é gerada a partir da metabolização do sal de tetrazólio MTT por mitocôndrias de células viáveis gerando um produto de cor roxo, o formazan. A leitura é feita em leitora de microplacas

a 570 nm e mensura a atividade de enzimas desidrogenases, apenas nas células vivas (MOSMANN, 1983).

Após 48 horas de tratamento, os recombinantes titulados a 10^7 fagos/poço aumentaram a viabilidade celular na linhagem LNCaP, definida como modelo de CaP hormônio-dependente. Essas células expressam as citoqueratinas 8 e 18, o PSA, o AR, o receptor de estrógeno β (ER- β) e as enzimas aromatase e 5 α -redutase tipo I (LOU; MURTOLA; TUOHIMAA, 2005; MIMEAULT et al., 2006). Quando injetada por via subcutânea em camundongos, induz a formação de tumores, o que comprova sua dependência a androgênios (WEBBER; BELLO; QUADER, 1997).

As células LNCaP são aneuploides, possuem baixo potencial de ancoragem e não formam uma monocamada uniforme em cultivo celular (HOROSZEWICZ et al., 1983; WEBBER; BELLO; QUADER, 1997). Além disso, expressam níveis elevados dos genes *PRUNE2* e *PCA3* (SALAMEH, 2015). Portanto, sugere-se que, ao se ligar à região promotora do *PCA3*, o peptídeo module seus transcritos, conduzindo à maior proliferação celular. Entretanto, o efeito nos níveis de expressão de ambos os genes necessita ser elucidado.

Nas PC-3, o efeito proliferativo foi visualizado após 24 horas de tratamento com os fagos titulados a 10^5 . Estas células são classificadas como não responsivas a andrógenos, não expressando AR nem PSA. Por outro lado, expressam o ER- β (MIMEAULT et al., 2006), as citoqueratinas 8 e 18, as enzimas aromatase e 5 α -redutase tipo I (LOU; MURTOLA; TUOHIMAA, 2005), o Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos (bFGF) e o Receptor de Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF-R) (WEBBER; BELLO; QUADER, 1997).

Por fim, a linhagem celular não tumoral RWPE-1 foi utilizada como controle, uma vez que foi obtida do epitélio prostático sadio de um homem caucasiano após a cistoprostatectomia radical. Nesta, houve uma diminuição de viabilidade após o tratamento com o fago *PCA3p4*. A imortalização dessas células foi realizada com técnicas de biologia molecular utilizando uma única cópia do genoma do vírus do papiloma humano 18 (HPV-18). Esta linhagem é aneuploide e não induz a formação de tumor em camundongos imunodeficientes. Expressa as citoqueratinas 8 e 18, o PSA, o gene supressor de tumor p53, a proteína Rb, sendo hormônio responsiva, apesar da baixa expressão de ER- β e do AR (WEBBER; BELLO; QUADER, 1996; BELLO et al., 1997; MIMEAULT et al., 2006).

Como o peptídeo *PCA3p4* mimetiza o PDCD7, hipotetizamos que suas ações nas demais linhagens RWPE-1 e PC-3 não estejam relacionadas com a modulação do *PCA3*. Sugerimos que, em RWPE-1, sua superexpressão seja responsável pela ativação de mecanismos apoptóticos e, em PC-3, conhecidamente mais agressiva e invasiva, esteja envolvida com sua malignidade e progressão, o que tornaria o PDCD7 uma importante molécula prognóstica.

Com o intuito de verificar o perfil diagnóstico e prognóstico do fago *PCA3p4* frente a anticorpos de amostras séricas de pacientes com CaP, HBP e saudáveis (controle) utilizou-se o ensaio de ELISA, um teste quantitativo que se baseia na interação antígeno-anticorpo e o monitoramento da reação a partir da atividade enzimática (VOLLER et al., 1976). Essa estratégia tem se mostrado valorosa por ser menos invasiva, além de coleta e processamento mais simples (MANOUTCHARIAN et al., 1999; HANASH, 2003; HU; LOO; WONG, 2006).

Os resultados revelaram que o fago *PCA3p4* conseguiu diferenciar a forma benigna do CaP com AUC=0,69 (p=0,014) o que demonstra alterações moleculares já nos primeiros estágios da doença associadas ao provável antígeno PDCD7. No grupo de pacientes com a doença maligna, categorizados conforme o Escore de Gleason, observou-se uma maior absorbância no grupo com (Gleason \geq 7) com significativo poder discriminatório observado na curva ROC (AUC=0,84; p=0,0069). A descoberta de marcadores associados à diferenciação de células tumorais é essencial para o direcionamento terapêutico e para a predição da sobrevida do paciente (SMOLLE et al., 2017).

Nossos resultados sugerem o PDCD7 como um gene putativo para a progressão do CaP. Hipotetizamos que, ao modular a expressão de *PCA3*, o PDCD7 contribua para o desenvolvimento da doença e, quando esta avança, é essencial para sua agressão e invasividade. Ensaio celulares são, portanto, essenciais para desvendar, de forma inédita, o papel do PDCD7 no CaP.

6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, estudou-se o efeito celular e o perfil diagnóstico do fago *PCA3p4*, previamente selecionado por PD. A partir dos resultados obtidos, conclui-se

que o fago *PCA3p4* estimulou a proliferação das linhagens tumorais prostáticas LNCaP e PC-3, se mostrando citotóxico à RWPE-1 (não tumorigênica). Além disso, pôde diferenciar, em amostras séricas, pacientes com CaP daqueles com HPB. Interessantemente, houve uma maior absorbância nos ensaios de ELISA em soro de pacientes com tumores de alto risco (Gleason ≥ 7), sugerindo o papel diagnóstico e prognóstico do peptídeo recombinante. Entretanto, ensaios funcionais com a validação dos transcritos do *PCA3* e silenciamento gênico do *PDCD7* confirmarão seu papel como fator transcricional do *PCA3* e como molécula-chave para a progressão da doença.

REFERÊNCIAS

- A.C.CAMARGO CANCER CENTER. **Tudo sobre o câncer**. Disponível em: <<http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer>>. Acesso em: 05 jun. 2017.
- AGHEBATI-MALEKI, L. et al. Phage display as a promising approach for vaccine development. **Journal Of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p.1-18, set. 2016.
- AINA, et al. Therapeutic cancer targeting peptides. **Biopolymers**, v. 66, n. 3, p.184-199, 2002.
- ALMEIDA, V. L. de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p.118-129, fev. 2005.
- ALQUDAH, M. A.; MANSOUR, H. T.; MHAI DAT, N. Simvastatin enhances irinotecan-induced apoptosis in prostate cancer via inhibition of MCL-1. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 2, p.191-197, fev. 2018.
- ALVES, D. A et al. **Short peptides that bind pca3 promoter region reveal new molecular pathways in Prostate Cancer**. 2016. 32 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2016.
- ANAND, P. et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p.2097-2116, 15 jul. 2008.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Prostate Cancer Stages**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>>. Acesso em: 25 jan. 2018.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Statistics**. Disponível em: <<https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#/>>. Acesso em: 27 jan. 2018.
- ARAUJO, G. R. et al. Improved serological detection of rheumatoid arthritis: a highly antigenic mimotope of carbonic anhydrase III selected in a murine model by phage display. **Arthritis Research & Therapy**, v. 17, n. 1, p.1-13, jun. 2015.

ARAÚJO, T. G. et al. A novel highly reactive Fab antibody for breast cancer tissue diagnostics and staging also discriminates a subset of good prognostic triple-negative breast cancers. **Cancer Letters**, v. 343, n. 2, p.275-285, fev. 2014.

AZZAZY, H. M.; HIGHSMITH, W. D. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, n. 6, p.425-445, set. 2002.

BALK, S. P.; KO, Y.; BUBLEY, G. J. Biology of Prostate-Specific Antigen. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 21, n. 2, p.383-391, jan. 2003.

BARCLAY, W. W. et al. A System for Studying Epithelial-Stromal Interactions Reveals Distinct Inductive Abilities of Stromal Cells from Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. **Endocrinology**, v. 146, n. 1, p.13-18, jan. 2005.

BASU, S. et al. A Study of Molecular Signals Deregulating Mismatch Repair Genes in Prostate Cancer Compared to Benign Prostatic Hyperplasia. **Plos One**, v. 10, n. 5, p.1-22, mai. 2015.

BELLO, D. et al. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 6, p.1215-1223, jun. 1997.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**. v.19, n.1, p.1-33, 2001.

BOO, L. et al. Time from first detectable PSA following radical prostatectomy to biochemical recurrence: A competing risk analysis. **Canadian Urological Association Journal**, v. 9, n. 1-2, p.14-21, jan. 2015.

BOURDOUMIS, A. et al. The novel prostate cancer antigen 3 (PCA3) biomarker. **International Braz J Urol**, v. 36, n. 6, p.665-669, dez. 2010.

BRAGA, D. et al. Ethanolic Extracts from *Azadirachta indica* Leaves Modulate Transcriptional Levels of Hormone Receptor Variant in Breast Cancer Cell Lines. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p.1879-1893, 26 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Programa nacional de controle do câncer da próstata: documento de consenso**. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

- BRATKOVIC, T. Progress in Phage display: evolution of the technique and its applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 5, p.749-767, 2010.
- BURDON, R. H.; GILL, V.; RICE-EVANS, C. Reduction of a Tetrazolium Salt and Superoxide Generation in Human Tumor Cells (HeLa). **Free Radical Research Communications**, v. 18, n. 6, p.369-380, jan. 1993.
- BUSSEMAKERS, M. et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 59, n. 23, p.5975-5979, dez. 1999.
- CALVETE, A. C. et al. Avaliação da extensão da neoplasia em câncer da próstata: valor do PSA, da percentagem de fragmentos positivos e da escala de Gleason. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 3, p.250-254, set. 2003.
- CENTRO DE ONCOLOGIA DO HOSPITAL ALEMÃO OSWALDO CRUZ. **Tudo sobre câncer**. Disponível em: <<http://centrodeoncologia.org.br/tudo-sobre-cancer/>>. Acesso em: 05 jun. 2017.
- CHAN, C. E. Z. et al. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. **International Immunology**, v. 26, n. 12, p.649–657, dez. 2014.
- CHAN, C. E. et al. Novel phage display-derived mycolic acid-specific antibodies with potential for tuberculosis diagnosis. **Journal Of Lipid Research**, v. 54, n. 10, p.2924-2932, jun. 2013.
- CHOI, J. H. et al. Identification and characterization of nonapeptide targeting a human B cell lymphoma, Raji. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 6, p.852-858, jun. 2008.
- COELHO, F. F. et al. Expression of PCA3 and PSA genes as a biomarker for differential diagnosis of nodular hyperplasia and prostate cancer. **Genetics And Molecular Research**, v. 14, n. 4, p.13519-13531, 2015.
- COLIN, P. et al. Focal Laser Ablation of Prostate Cancer: Definition, Needs, and Future. **Advances In Urology**, v. 2012, p.1-10, 2012.

CORIC, J. et al. Prostate-Specific Antigen (PSA) and Prostate Volume: Better Predictor of Prostate Cancer for Bosnian and Herzegovina Men. **The Open Biochemistry Journal**, v. 9, n. 1, p.34-36, maio 2015.

CUI, Y. et al. Evaluation of prostate cancer antigen 3 for detecting prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-9, maio 2016.

CUZICK, J. et al. Prevention and early detection of prostate cancer. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 11, p.484-492, out. 2014.

DA SILVA, H. B. et al. Dissecting Major Signaling Pathways throughout the Development of Prostate Cancer. **Prostate Cancer**, v. 2013, p. 1-23, 2013.

DENG, J. et al. Long Non-Coding RNA as Potential Biomarker for Prostate Cancer: Is It Making a Difference?. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 14, n. 3, p.270-286, mar. 2017.

DENMEADE, S. R.; ISAACS, J. T. A history of prostate cancer treatment. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p.389-396, maio 2002.

DERAS, I. L. et al. PCA3: A Molecular Urine Assay for Predicting Prostate Biopsy Outcome. **The Journal Of Urology**, v. 179, n. 4, p.1587-1592, abr. 2008.

DEUTSCHER, S. L. Phage Display in Molecular Imaging and Diagnosis of Cancer. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p.3196-3211, maio 2010.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p.495-516, jun. 2007.

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.

FERREIRA, L. B. et al. PCA3 Noncoding RNA Is Involved in the Control of Prostate-Cancer Cell Survival and Modulates Androgen Receptor Signaling. **BioMed Central Cancer**, v.12, p.1-15, 2012.

FILHO, R. T. F. DAMIÃO, R. Câncer de próstata. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 9, p.20-27, 2010.

FORONI, C. et al. Epithelial–mesenchymal transition and breast cancer: Role, molecular mechanisms and clinical impact. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p.689-697, out. 2012.

FOSSA, A. et al. Serological cloning of cancer/testis antigens expressed in prostate cancer using cDNA phage surface display. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 5, p.431-438, maio 2004.

FRECKLETON, G. et al. Microarray Profiling of Phage-Display Selections for Rapid Mapping of Transcription Factor–DNA Interactions. **Plos Genetics**, v. 5, n. 4, p.1-8, abr. 2009.

FUNDAÇÃO DO CÂNCER. **Principais causas do câncer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org.br/principais-causas-do-cancer/>>. Acesso em: 04 jun. 2017.

FUNDAÇÃO DO CÂNCER. **Principais tipos de câncer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org.br/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/>>. Acesso em: 04 jun. 2017.

GILLESPIE, J. W. et al. Selection of Lung Cancer-Specific Landscape Phage for Targeted Drug Delivery. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 19, n. 5, p.412-422, 2016.

GLEASON, D. F. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. **Human Pathology**, v. 23, n. 3, p.273-279, mar. 1992.

GRÖNBERG, H. et al. Prostate cancer screening in men aged 50–69 years (STHLM3): a prospective population-based diagnostic study. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 16, p.1667-1676, dez. 2015.

HAMZEH-MIVEHROUD, M. et al. Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23-24, p.1144-1157, 2013.

HANASH, S. Disease proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p.226-232, mar. 2003.

HEIDENREICH, A. et al. EAU Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Treatment of Clinically Localised Disease. **European Urology**, v. 59, n. 1, p.61-71, jan. 2011.

HESSELS, D. et al. DD3PCA3-based Molecular Urine Analysis for the Diagnosis of Prostate Cancer. **European Urology**, v. 44, n. 1, p.8-16, jul. 2003.

HESSELS, D.; SCHALKEN, J. A. The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 6, n. 5, p.255-261, maio 2009.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, p.1-7, ago. 2011.

HOROSZEWICZ, J. S. et al. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. **Cancer Research**, v. 43, n. 4, p.1809-1818, abr. 1983.

HU, S. et al. Phage display selection of peptides that inhibit metastasis ability of gastric cancer cells with high liver-metastatic potential. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 4, p.964-972, mar. 2006.

HU, S.; LOO, J. A.; WONG, D. T. Human body fluid proteome analysis. **Proteomics**, v. 6, n. 23, p.6326-6353, dez. 2006.

HUFTON, S. et al. Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. **Journal Of Immunological Methods**, v. 231, n. 1-2, p.39-51, dez. 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Como se comportam as células cancerosas?. Disponível em:
<http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=318>. Acesso em: 05 jun. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Como é o processo de carcinogênese?. Disponível em: <
http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>. Acesso em: 03 jun. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Diagnóstico. Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/diagnostico_profissional>. Acesso em 25 jan. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estadiamento. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=54>.
Acesso em 25 jan. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Próstata. Disponível em:
<<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>.
Acesso em 21 ago. 2018.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Estadiamento do Câncer de Próstata.** Disponível em:
<<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/estadiamento-do-cancer-de-prostata/1205/289/>>.
Acesso em: 25 jan. 2018.

INSTITUTO ONCOGUIA. **O que é câncer.** Disponível em:
<<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Quimioterapia para Câncer de Próstata.** Disponível em:
<<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/quimioterapia-para-cancer-de-prostata/1208/290/>>. Acesso em: 03 set. 2018.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Sistema TNM.** Disponível em: <
<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sistema-tnm/4801/725/>>. Acesso em: 26 jan.
2018.

KELLY, K. A. et al. Detection of Early Prostate Cancer Using a Hepsin-Targeted Imaging Agent. **Cancer Research**, v. 68, n. 7, p.2286-2291, abr. 2008.

KHANDURI, S. et al. Evaluation of Prostatic Lesions by Transrectal Ultrasound, Color Doppler, and the Histopathological Correlation. **Cureus**, v. 9, n. 7, p.1-11, jul. 2017.

KIM, E. H.; LARSON, J. A.; ANDRIOLE, G. L. Management of Benign Prostatic Hyperplasia. **Annual Review Of Medicine**, v. 67, n. 1, p.137-151, jan. 2016.

KLECKA, J. et al. Differential display code 3 (DD3/PCA3) in prostate cancer diagnosis. **Anticancer Research**, v. 30, n. 2, p.665-670, fev. 2010.

KOK, J. et al. DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. **Cancer Research**, v. 62, n. 9, p.2695-2698, mai. 2002.

KRUMPE, L. R.; MORI, T. The Use of Phage-Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs. **International Journal Of Peptide Research And Therapeutics**, v. 12, n. 1, p.79-91, mar. 2006.

KUIJER, M. L. et al. Cancer subtype identification using somatic mutation data. **British Journal Of Cancer**, v. 118, n. 11, p.1492-1501, maio 2018.

LARSEN, S. A. et al. Selection of a breast cancer subpopulation-specific antibody using phage display on tissue sections. **Immunologic Research**, v. 62, n. 3, p.263-272, 12 maio 2015.

LEBANI, K. et al. Isolation of serotype-specific antibodies against dengue virus non-structural protein 1 using phage display and application in a multiplexed serotyping assay. **Plos One**, v. 12, n. 7, p.1-18, jul. 2017.

LEE, C. et al. Role of the Adjacent Stroma Cells in Prostate Cancer Development and Progression: Synergy between TGF- β and IGF Signaling. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-8, 2014.

LEMOS, A. E. G. et al. PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells. **Tumor Biology**, v. 37, n. 8, p.11339-11348, mar. 2016.

LEVINE, A.; DURBIN, R. A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 19, p.4006-4013, out. 2001.

LILJA, H.; ULMERT, D.; VICKERS, A. J. Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 4, p.268-278, abr. 2008.

LIU, K. et al. The MMP2 rs243865 polymorphism increases the risk of prostate cancer: A meta-analysis. **Oncotarget**, p.1-6, maio 2017.

LIU, X. et al. Prostate-specific Antigen (PSA) Density and Free to Total PSA Ratio in Diagnosing Prostate Cancer with Prostate-Specific Antigen Levels of 4.0 ng/ml or Less. **Iranian Journal Of Public Health**, v. 44, n. 11, p.1466-1472, nov. 2015.

LIU, Y. et al. The role of long non-coding RNA PCA3 in epithelial ovarian carcinoma tumorigenesis and progression. **Gene**, v. 633, p.42-47, out. 2017.

- LOPES, P. M. et al. The role of transrectal ultrasound in the diagnosis of prostate cancer: new contributions. **Radiologia Brasileira**, v. 48, n. 1, p.7-11, fev. 2015.
- LOU, Y.; MURTOLA, T.; TUOHIMAA, P. Regulation of aromatase and 5 α -reductase by 25-hydroxyvitamin D3, 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3, dexamethasone and progesterone in prostate cancer cells. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 94, n. 1-3, p.151-157, fev. 2005.
- MANNING, M. L. et al. Proteolysis of Complement Factors iC3b and C5 by the Serine Protease Prostate-Specific Antigen in Prostatic Fluid and Seminal Plasma. **The Journal Of Immunology**, v. 190, n. 6, p.2567-2574, fev. 2013.
- MANOUTCHARIAN, K. et al. Characterization of Cerebrospinal Fluid Antibody Specificities in Neurocysticercosis Using Phage Display Peptide Library. **Clinical Immunology**, v. 91, n. 1, p.117-121, abr. 1999.
- MCGRATH, S. et al. Prostate cancer biomarkers: Are we hitting the mark?. **Prostate International**, v. 4, n. 4, p.130-135, dez. 2016.
- MARZO, A. M. de et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p.256-269, abr. 2007.
- MAUGHAN, B. L; ANTONARAKIS, Emmanuel S. **Androgen Pathway Resistance in Prostate Cancer and Therapeutic Implications**. Expert opinion on pharmacotherapy, p. 1521-1537. jun. 2017.
- MEROLA, R. et al. PCA3 in prostate cancer and tumor aggressiveness detection on 407 high-risk patients: a National Cancer Institute experience. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 1, p.15-21, 2015.
- MIMEAULT, M. et al. Novel combination therapy against metastatic and androgen-independent prostate cancer by using gefitinib, tamoxifen and etoposide. **International Journal Of Cancer**, v. 120, n. 1, p.160-169, 2006.
- MOLEK, P.; STRUKELJ, B.; BRATKOVIC, T. Peptide Phage Display as a Tool for Drug Discovery: Targeting Membrane Receptors. **Molecules**, v. 16, n. 12, p.857-887, 2011.

MONTEIRO, P. G. Terapêutica e Seguimento do Carcinoma da Próstata. **Acta Urológica**, v. 23, n. 3, p.89-92, set. 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, dez. 1983.

MÜLLER, O. J. et al. Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 9, p.1040-1046, ago. 2003.

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, p.881-887, jan. 2013.

NIXON, A.; SEXTON, D. J.; LADNER, R. C. Drugs derived from phage display. **Mabs**, v. 6, n. 1, p.73-85, 21 nov. 2013.

NYQUIST, M. D.; DEHM, S. M. Interplay Between Genomic Alterations and Androgen Receptor Signaling During Prostate Cancer Development and Progression. **Hormones And Cancer**, v. 4, n. 2, p.61-69, jan. 2013.

OLIVEIRA, V.; AMARAL, J.; FERRAZ, L. HBP e prostatite. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 21, n. 2, p. 201-7, mar. 2005.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL. **OMS: câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>>. Acesso em: 06 jun. 2017.

PACHNICKI, J. P. Andrade et al. Avaliação imunoistoquímica dos receptores de estrogênio e progesterona no câncer de mama, pré e pós-quimioterapia neoadjuvante. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 39, n. 2, p.86-92, abr. 2012.

PAL, R. P. et al. Defining prostate cancer risk before prostate biopsy. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 31, n. 8, p.1408-1418, nov. 2013.

- PANG, K. H. Evaluation of a short RNA within Prostate Cancer Gene 3 in the predictive role for future cancer using non-malignant prostate biopsies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p.1-9, abr. 2017.
- PARK, E. J. et al. Characterization of a novel mouse cDNA, ES18, involved in apoptotic cell death of T-cells. **Nucleic Acids Research**, v. 27 n. 6, p.1524–1530, 1999.
- PENG, S. et al. MiR-134 targets PDCD7 to reduce E-cadherin expression and enhance oral cancer progression. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], p.1-38, 4 jul. 2018.
- POPA, I. et al. Identification of PCA3 (DD3) in prostatic carcinoma by in situ hybridization. **Modern Pathology**, v. 20, n. 2007, p.1121-1127, set. 2007.
- POPKOV, M. et al. Epitope-specific Antibody Response to HT-1080 Fibrosarcoma Cells by Mimotope Immunization. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 9, p.3629-3635, set. 2000.
- 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.; CHINNAIYAN, A. M. The Emergence of lncRNAs in Cancer Biology. **Cancer Discovery**, v. 1, n. 5, p.391-407, out. 2011.
- PRINS, G. S.; PUTZ, O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. **Differentiation**, v. 76, n. 6, p.641-659, jul. 2008.
- QIU, M. et al. Long noncoding RNA: an emerging paradigm of cancer research. **Tumor Biology**, v. 34, n. 2, p.613-620, jan. 2013.
- RASMUSSEN, U. B. et al. Tumor cell-targeting by phage-displayed peptides. **Cancer Gene Therapy**, v. 9, n. 7, p.606-612, jun. 2002.
- RIFFENBURGH, R H; AMLING, C L. Use of early PSA velocity to predict eventual abnormal PSA values in men at risk for prostate cancer. **Prostate Cancer And Prostatic Diseases**, v. 6, n. 1, p.39-44, 2003.
- RUOSLAHTI, E. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 110-111, p.3-12, fev. 2017.

RUSSEL, B. et al. Abstract 2467: Role of PCA3 in prostate cancer cell proliferation and progression. **Cancer Research**, v. 78, n. 13, p.2467-2467, jul. 2018.

SALAMEH, A. et al. PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNAPCA3. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 112, n. 27, p.8403-8408, jun. 2015.

SANTOS, M. R. et al. Utilization of phage display to identify antigenic regions in the PCV2 capsid protein for the evaluation of serological responses in mice and pigs. **Archives Of Virology**, v. 163, n. 7, p.1877-1887, mar. 2018.

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.

SHEEHAN, J; MARASCO, W. A. Phage and yeast display. **Microbiol Spectrum**, v.3, n.1, p. 1-17, 2015.

SHIOTA, M.; YOKOMIZO, A.; NAITO, S. Increased androgen receptor transcription: a cause of castration-resistant prostate cancer and a possible therapeutic target. **Journal Of Molecular Endocrinology**, v. 47, p.25-41, 2011.

SINNOTT, J. A. et al. Prognostic Utility of a New mRNA Expression Signature of Gleason Score. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 1, p.81-87, set. 2016

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v.228, p.1315-1317, 1985.

SMITH, G. P. Surface display and peptide libraries. **Gene**, v. 128, n. 1, p. 1-2,1993.

SMOLLE, M. et al. Current Insights into Long Non-Coding RNAs (LncRNAs) in Prostate Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p.473-490, fev. 2017.

SNOEK, R. et al. In vivo Knockdown of the Androgen Receptor Results in Growth Inhibition and Regression of Well-Established, Castration-Resistant Prostate Tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 1, p.39-47, jan. 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA ONCOLÓGICA. **O que é câncer?**. Disponível em: <<http://www.sbco.org.br/comunidade/o-que-e-cancer/>>. Acesso em: 06 jun. 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA ONCOLÓGICA. **Tipos de câncer**. Disponível em: <<http://www.sbco.org.br/comunidade/tipos-de-cancer/>>. Acesso em: 06 jun. 2017.

STEPHAN, C.; RALLA, B.; JUNG, K. Prostate-specific antigen and other serum and urine markers in prostate cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews On Cancer**, v. 1846, n. 1, p.99-112, ago. 2014.

TAN, Y. et al. Advance in phage display technology for bioanalysis. **Biotechnology Journal**, v. 11, n. 6, p. 732–745, 2016.

TEFEKLI, A.; TUNC, M. Future Prospects in the Diagnosis and Management of Localized Prostate Cancer. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p.1-9, 2013.

THE NOBEL PRIZE. The Nobel Prize in Chemistry 2018. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/press-release/>>. Acesso em: 16 dez. 2018.

TIAN, Y. et al. Identification of Novel Molecular Markers for Prognosis Estimation of Acute Myeloid Leukemia: Over-Expression of PDCD7, FIS1 and Ang2 May Indicate Poor Prognosis in Pretreatment Patients with Acute Myeloid Leukemia. **Plos One**, v. 9, n. 1, p.1-6, jan. 2014.

TONON, T. C. A.; SCHOFFEN, J. P. F. Câncer de próstata: Uma revisão de literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p. 403-410, set./dez. 2010.

VAN GILS, M. et al. Innovations in Serum and Urine Markers in Prostate Cancer. **European Urology**, v. 48, n. 6, p.1031-1041, dez. 2005.

VIANI, G. A.; STEFANO, E. J.; AFONSO, S. L. Higher-Than-Conventional Radiation Doses in Localized Prostate Cancer Treatment: A Meta-analysis of Randomized, Controlled Trials. **International Journal Of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 74, n. 5, p.1405-1418, ago. 2009.

VISPO, N. S. et al. Display technology on filamentous phage in the search for anti-infective biological agents. **Bionatura**, v. 1, n. 1, p.22-29, fev. 2016.

VOLLER, A. et al. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. **Journal Of Clinical Pathology**, v. 29, n. 2, p.150-153, jul. 1976.

XING, L. et al. Identification of a peptide for folate receptor alpha by phage display and its tumor targeting activity in ovary cancer xenograft. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.1-13, maio 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.

WAN, X. et al. UHRF1 overexpression is involved in cell proliferation and biochemical recurrence in prostate cancer after radical prostatectomy. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p.1-14, 17 fev. 2016.

WANG, F. et al. Development and prospective multicenter evaluation of the long noncoding RNA MALAT-1 as a diagnostic urinary biomarker for prostate cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 22, p.11091-11102, nov. 2014.

WANG, J. et al. Evaluation of the anticancer and anti-metastasis effects of novel synthetic sodium channel blockers in prostate cancer cells in vitro and in vivo. **The Prostate**, p.1-11, 21 set. 2018.

WANG, T. et al. Diagnostic significance of urinary long non-coding PCA3 RNA in prostate cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 35, p.58577-58586, 20 abr. 2017.

WANG, Y.; LIU, X. J.; YAO, X. D. Function of PCA3 in prostate tissue and clinical research progress on developing a PCA3 score. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 26, n. 4, p. 493–500, ago. 2014.

WARRICK, J. I. et al. Evaluation of Tissue PCA3 Expression in Prostate Cancer by RNA in Situ Hybridization - A Correlative Study with Urine PCA3 and TMPRSS2-ERG. **Modern pathology**, v. 4, n. 27, p.609–620, abr. 2014.

WEBBER, M. M.; BELLO, D.; QUADER, S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: Characteristics and applications part I. Cell markers and immortalized nontumorigenic cell lines. **The Prostate**, v. 29, n. 6, p.386-394, dez. 1996.

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, jan. 1997.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. **Fems Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p.127-181, maio 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 05 jun. 2017.

WILL, C. L. et al. The human 18S U11/U12 snRNP contains a set of novel proteins not found in the U2-dependent spliceosome. **Rna**, v. 10, n. 6, p.929-941, jun. 2004.

YACOUB, J. H. et al. Imaging-guided Prostate Biopsy: Conventional and Emerging Techniques. **Radiographics**, v. 32, n. 3, p.819-837, maio 2012.

ZHENG, H. et al. MicroRNA-144-3p inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis in prostate cancer by targeting CEP55. **American Journal Of Translational Research**, v. 10, n. 8, p.2457-2468, ago. 2018.

ZHOU, C. et al. Phage display screening identifies a novel peptide to suppress ovarian cancer cells in vitro and in vivo in mouse models. **Bmc Cancer**, v. 15, n. 1, p.1-12, 10 nov. 2015.

ZHOU, Y. et al. Urinary Biomarker Panel to Improve Accuracy in Predicting Prostate Biopsy Result in Chinese Men with PSA 4–10 ng/mL. **Biomed Research International**, v. 2017, p.1-9, 2017.