

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

ANGELO BORGES DE MELO NETO

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO -196/-174 DEL DO RECEPTOR *TOLL-LIKE 2*
(*TLR2*) NA SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE PRÓSTATA**

**PATOS DE MINAS – MG
JULHO DE 2018**

ANGELO BORGES DE MELO NETO

**INFLUÊNCIA DO POLIMORFISMO -196/-174 DEL DO RECEPTOR *TOLL-LIKE 2*
(*TLR2*) NA SUSCEPTIBILIDADE AO 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

JULHO DE 2018

ANGELO BORGES DE MELO NETO

Influência do polimorfismo -196/-174 del do receptor *toll-like 2 (tlr2)* na susceptibilidade ao 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:

Professora Dr(a) Thaise Gonçalves de Araújo - Instituto de Biotecnologia
Presidente

Professora Dr(a) Cristina Ribas Fürstenau – Instituto de Biotecnologia
Membro

Professora MSc. Mariana Alves Pereira Zóia– Instituto de Biotecnologia
Membro

Patos de Minas, 02 de julho de 2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por toda a minha vida;

A minha família pela minha geração e apoio;

A meu primo Matheus por toda a ajuda que me concedeu durante o curso;

Ao João Victor por me acompanhar na jornada profissional desde os 13 anos;

À professora. Dr(a). Thaíse por ser minha verdadeira orientadora e por toda disponibilidade;

À professora. Dr(a). Cristina pelo trabalho que me concedeu e por todo apoio durante o curso;

À técnica Luciana por todos ensinamentos, favores, gentileza e carinho durante todo o tempo;

À professora. MSc. Mariana por aceitar o convite e que seja bem-vinda à UFU Patos;

A todos os meus colegas que caminharam ao meu lado por 4 anos.

RESUMO

A família de receptores *Toll-like* (*TLR*) representa o principal grupo de receptores responsável pelas respostas do sistema imune inato a fatores antigênicos, incluindo aos Padrões Moleculares Associados a Danos celulares (DAMPs), os quais são produzidos por células cancerígenas. Considerando o Câncer de Próstata (CaP), a regulação gênica, a sinalização celular, a consequente secreção de citocinas e o recrutamento de células imunes relacionadas à ativação de *TLR2* ainda necessitam ser descritos. Este trabalho objetivou verificar a influência do polimorfismo -196/-174del deste receptor na susceptibilidade ao CaP em indivíduos brasileiros. Por meio de PCR alelo-específica, 23 pacientes com CaP e 23 com hiperplasia prostática benigna (HPB) foram genotipados. Estes foram caracterizados em Ins/Ins (Inserção/Inserção), quando ambos os seus alelos continham 288 pb, Ins/Del (Inserção/Deleção) como heterozigotos e Del/Del (Deleção/Deleção) quando continham alelos com 266pb. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as idades e os valores de PSA (Antígeno Prostático Específico) entre os grupos de estudo ($p = 0,12$ e $p = 0,17$, respectivamente). A frequência genotípica se mostrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0.90$ para CaP e 0.43 para HPB). Além disso, os genótipos não diferenciaram os pacientes CaP de HPB, contudo, houve uma maior prevalência do alelo deletério em homens acometidos pela doença. Um maior número de indivíduos necessita ser avaliado, bem como análises do número de transcritos do gene *TLR2* devem ser conduzidas para, assim, definir o impacto dessa mutação nas lesões prostáticas.

Palavras-chave: CaP. Biomarcador. TLR2. Polimorfismo.

ABSTRACT

The Toll-like family (TLR) represents the main group of receptors related to innate immune system that respond against antigenic factors, including to Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs), which are produced by cancerous cells. Considering the Prostate Cancer (PCa), the genetic regulation, the cell signaling, the secreted cytokines and the recruited immune cells related to TLR2 activation, still need to be elucidated. This work aimed to characterize the -196/-174del polymorphism of TLR2 in PCa susceptibility in Brazilian men. Through allele-specific PCR, 23 patients with PCa and 23 with Benign prostatic hyperplasia (BPH) were genotyped. Men were considered as Ins/Ins (Insertion/Insertion), when both alleles were present (288bp), Ins/Del as heterozygous and Del/Del (Deletion/Deletion) with both 266bp alleles. There were no statistically significant difference of age and PSA values between the studied groups ($p= 0.12$ and $p= 0.17$, respectively). The genotypic frequency was in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ($p=0.90$ for PCa and 0.43 for BPH). Furthermore, the genotypes did not differentiate PCa and BPH patients; however, there was a higher prevalence of deleterious allele in men affected by the disease. A greater number of individuals need to be evaluated, as well as analyzes of the transcripts number of TLR2 gene must be conducted to define the impact of this mutation in prostatic lesions.

Keywords: PCa. Biomarker. TLR2. Polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AATs: Antígenos associados ao tumor
AP-1: Proteína ativadora-1
BCL2: Proteína do Linfoma de células B2
BCL2A1: Proteína BCL2 relacionada a A1
BIRC3: Repetição de IAP Baculoviral contendo proteína 3
CaP: Câncer de Próstata
CFLAR: CASP8 e FADD como reguladores da apoptose
COX-2: CicloOxigenase 2
DAMP: Padrões moleculares associados a danos celulares
ERK: Quinases reguladas por sinal extracelular
ERO: Espécies reativas de oxigênio
FDA: *Food and Drug Administration*
GCLC: Subunidade catalítica Glutamato-Cisteína ligase
HBP: Hiperplasia benigna da próstata
HMGB1: *High Mobility Group Box1*
IER3: Fator de resposta imediata 3
IKK: Quinase inibidora do fator nuclear NF-κB
IL-10: Interleucina-10
IL-17: Interleucina-17
IL-6: Interleucina-6
IL-8: Interleucina-8
IRAK: Quinase associada ao receptor IL-1
IRF: Fatores reguladores de Interferons
LITs: Linfócitos infiltrantes tumorais
LRR: Repetições ricas em leucina
MAPKs: Proteína quinase ativada por mitógeno
MyD88: Resposta primária de diferenciação mielóide 88
NEMO: Modulador essencial de NF-κB
NF-κB: Fator nuclear potenciador da cadeia leve Kappa de células B ativadas
NK: *Natural Killer*
PAMP: Padrões moleculares associados a patógenos
PCa: *Prostate Cancer*
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PDCD4: Morte celular programada 4
PGE2: Prostaglandina E-2
PKC: Proteína quinase C
POLI I:C: Ácido Polinosínico-Policitidílico
PSA: Antígeno Prostático Específico
PTEN: Homólogo de fosfatase e tensina
RANK: Receptor ativador do fator nuclear NF-κB
RANKL: Ligante do Receptor ativador do fator nuclear NF-κB
RPRs: Receptores padrão de reconhecimento
SNPs: Polimorfismos de nucleotídeo único
TAB: Proteínas de ligação a TAK-1
TAE: Tris Acetato-EDTA
TAK1: Quinase de ativação do fator de crescimento B transformado 1
TBE: Tris Borato-EDTA
TIR: Receptor *Toll-IL1*
TIRAP: Receptor *Toll-IL1* contendo proteína adaptadora

TLR: Receptor *Toll-like*

TNFAIP3: Proteína induzida por TNF-alfa3

TNM: *Tumour Node Metastasis*

TP53INP1: Proteína nuclear induzível da Proteína tumoral p53 1

TRAF 6: Fator associado ao receptor de necrose tumoral 6

TRAM: Molécula adaptadora relacionada ao *TRIF*

TRIF: Interferon-B indutor de adaptador contendo domínio-*TIR*

VDR: Receptor de Vitamina D

VEGFR2: Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular 2

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
OBJETIVO GERAL.....	11
Objetivos específicos.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1 Câncer de próstata: do diagnóstico ao tratamento.....	11
2.2 Imunologia de tumores.....	13
2.3 Receptor TLR2 no câncer.....	15
2.4 Polimorfismos em genes codificadores de <i>Toll</i>	18
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	19
3.1 Triagem dos pacientes.....	19
3.2 Extração de DNA e detecção do polimorfismo -196/-174del.....	19
3.3 Análises estatísticas.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença associada a alterações metabólicas e genéticas que resultam em falhas nos processos de controle da proliferação, diferenciação e/ou apoptose celular. Quanto à incidência em âmbito mundial, cerca de dois terços das mortes devido a todos os tipos de cânceres é observada em países de média ou baixa renda, devido principalmente a diagnósticos e tratamentos não acessíveis à maior parte da população (ONU, 2017). Nos Estados Unidos, a estimativa é de 1.735.350 novos casos e 609.640 mortes relacionadas à doença no ano de 2018 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Dentre os indivíduos do sexo masculino e os diferentes tipos de tumores, o câncer de próstata (CaP) é o segundo mais incidente, inclusive no Brasil, onde estimam-se 68.220 casos em 2018, atrás somente do câncer de pele não-melanômico (BORGES et al., 2018).

Os métodos diagnósticos atuais, como o toque digital retal, a quantificação dos níveis séricos de PSA (Antígeno Prostático Específico) e os exames de imagem carecem de estratégias adicionais que garantam uma maior especificidade na diferenciação entre pacientes com CaP e Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). Nesse cenário, a descoberta e validação de biomarcadores emergem como uma ferramenta promissora em oncologia clínica.

As alterações polimórficas em genes-chave vêm se mostrando significativas na caracterização epidemiológica da doença e na identificação de marcas de susceptibilidade. Os genes que codificam os receptores do tipo *Toll* (*TLR*), em especial o *TLR2*, estão envolvidos com a resposta e modulação imunológica, com associação direta ao surgimento e progressão do câncer. O polimorfismo -196/-174del na região promotora do gene *Toll-like2* já foi associada ao CaP na população indiana, contudo, não existem estudos em pacientes brasileiros.

Presentemente, avaliamos a influência do polimorfismo -196/-174del do gene *Toll-like2* na susceptibilidade de indivíduos brasileiros ao CaP. Os genótipos não diferenciaram os pacientes de CaP e HPB, contudo, houve uma maior prevalência do alelo deletério em homens acometidos pelo câncer. Sugerimos que um número maior de pacientes seja analisado, assim como os efeitos moleculares dessa deleção nos transcritos formados. Assim, poderemos sugerir com mais segurança o papel dessa mutação na malignidade e progressão da doença.

OBJETIVOS

Objetivo geral: Caracterizar o polimorfismo -196 para -174del do gene *TLR2* em pacientes brasileiros com Câncer de Próstata e Hiperplasia Prostática Benigna.

Objetivos específicos:

- Padronizar a detecção da mutação nos pacientes selecionados;
- Avaliar o papel do polimorfismo enquanto evento molecular associado à susceptibilidade ao CaP.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de Próstata: do diagnóstico ao tratamento

O câncer é uma doença complexa em que células tecido-específicas não respondem adequadamente a sinais responsáveis pelo controle da diferenciação, proliferação, sobrevivência e apoptose celulares (WEINBERG, 2014). Já foram descritos mais de 280 tipos, de forma que os tumores malignos são caracterizados por apresentar: alterações genômicas; ciclo celular curto; crescimento invasivo; alta mobilidade e mudanças morfológicas críticas (HASSANPOUR, H.S.; DEHGHANI, M., 2017). Assim, há a classificação destes como primários, quando são diagnosticados em seu local de origem, e secundários ou metastáticos, quando invadem outros tecidos por meio do sistema circulatório (LODISH et al., 2016).

Quanto à incidência em âmbito mundial, cerca de dois terços das mortes pela doença é observada em países de média ou baixa renda, devido, principalmente, a diagnósticos e tratamentos não acessíveis à maior parte da população (ONU, 2017). Adicionalmente, a estimativa é de 1.735.350 novos casos e 609.640 mortes relacionados ao câncer no ano de 2018 nos Estados Unidos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). Já no Brasil, para o mesmo ano, são esperados 582.590 novos casos (BORGES et al., 2018).

Dentre os indivíduos do sexo masculino e os diferentes tipos de tumores, o câncer de próstata (CaP) é o segundo mais diagnosticado no mundo, representando o segundo maior causador de mortes, atrás somente do câncer de pele não-melanômico (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). No Brasil, tal doença também é a segunda mais incidente entre indivíduos do sexo masculino, com uma estimativa de 68.220 casos em 2018 e com 13.772 mortes registradas em 2013 (BORGES et al., 2018).

No que concerne à sua etiologia, diferentes fatores têm contribuído para o seu desenvolvimento, dentre os quais se destacam o consumo de álcool e o sexo do paciente (CAO et al., 2015). O uso de tabaco também tem sido correlacionado ao CaP e à outras 17 classes tumorais, devido às diferentes mutações causadas em sequências de DNA e afetando de modo preponderante os tecidos expostos diretamente à fumaça do produto (ALEXANDROV et al., 2016). Além disso, fatores ambientais como a exposição às radiações ultravioleta e raios X, bem como o estilo de vida são definidos como importantes fatores de risco (IRVING et al., 2016.; GALLAGHER; LEROITH, 2015).

O diagnóstico do CaP, em geral, acontece em homens acima dos 65 anos, (CUZICK et al., 2014.; HUSSEIN; SATTURWAR; VAN DER KWAST, 2015), sendo mais frequente em negros (CUZICK et al., 2014). Em se tratando dos sintomas, dores ósseas e abdominais, assim como nocturia e infecções urinárias são verificadas principalmente em estágios mais avançados da doença (YOUNG et al., 2015). De difícil diagnóstico, algumas metodologias são empregadas para a identificação dessa neoplasia (HEGDE et al., 2013).

A dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA) consiste em um dos métodos mais realizados, em que elevados níveis séricos estão relacionados à presença do CaP (GAUDREAU et al., 2016). Todavia, controvérsias em relação a essa estratégia são perceptíveis, pois os níveis limítrofes para este composto glandular específico são de, aproximadamente, 4ng/ml e inúmeros pacientes com valores abaixo deste já foram descritos como portadores da doença, ao mesmo tempo em que outros com quantidades acima não apresentavam tumores malignos (SAINI, 2016). Portanto, diferentes aspectos provocam uma alteração na concentração deste antígeno e a sua quantificação não tem sido precisa para o diagnóstico do CaP representando, muitas vezes, situações clínicas de prostatite ou hiperplasia benigna da próstata (HBP) (A, JEMAL et al., 2015).

O exame de toque digital retal consiste no apalpamento da próstata a fim de avaliar sua rigidez, tamanho e aspectos nodulares; geralmente realizado após a detecção de níveis alterados de PSA (AHL; RIDDEZ; MOHSENI, 2016). A ressonância magnética consiste em um dos métodos de imagem mais precisos disponíveis para a identificação de diferentes doenças, inclusive o CaP (HEGDE et al., 2013). Além disso, a ultrassonografia permite a identificação de alterações na glândula prostática por meio da geração de calor em diferentes pontos, sendo uma técnica mais simples e barata (KM et al., 2017).

Após diagnóstico, os tumores são caracterizados histopatologicamente conforme o sistema TNM (*Tumour Node Metastasis*) e o grau e as pontuações de Gleason (GAUDREAU et al., 2016). O sistema TNM, descrito por Pierre Denoix (1944) denota as condições histopatológicas em que se encontra a doença. Neste, a letra T descreve o tamanho ou

extensão do tumor primário, N o comprometimento linfonodal e M a presença de metástase (APPLE, 2016). Já o Gleason se refere ao quanto as células cancerígenas encontram-se indiferenciadas, o que quanto maior este grau de indiferenciação, pior é o prognóstico associado (GAUDREAU et al., 2016).

Diante da complexidade patológica do CaP, tanto no diagnóstico quanto no acompanhamento clínico da doença, os biomarcadores moleculares têm conquistado um espaço significativo no cenário científico. Um biomarcador é definido como sendo qualquer processo, biomolécula ou fator gênico produzidos pelo organismo em resposta a uma situação adversa (STRIMBU; A TAVEL, 2010). Os biomarcadores tumorais podem, portanto, ser eficientes na caracterização, prevenção e epidemiologia desta enfermidade. Além de um indicador, diversas evidências apontam que estas biomoléculas e eventos genéticos, quando combinados, resultam no processo da carcinogênese. A pesquisa acerca da correlação destes processos moleculares nos inúmeros tipos de câncer se mostra significativa para a redução da mortalidade e morbidade, bem como para evitar procedimentos invasivos e tratamentos desnecessários. Muitos desses biomarcadores são definidos como antígenos associados ao tumor (AATs) e são responsáveis por mediar a resposta imune do paciente (RUNHAN REN et al., 2016).

Para o tratamento dos pacientes são realizadas cirurgias, incluindo a prostatectomia, ou remoção da próstata e a linfadenectomia pélvica, a qual compreende à remoção dos nódulos linfáticos circundantes à glândula e radioterapia. Adicionalmente, também são adotadas a terapia com privação de hormônios andrógenos e a quimioterapia, sendo esta de caráter sistêmico (CHEN, F.; ZHAO, X.,2013).

2.2 A imunologia de tumores

Dois tipos de respostas imunológicas encontram-se relacionadas ao desenvolvimento do CaP. A primeira consiste na supressão da atividade antitumoral inibindo células T efetoras, mediada por linfócitos T- regulatórios, conduzindo à sobrevivência das células cancerígenas e o seu escape para tecidos adjacentes. A segunda resposta está relacionada a uma excessiva condição pró-inflamatória, ocasionada principalmente por linfócitos T efetores e macrófagos, a qual é responsável pela secreção de citocinas e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), favorecendo a angiogênese e o crescimento tumoral (DAI et al., 2017).

Além disso, a síntese de uma importante citocina pró-inflamatória, IL-6 (Interleucina-6), tanto por osteoblastos quanto células T imune efetoras, tem sido observada no CaP, correlacionada a um desenvolvimento tumoral, principalmente em pacientes metastáticos (DAI et al., 2017). Em relação a populações de linfócitos B infiltrantes tumorais, há um

aumento significativo de células do tipo CD20+ em tecidos com CaP e a terapia com anticorpos monoclonais anti-CD20, como o Rituximab, tem se mostrado promissora (WOO et al., 2014; DALGLEISH et al., 2014). Outras evidências apontam respostas pró-inflamatórias mediadas pelo complexo ligante RANKL (Ligante do Receptor ativador do fator nuclear NF- κ B) e receptor RANK (Receptor ativador do fator nuclear NF- κ B), quando expressos em células T efetoras e dendríticas, respectivamente. Esse mesmo complexo molecular medeia a osteoclastogênese (RUNHAN REN et al., 2016; DAI et al., 2017).

Quanto à população de macrófagos encontrada no ambiente tumoral, pode ser dividida entre pró-inflamatória (M1) e anti-inflamatória (M2), sendo os últimos apontados como contribuintes para a tumorigênese e reconhecidos como macrófagos associados ao tumor (RUNHAN REN et al., 2016). Nesse contexto, neutrófilos são também descritos envolvidos na carcinogênese prostática sendo observados em murinos *knockout* para os genes PTEN (Homólogo de fosfatase e tensina) e p53 (PATNAIK et al., 2017), conhecidamente supressores tumorais.

Portanto, diferentes estratégias imunoterápicas, tanto passivas quanto ativas, podem ser empregadas no CaP. A administração de anticorpos monoclonais contra AATs e a modificação de células T autólogas ou heterólogas *In vitro* para a expressão de receptores específicos têm se mostrado como alternativas para o tratamento da doença (RUNHAN REN et al., 2016; GOSWAMI; APARICIO; SUBUDHI ., 2016).

No que concerne à imunidade inata, receptores denominados *Toll-like* (TLR) também estão associados à susceptibilidade para a doença (ZHAO et al., 2014). Destes, o receptor TLR3 tem sido apontado como um supressor tumoral, por induzir processos de apoptose em células cancerígenas (ZHAO et al., 2014; BIANCHI et al.,2017). Dois mecanismos foram propostos para a resposta antitumoral mediada por TLR3, o primeiro relacionado à via das caspases 8 e o segundo dependente de PKC-alfa (Proteína quinase C) (BIANCHI et al.,2017). Contrariamente, um estudo anterior envolvendo 74 pacientes com câncer de mama demonstrou elevados níveis de expressão de TLR3 associados à recorrência tumoral (BIANCHI et al.,2017).

Também o TLR5 tem apresentado atividade antitumoral via ativação de NF- κ B (Fator nuclear potenciador da cadeia leve Kappa de células B ativadas) e conseqüentemente produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento no número de células NK (*Natural Killer*) e linfócitos T CD8+. Uma tentativa imunoterápica contra o desenvolvimento tumoral prostático incluiu a utilização de adenovírus que co-expressam o receptor TLR5 e seus agonistas (METT et al.,2017).

Portanto, diferentes receptores responsáveis por coordenar as respostas do sistema imune inato, bem como estabelecer a ligação deste ao sistema imune adaptativo, apresentam um papel essencial no que condiz ao desenvolvimento tumoral. Torna-se razoável, assim, a compreensão do papel dessas proteínas em tumores, seja em sua etiologia e/ou progressão.

2.3 O receptor TLR2 no Câncer

Das respostas do sistema imunológico de eucariontes superiores como murinos e seres humanos, há aquelas que são desencadeadas por componentes celulares denominados receptores padrão de reconhecimento (RPRs), os quais são responsáveis pela detecção de antígenos provenientes de patógenos, células estressadas ou transformadas. Quando de patógenos, tais fatores são conhecidos como PAMPs (Padrões moleculares associados a patógenos) e, no caso de células funcionalmente alteradas, como DAMPs (Padrões moleculares associados a danos celulares) (MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU, 2016).

A principal classe de RPRs é a dos TLRs (Toll-like), os quais são proteínas transmembrânicas expressas tanto em células do sistema imune inato, como as células dendríticas e os macrófagos, quanto nas não imunológicas, como as epiteliais e os fibroblastos. Tais receptores são estruturalmente formados por uma porção externa, ou ectodomínio, composta de repetições do aminoácido leucina (LRRs, Repetições ricas em leucina), uma porção intramembranar e um domínio intracelular conhecido como TIR (Receptor *Toll-IL1*) (GIOIA; ZANONI., 2015).

O ectodomínio é o responsável pelo reconhecimento de um PAMP ou DAMP específico. O TIR é aquele que recruta diversas moléculas adaptadoras, como MyD88 (Resposta primária de diferenciação mielóide 88), TIRAP (Receptor *Toll-IL1* contendo proteína adaptadora), TRAM (Molécula adaptadora relacionada ao *TRIF*) e TRIF (Interferon-B indutor de adaptador contendo domínio-*TIR*), de modo a transduzir intracelularmente os sinais e estimular a transcrição de diferentes genes como os codificadores de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e interferons tipo 1. Neste processo estão envolvidos fatores de transcrição como NF- κ B, AP-1 (Proteína ativadora-1) e IRFs (Fatores reguladores de Interferons) (KAWASAKI; KAWAI., 2014; GIOIA; ZANONI., 2015).

Os receptores TLR podem ser subdivididos em dois grandes grupos: aqueles localizados na membrana celular e os aderidos em compartimentos intracelulares como em endossomos e lisossomos. Em seres humanos, os TLRs 1, 2, 4,5 e 6 são incluídos no primeiro grupo, enquanto aos TLRs 3, 7, 8 e 9 são intracelulares (DALMARONI, M.; GERSWHIN, M.; ADAMOPOULOS, I., 2016).

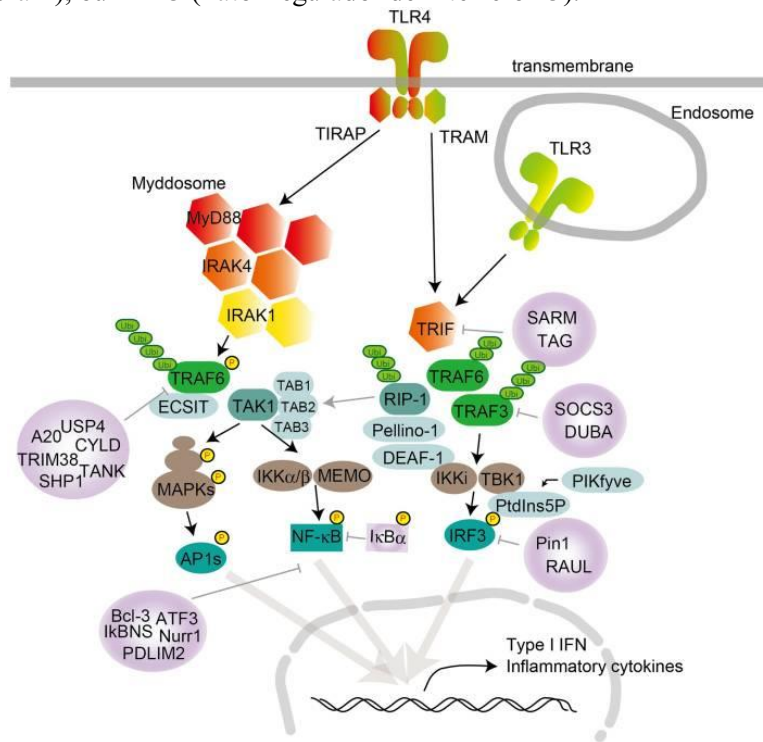
Os receptores TLR2 são proteínas transmembrana responsáveis por desencadear respostas mediante o reconhecimento de PAMPs que incluem lipoproteínas e peptídeoglicanos de bactérias, e de DAMPs, os quais são representados por fatores inflamatórios correlacionados a doenças como o câncer, incluindo o CaP. O TLR2 atua por meio da via de sinalização dependente da proteína acessória MyD88, através da qual há a transdução de sinal desencadeada pelo seu domínio intracelular TIRAP. Este domínio induz a formação do complexo midassômico, constituído por MyD88 e IRAKs 1 e 4 (Quinase associada ao receptor IL-1)(Figura 1) (WEST et al., 2017).

Deste complexo, IRAK 4 é a enzima responsável por fosforilar IRAK 1 promovendo a separação desta segunda quinase do midassomo. IRAK 1, por sua vez irá fosforilar um componente chamado TRAF-6 (Fator associado ao receptor de necrose tumoral 6), envolvido na ativação seguinte de um outro fator, o TAK1 (Quinase de ativação do fator de crescimento B transformado 1). TAK1 é um complexo quinase associado a várias subunidades regulatórias denominadas TABs (Proteínas de ligação a TAK-1), sendo responsável por duas vias de ativação (PROENÇA, 2015; WEST et al., 2017).

Na primeira, se liga ao complexo IKK (Quinase inibidora do fator nuclear NF- κ B), composto pelas subunidades catalíticas IKK α e IKK β junto à proteína reguladora NEMO (Modulador essencial de NF- κ B). NEMO fosforila a proteína inibitória de NF- κ B, que por sua vez é direcionada para a degradação proteossômica celular, tornando NF- κ B livre (Figura 1). O fator de transcrição NF- κ B livre, então, transloca ao núcleo celular e determina a transcrição de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias, como IL-17 e IL-6 (LIU, T. et al., 2017).

A segunda via ativada por TAK1 envolve as MAPKs (Proteínas quinase ativada por mitógeno), tais como ERKs1 (Quinases reguladas por sinal extracelular) e p38, as quais fosforilam fatores de transcrição conhecidos como AP-1, também induzindo a transcrição de mRNAs codificantes de citocinas pró-inflamatórias (Figura1) (SHIHAB, P. et al., 2015).

Figura 1: Ativação das vias de receptores do tipo Toll (TLR) dependente de MyD88 (Resposta primária de diferenciação mielóide 88) e TRIF (Interferon-B indutor de adaptador contendo domínio-*TIR*). A transdução do sinal culmina com a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, envolvendo os fatores de transcrição NF- κ B (Fator nuclear potenciador da cadeia leve Kappa de células B ativadas) e AP-1 (Proteína ativadora-1), ou IRF 3 (Fator regulador de Interferon 3).



Fonte: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/lw/2.0/html/tileshop_pmc/tileshop_pmc_inline.html?title=Click%20on%20image%20to%20zoom&p=PMC3&id=4174766_fimmu-05-00461-g001.jpg. Acesso em Janeiro de 2018.

Co-receptores como CD14 e CD36 também participam na formação de complexos que induzem a maior atividade de TLR2 (SILVA, T. et al., 2017). Experimentos com células dendríticas confirmaram uma melhor resposta imunológica de pacientes com CaP vinculada a menores níveis de CD14 e IL-10 (Interleucina-10) (CASTIELLO et al., 2017). Complexos de sinalização celular formados por CD14-TLR2 são conhecidos por seus papéis essenciais na produção de citocinas pró-inflamatórias, em respostas contra PAMPs e DAMPs (SILVA, T. et al., 2017). Quanto ao CD36, evidências demonstraram uma associação direta entre a sua expressão e níveis elevados de ácidos graxos livres em hepatocarcinoma, câncer de ovário e de boca (LADANYL et al., 2018; NATH et al., 2015; PASCUAL et al., 2016). Porém, o papel desses complexos no CaP ainda não foi elucidado.

No que concerne à via de sinalização TLR2, análises de expressão gênica por microarranjos demonstraram a relação entre o aumento da expressão de *TLR2* e a regulação positiva (*up-regulation*) de seis genes anti-apoptóticos (BCL2: Proteína do Linfoma de células B2, BCL2A1: Proteína BCL2 relacionada a A1, BIRC3: Repetição de IAP Baculoviral contendo proteína 3, IER3: Fator de resposta imediata 3, TNFAIP3: Proteína induzida por TNF-alfa 3) e a regulação negativa (*down-regulation*) de dois genes

supressores tumorais (PDCD4: Morte celular programada 4, TP53INP1: Proteína nuclear induzível da Proteína tumoral p53 1) em tumores gástricos (WEST et al., 2017). Contrariamente, em adenocarcinoma pancreático e duodenal, altos níveis de expressão de TLR2 foram responsáveis por um baixo risco de morte, se mostrando um importante fator prognóstico (LANKI et al.,2017). Já em glioblastoma a associação de TLR2 a HMGB1 (*High Mobility Group Box1*) promoveu uma resposta antitumoral, por meio do recrutamento de células dendríticas (DU et al.,2016).

Considerando o CaP, a regulação gênica, a sinalização celular, a consequente secreção de citocinas e o recrutamento de células imunes relacionadas à ativação de TLR2 ainda necessitam ser descritos. A detecção de polimorfismos no gene TLR2, sobretudo em sua região promotora, tem aberto um caminho promissor na compreensão da resposta imune a tumores. Nesse sentido, os TLRs podem se tornar não somente marcadores de susceptibilidade, como também moléculas-chave na compreensão da biologia da doença.

2.4 Polimorfismos em genes codificadores de *Toll*

Polimorfismos consistem em variações em sequências de DNA incluindo substituições, inserções, deleções ou repetições de pares de bases (pb) responsáveis pela definição de grupos populacionais molecularmente distintos. Essas alterações podem acontecer em decorrência de erros em processos celulares, como a proliferação, ou em consequência da exposição do material genético a patógenos, material radioativo e/ou reagentes químicos (PRIYANKA, 2015).

Polimorfismos de nucleotídeo único (*SNPs*) em diferentes genes têm sido associados ao desenvolvimento do CaP, incluindo o Receptor de Vitamina D (NUNES et al., 2016) e outros genes relacionados ao sistema imune e à resposta inflamatória (LAYTRAGOON et al., 2016; MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU., 2016).

Mutações nos genes da família *TLR*, como uma substituição de uma citosina por uma timina no gene *TLR3* (c.1377 C/T) e a substituição de uma timina por citosina (1237 T/C) no receptor *TLR9* foram relacionadas à susceptibilidade a diferentes cânceres (MANDAL; GEORGE; MITTAL., 2012; AL-HARRAS et al.,2016).Considerando o *TLR2*, mudanças em suas sequências têm sido identificadas e associadas ao desenvolvimento de patologias de natureza inflamatória e à susceptibilidade a doenças crônicas (ZHU et al.,2013).

Uma deleção de 22 bp na posição -196 para -174 da região promotora do gene *TLR2* foi descrita em câncer de colo retal, responsável por diminuir o número de transcritos do receptor (ZHU et al.,2013) e aumentar a susceptibilidade ao câncer gástrico na população japonesa (TAHARA et al.,2007). Já no CaP, apesar de baixa penetrância, essa mutação se

mostrou associada à ocorrência desta doença na população indiana (MANDAL; GEORGE; MITTAL, 2012). Contudo, não existem dados elucidando seu papel na incidência do CaP no Brasil.

Considerando a miscigenação da população brasileira e seus índices alarmantes de ocorrência de tumores prostáticos, o presente trabalho objetivou identificar e avaliar o papel do polimorfismo -196 para -174del do gene *TLR2*, em amostras de DNA obtidas de pacientes diagnosticados com CaP e HPB coletados no Brasil. Hipotetizamos que essa mutação possa ser um marcador de susceptibilidade e, portanto, poderá auxiliar na triagem molecular desses pacientes contribuindo para o seu diagnóstico precoce e ampliando suas chances de cura.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Triagem dos pacientes

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). As amostras de sangue periférico dos pacientes foram coletadas pela equipe de urologia do Hospital de Clínicas da referida instituição. O protocolo experimental foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa sob o número de parecer 005/2001 e o Termo de Consentimento Livre Esclarecido foi obtido de cada participante. A triagem para obtenção dos grupos de estudo, estabelecida pela equipe urológica, foi iniciada para os pacientes acima de 50 anos, sem história familiar do câncer de próstata. Para os pacientes com histórico familiar e da raça negra, a coleta incluiu homens a partir dos 40 anos. Os sintomas do trato urinário inferior, que frequentemente estão relacionados à presença da HPB foram avaliados. Foi realizado o exame digital e as dosagens bioquímicas do PSA. Foram incluídos nesse estudo 46 pacientes. Destes, 23 foram diagnosticados com CaP (idade média de 63.08 anos \pm 8.74) e 23 com HPB (idade média de 66.77 anos \pm 9.46). Para o primeiro grupo, a média do PSA foi de 6.91ng/uL (\pm 3.59) e para o segundo 11.32 ng/uL (\pm 13.70). Para o grupo de casos, as características histopatológicas da doença foram consideradas sendo 77.27% dos tumores classificados como T1-T2 e 22.73% como T3-T4. Quanto ao score de Gleason, 4.35% apresentaram lesões \geq 7 e 95.65% $<$ 7.

3.2 Extração de DNA e detecção do polimorfismo -196/-174 del

O DNA do sangue foi extraído seguindo os procedimentos descritos anteriormente (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS., 1989). Três microlitros do material foram analisados por eletroforese horizontal, em gel de agarose 0,8%, tampão TBE (45mM Tris Borato-EDTA, pH 8,3 e 1mM EDTA) 0,5X, corado com gel red e visualizado por luz

ultravioleta (sistema de video documentação – Loccus Biotecnologia). Após avaliação, o ácido desoxirribonucléico foi armazenado à -20°C .

O polimorfismo *TLR2* -196 para -174del foi investigado por meio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) alelo-específica preparada para um volume final de 25 μL contendo: 200ng de DNA genômico, 0,2 μM dos oligonucleotídeos iniciadores (TAHARA et al.,2007), 200 μM de dNTPs, 0,5U de Platinum Taq DNA Polimerase, 1X Tampão da TaqDNA Polimerase (Invitrogen) e 0,5mM de MgCl_2 . Para a amplificação, o DNA foi desnaturado a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos. Foi realizada uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Reação de controle negativo interno, sem o DNA, foi incluída para monitorar possíveis contaminações dos reagentes.

Os produtos foram resolvidos em gel de agarose 3,5% preparado em tampão TAE (Tris Acetato-EDTA) corado com gel red (Uniscience) a 1X, submetido à voltagem constante de 50 volts por 6 horas e posteriormente visualizado em transluminador de luz ultravioleta e foto documentados em sistema de video-documentação (Loccus Biotecnologia).

3.3 Análises Estatísticas

As comparações das frequências genótípicas e alélicas com os dados referentes ao laudo, idade, níveis séricos de PSA pré-operatório, TNM e grau de Gleason foram conduzidas por meio do teste de Chi-quadrado com o auxílio do *software* GraphPadPrism 7 (GraphPad Software, La Jolla,CA, USA). O teste de *oddsratio* (OR) foi determinado a fim de se verificar a chance de ocorrência do CaP na presença dos polimorfismos. Estas e as análises concernentes ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para os alelos identificados foram realizadas no *software* BioEstat (5.0). Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $P < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A família *Toll-like* representa o principal grupo dos receptores-padrão de reconhecimento encontrado em eucariontes superiores, sendo uma das principais vias de sinalização e interface entre o sistema imune inato e o adaptativo. São fundamentais no reconhecimento de PAMPs e DAMPs e desempenham um papel crucial na biologia dos tumores, incluindo o CaP (GOULOPOULOU, S.; MCCARTHY, C. G.; WEBB, R. C., 2015). No presente trabalho, avaliamos uma deleção pontual na região promotora do gene *TLR2*, a fim de estabelecer um padrão molecular de susceptibilidade ao CaP.

A população brasileira é representada por cerca de 209.115.147 indivíduos, segundo o IBGE (2018). Uma de suas principais características consiste em sua elevada miscigenação. Conta com ancestralidade de índios, portugueses e negros, resultando na origem de mulatos, cruzamento entre brancos e negros, nos caboclos (brancos e índios) e nos cafuzos (índios e negros). Além disso, possui também a presença de europeus e asiáticos (SCHWARCZ, 2012).

Este estudo foi desenvolvido em um centro de tratamento oncológico, garantindo a representatividade da população quanto à raça e nível socioeconômico. Entretanto, ainda não está claro qual o efeito funcional desse receptor no risco ao CaP. Sugere-se que a ativação de receptores *Toll* conduz à ativação do sistema imune e consequente combate do tumor. Por outro lado, um ambiente pró-inflamatório pode promover a carcinogênese, crescimento tumoral e quimioresistência (TSAN, 2006). Compreender, portanto, o funcionamento molecular dessas proteínas pode auxiliar na definição de novas terapias baseadas em assinaturas genéticas.

Os pacientes brasileiros foram eficientemente genotipados para o polimorfismo -196/-174del e o padrão obtido encontra-se representado na Figura 2. A banda de 286pb, quando sozinha, foi considerada como selvagem; a de 264pb como genótipo homozigoto e o heterozigoto quando as bandas de 286pb e 264pb estavam presentes.

Foram aqui incluídos um total de 46 indivíduos (23 CaP e 23 HPB) (Tabela 1). Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as idades e os valores de PSA entre os grupos de estudo ($p = 0,12$ e $p = 0,17$, respectivamente). No entanto, vale ressaltar os níveis médios mais altos do antígeno prostático em indivíduos com HPB. A frequência genotípica se mostrou em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os genótipos não diferenciaram os pacientes de CaP e HPB, contudo, houve uma maior prevalência do alelo deletério em homens acometidos pela doença.

Figura 2: Padrão de genotipagem obtido para o polimorfismo -196/-174del do gene *TLR2*. Coluna 3: paciente com CaP. Colunas 1,2,4,5 e 6: pacientes com HPB. Em 1, 2, 4 e 5 estão representados os indivíduos de genótipo Ins/Ins. Em 3 e 6 homens Ins/Del. Não estão representados indivíduos Del/Del. Em 7 e 8 o controle interno de reação.

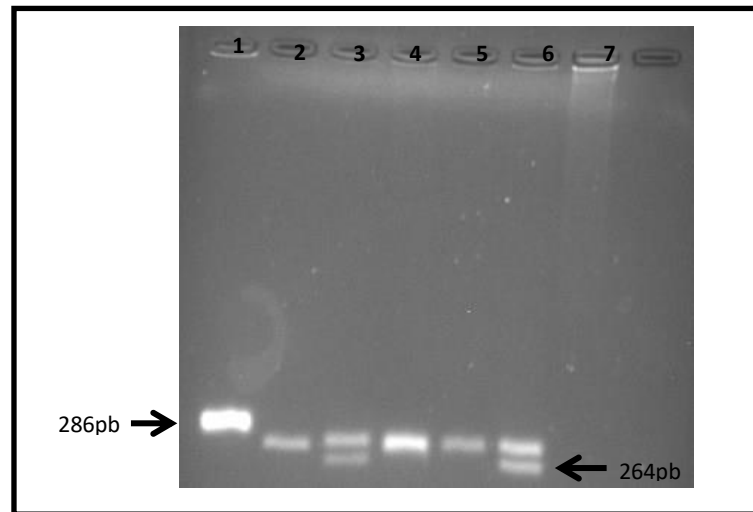


Tabela 1: Frequência genotípica e alélica para o polimorfismo -196/-174del do gene *TLR2* nos grupos de estudo (CaP: indivíduos com Câncer de Próstata e HPB: indivíduos com Hiperplasia Prostática Benigna), categorizados conforme a idade e valores de PSA sérico.

SNP	CaP (N=23)			HPB (N=23)		
	N (%)	*Age	*PSA	N (%)	*Age	*PSA
-196/-174del						
Ins/Ins	11.00 (47.83)	62.54 (11.45)	6.07 (2.89)	14.00 (60.87)	64.69 (10.47)	14.03 (16.80)
Ins/Del	10.00 (43.48)	64.20 (6.11)	6.70 (3.62)	7.00 (30.43)	68.28 (7.70)	5.25 (4.40)
Del/Del	2.00 (8.69)	60.50 (ND)	11.97 (ND)	2.00 (8.70)	75.00 (ND)	13.28 (ND)
Frequência de Ins	32 (69.57)			35 (76.09)		
Frequência deDel	14 (30.43)			11 (23.91)		
$\S P_{HWE}$	0.90			0.43		
$P\chi^2$	${}^1PCa \times BPH = 0.64$	${}^2PCa \times BPH = 0.64$				

*: mean (\pm SD)

$\S P_{HWE}$: equilíbrio de Hardy-Weinberg

$P\chi^2$: teste qui-quadrado (1: comparação entre genótipos; 2: comparação entre alelos).

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

ND: não determinado

A influência do polimorfismo -196/-174del já foi anteriormente caracterizada, com atuação da deleção no perfil epidemiológico da doença na Índia (MANDAL, R.; GEORGE, G.; MITTAL, D., 2012). Além disso, na população japonesa, esse polimorfismo foi associado a estágios de desenvolvimento tumoral primário e avançado (TAHARA, T. et al., 2007). Importante ressaltar que todos os pacientes incluídos nesse estudo tiveram seu diagnóstico

confirmado histopatologicamente. Contudo, nenhum dos genótipos aumentou a chance de ocorrência da doença em relação aos pacientes hiperplásicos (Tabela 2). Novamente, houve uma maior prevalência do alelo deletério nos indivíduos acometidos pela neoplasia.

Tabela 2: Polimorfismo -196/-174del do gene *TLR2* e a susceptibilidade ao CaP em indivíduos brasileiros.

SNP	CaP (N=23) N(%)	HPB (N=23) N(%)	Odds	95% IC	P
<i>-196/-174del</i>					
Ins/Ins	11.00 (47.83)	14.00 (60.87)	1.00	Referência	-
Ins/Del	10.00 (43.48)	7.00 (30.43)	0.55	0.16-1.92	0.53
Del/Del	2.00 (8.69)	2.00 (8.70)	0.79	0.10-6.50	0.75
Modelo baseado em deleção					
Ins/Del + Del/Del	12.00 (52.17)	9.00 (39.13)	1.00	Referência	-
Ins/Ins	11.00 (47.83)	14.00 (60.87)	1.70	0.53-5.47	0.55
Modelo baseado em inserção					
Ins/Del + Ins/Ins	21.00 (91.31)	21.00 (91.30)	1.00	Referência	-
Del/Del	2.00 (8.69)	2.00 (8.70)	1.00	0.13-7.78	0.60

*: dado significativo; ND: não determinado; CI: intervalo de confiança.

Os pacientes com CaP foram posteriormente categorizados conforme os dados clínicos (PSA) e histopatológicos (Gleason e TNM) importantes para o acompanhamento da doença (Tabela 3). Nenhuma análise referente ao risco relacionado à doença associado aos genótipos se mostrou significativa.

Polimorfismos em diferentes receptores *Toll-like* têm sido correlacionados à susceptibilidade a vários tipos de cânceres. A deleção na região promotora presentemente avaliada foi correlacionada ao aumento significativo ao risco de desenvolvimento do câncer de nasofaringe em populações do Norte da Turquia (MAKNI, L. et al., 2017). No entanto, este mesmo estudo, ao comparar os diferentes genótipos conforme a classificação TNM, também não encontrou associações significativas (MAKNI, L. et al., 2017). Mandal e colaboradores (2012) não identificou nenhuma contribuição desse polimorfismo com as pontuações Gleason (<7, 7 e >7) ou ocorrência de metástases em uma população do Norte da Índia (MANDAL, R.; GEORGE, G.; MITTAL, D., 2012), corroborando nossos resultados.

Tabela 3: Polimorfismo -196/-174del do gene *TLR2* agrupado em pacientes com Câncer de Próstata com diferentes níveis séricos de PSA, pontuação de Gleason e TNM.

SNP	PSA N (%)		Odds (95% CI)	P	Gleason N (%)		Odds (95% CI)	P	TNM N (%)		Odds (95% CI)	P
	<10 ng/mL	≥10 ng/mL			<7	≥7			T1-T2	T3		
-196/-174del												
Ins/Ins	09 (45.00)	01 (5.00)	1.00	Ref.	04 (17.39)	07 (30.43)	1.00	Ref.	10 (45.45)	01 (4.55)	1.00	Ref.
Ins/Del	06 (30.00)	02 (10.00)	3.00 (ND)	0.83	05 (21.74)	05 (21.74)	1.00 (0.20-5.07)	0.68	05 (22.73)	04 (18.18)	8.00 (ND)	0.19
Del/Del	01 (5.00)	01 (5.00)	9.00 (ND)	0.72	01 (4.35)	01 (4.35)	1.00 (ND)	0.44	02 (9.09)	00 (0.00)	ND	ND
Modelo baseado em deleção												
Ins/Del + Del/Del	07 (35.00)	03 (15.00)	1.00	Ref.	06 (26.09)	06 (26.09)	1.00	Ref.	07 (31.82)	04 (18.18)	1.00	Ref.
Ins/Ins	09 (45.00)	01 (5.00)	0.26 (ND)	0.58	04 (17.39)	07 (30.43)	1.75 (0.33-9.30)	0.81	10 (45.45)	01 (4.55)	0.18 (0.02-1.92)	0.30
Modelo baseado em inserção												
Ins/Del + Ins/Ins	15 (75.00)	03 (15.00)	1.00	Ref.	09 (39.13)	12 (52.17)	1.00	Ref.	15 (68.18)	05 (22.73)	1.00	Ref.
Del/Del	01 (5.00)	01 (5.00)	5.00 (0.24-104.15)	0.85	01 (4.35)	01 (4.35)	0.75 (0.04-13.58)	0.58	02 (9.09)	00 (00.00)	ND	ND

ND: não determinado; **CI:** intervalo de confiança; **Ref.:** Referência

A limitação de nosso estudo consiste no pequeno número de indivíduos analisados. Portanto, torna-se necessário genotipar mais pacientes, para assim determinar o papel da mutação -196/-174del no CaP. Além disso, diante da complexidade da doença, torna-se imprescindível a busca dos efeitos moleculares dessa alteração na doença.

Avaliações dos níveis de expressão do gene *TLR2* em pacientes com CaP conforme os diferentes genótipos ainda não foram realizadas. Estudos adicionais devem ser conduzidos visando avaliar o efeito funcional da deleção -196/-174 na quantidade, estabilidade e isoformas dos transcritos. Além disso, a caracterização dos fatores de transcrição recrutados à região promotora também auxiliará na compreensão do funcionamento gênico e sua relação com a doença.

5 CONCLUSÃO

O polimorfismo -196/-174 do gene *TLR2* não foi associado à susceptibilidade ao Câncer de Próstata (CaP) em homens brasileiros. No entanto, um maior número de indivíduos deve ser analisado, bem como estudos adicionais devem ser conduzidos visando avaliar a

quantidade e estabilidade das isoformas deste gene. Portanto, estudos posteriores que correlacionem o polimorfismo -196/-174 deste importante gene, codificante de um dos principais representantes do sistema imune inato, necessitam ser realizados a fim de avaliar as funções do receptor *TLR2* em lesões malignas da próstata.

REFERÊNCIAS

A, JEMAL.et al. Prostate Cancer Incidence and PSA Testing Patterns in Relation to USPSTF Screening Recommendations. **American Medical Association**, v. 314, n. 19, p.2054-2061, nov 2015. Jama.

AHL, R.; RIDDEZ, L.; MOHSENI, S. Digital rectal examination for initial assessment of the multi-injured patient: Can we depend on it?.**Annals of Medicine & Surgery**, v.9, p.77-81, ago 2016.Elsevier.

ALEXANDROV, L.B. et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. **American Association for the Advancement of Science (AAAS)**, v.354, p.618-622, nov 2016. Science.

AL-HARRAS, M.et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase π 1 and toll-like receptors 2 and 9: Association with breast cancer susceptibility.**Oncology Letters**, v.11, n.3, p.2182-2188, mar 2016. Spandidos Publications.

APPLE, S.Sentinel Lymph Node in Breast Cancer: Review Article from a Pathologist's Point of View. **The Korean Society of Pathologists**, v.50, n.2, p. 83-95, mar 2016. Journal of Pathology Translational Medicine.

BIANCHI,F.et al. Exploiting poly(I: C) to induce cancer cell apoptosis. **Cancer Biology &Therapy**,v. 18, n. 10, p.747-756, set 2017. Taylor &Francis.

BORGES,A.et al. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Inca, 2018. 130 p.

CAO,Y.et al. Light to moderate intake of alcohol, drinking patterns, and risk of cancer: results from two prospective US cohort studies. **The BMJ**, v.351, p.4238, jan 2015. BMJ

CASTIELLO, L. et al. Expression of CD14, IL10, and Tolerogenic Signature in Dendritic Cells Inversely Correlate with Clinical and Immunologic Response to TARP Vaccination in Prostate Cancer Patients. **American Association for Cancer Research (AACR)**, v. 23, n. 13, p.3352-3364, jan 2017. Clinical Cancer Research.

CHEN, F.; ZHAO, X. Prostate Cancer: Current Treatment and Prevention Strategies. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 15, n. 4, p.279-284, 5 abr 2013. Kowsar Medical Institute.

CUZICK, J. et al. Prevention and Early Detection of Prostate Cancer. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 11, p.484-492, out 2014. The Lancet.

DAI, J. et al. Immune mediators in the tumor microenvironment of prostate cancer. **Chinese Journal Of Cancer**, v.36, n.1, p.1-4, mar 2017. Springer Nature.

DALGLEISH, A. et al. Rituximab for treating CD20+ prostate cancer with generalized lymphadenopathy: a case report and review of the literature. **Investigational New Drugs**, v. 32, n. 5, p.1048-1052, jan 2014. Springer Nature.

DALMARONI, M.; GERSWHIN, M.; ADAMOPOULOS, I. The critical role of toll-like receptors – From microbial recognition to autoimmunity: a comprehensive review. **Autoimmunity Revivs**, v.15, n.1, p.1-8, jan2016. Elsevier B.V.

DU, B. et al. Targeting Toll-like receptors against cancer. **OAE Publishing**, v. 2, n. 12, p.463-470, dez 2016. Journal Of Cancer Metastasis And Treatment.

GALLAGHER, E.J.; LEROITH, D. Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality. **American Physiological Society**, v. 95, n. 3, p.727-748, jul 2015. Physiological Reviews.

GAUDREAU, P. et al. The Present and Future of Biomarkers in Prostate Cancer: Proteomics, Genomics, and Immunology Advancements. **Biomarkers In Cancer**, v.82, p.15-33, jan 2016.

GIOIA, M.; ZANONI, I. Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response. **Molecular Immunology**, v.63, n.2, p.143-152, fev 2015. Elsevier BV.

GOSWAMI, S.; APARICIO, A.; SUBUDHI, S. Immune Checkpoint Therapies in Prostate Cancer. **The Cancer Journal**, v. 22, n.2, p.117-120, 2016. Ovid Wolters Kluwer.

GOULOPOULOU, S.; MCCARTHY, C. G.; WEBB, R. C. Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within. **Pharmacological Reviews**, v. 68, n. 1, p.142-

167, 31 dez 2015. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET).

HASSANPOUR, H.S.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research And Practice**, v.4, n.4, p. 127-129, dez 2017. Elsevier B.V.

HEGDE, J. et al. Multiparametric MRI of prostate cancer: An update on state-of-the-art techniques and their performance in detecting and localizing prostate cancer. **Journal Of Magnetic Resonance Imaging**, v. 37, n. 5, p.1035-1054, abr 2013. Wiley-Blackwell.

HUSSEIN; SATTURWAR; VAN DER KWAST. Young-age prostate cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 68, n.7, p.511-515, jul 2015. BMJ Journals.

IBGE. **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação**. 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>. Acesso em: 5 maio de 2018.

IRVING, B. et al. Knowing the Enemy: Health Care Provider Knowledge of Computed Tomography Radiation Dose and Associated Risks. **Journal Of Medical Imaging And Radiation Sciences**, v. 47, n. 3, p.243-250, set 2016. Elsevier BV.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. **Frontiers In Immunology**, v. 5, p.1-5, set 2014. Frontiers Media SA.

KM, S. et al. Therapeutic Ultrasound and Prostate Cancer. **Seminars in Interventional Radiology**, v. 34, n. 2, p.187-200, jun 2017. Thieme Medical Publishers.

LADANYI, A. et al. Adipocyte-induced CD36 expression drives ovarian cancer progression and metastasis. **Oncogene**, v.37, n.17, p.2285-2301, fev 2018. Springer Nature.

LANKI, M. et al. TLR2 and TLR4 predict favourable prognosis in early pancreatic cancer. **Pancreatology**, v. 17, n. 3, p.21-22, jul 2017. Elsevier BV.

LAYTRAGOON, N. et al. Single-Nucleotide Polymorphisms and Cancer Risk, Tumor Recurrence, or Survival of Head and Neck Cancer Patients. **Oncology**, v. 92, n. 3, p.161-169, dez 2016. S. Karger AG.

LIU, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v.2, p.17023, jul 2017. Springer Nature.

LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. 8 ed. USA: W.H. Freeman and Company, 2016.

MAKNI, L. et al. TLR2 (-196 to -174 Ins/Del) and TLR3 (1377C>T) as biomarkers for nasopharyngeal cancer in Tunisia. **Turkish Journal Of Medical Sciences**, v. 47, p.1216-1222, 2017. The Scientific and Technological Research Council of Turkey.

MANDAL, R.; GEORGE, G.; MITTAL, R. Association of Toll-like receptor (TLR) 2, 3 and 9 genes polymorphism with prostate cancer risk in North Indian population. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 7, p.7263-7269, jul 2012.

METT, V. et al. Mobilan: a recombinant adenovirus carrying Toll-like receptor 5 self-activating cassette for cancer immunotherapy. **Oncogene**, v.37, n. 4, p.439-449, out 2017. Springer Nature.

MUKHERJEE, S.; KARMAKAR, S.; BABU, S. TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p.193-204, mar 2016. Elsevier BV.

NATH, A. et al. Elevated free fatty acid uptake via CD36 promotes epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p.1-7, out 2015. Springer Nature.

NUNES, S. et al. Association of vitamin D receptor variants with clinical parameters in prostate cancer. **Springerplus**, v. 5, n. 1, p.1-11, mar 2016. Springer Nature.

ONU. **OMS: câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo**. 2017. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>>. Acesso em: 3 fevereiro de 2017.

PASCUAL, G. et al. Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. **Springer Nature**, v. 541, n. 7635, p.41-45, dez 2016. Nature.

PATNAIK, A. et al. Cabozantinib Eradicates Advanced Murine Prostate Cancer by Activating Antitumor Innate Immunity. **American Association for Cancer Research (AACR)**, v. 7, n. 7, p.750-765, mar 2017. Cancer Discovery.

PRIYANKA. Review on Gene polymorphism. **Journal of Pharmacology and Toxicological studies**, v.3, n.2, p. 1-5, mai 2015. Research And Reviews.

PROENÇA, M.A. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 21, n. 25, p.7730-7741, jul 2015. Baishideng Publishing Group Inc.

RUNHAN REN, et al. A primer on tumour immunology and prostate cancer immunotherapy. **Journal de l'Association des urologues du Canada**, v. 10, n. 1-2, p.60-65, fev 2016. Canadian Urological Association Journal.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, v. 2, n. 39, p.97-106, jan 2016. SpringerLink.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Nova York: Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHWARCZ, L. Do preto, do branco e do amarelo: sobre o mito nacional de um Brasil (bem) mestiçado. **Ciência e Cultura**, v.64, n.1, jan 2012. Sociedade Brasileira para o progresso da ciência.

SHIHAB, P. et al. TLR2 and AP-1 /NF-kappaB are involved in the regulation of MMP-9 elicited by heat killed *Listeria monocytogenes* in human monocytic THP-1 cells. **Journal of Inflammation**, v.12, n.1, p.1-9, abril 2015. BioMedCentral.

SIEGEL, R.L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. **Cancer statistics, 2018**. *Ca: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 68, n. 1, p.7-30, jan 2018. American Cancer Society.

SILVA, T. et al. CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. **Scientific Reports**, v.7, n.1, aug 2017. Nature.

STRIMBU, Ketal. What are biomarkers? **Current Opinion In HIV And Aids**, v.5, n.6, p.463-466, nov 2010.

TAHARA, T. et al. Toll-like receptor 2 -196 to 174del polymorphism influences the susceptibility of Japanese people to gastric cancer. **Japanese Cancer Association**, v. 98, n. 11, p.1790-1794, nov 2007. Cancer Science.

TSAN, M. Toll-like receptors, inflammation and cancer. **Seminars In Cancer Biology**, v. 16, n. 1, p.32-37, fev 2006. Elsevier BV.

WEINBERG, R.A. *The biology of CANCER*. 2 ed. Massachusetts: Garland Science (GS), 2014.

WEST, A. C. et al. Identification of a TLR2-regulated gene signature associated with tumor cell growth in gastric cancer. **Oncogene**, v. 36, n. 36, p.5134-5144, maio 2017. Springer Nature.

WOO, J. R. et al. Tumor infiltrating B-cells are increased in prostate cancer tissue. **Journal Of Translational Medicine**, v.12, n.1, p. 30-38, jan 2014. Springer Nature.

YOUNG, S. et al. Systematic review of clinical features of suspected prostate cancer in primary care. **Canadian Family Physician**, v. 61, n. 1, p.26-35, jan 2015.

ZHAO, S. et al. Toll-Like Receptors and Prostate Cancer. **Frontiers In Immunology**, v. 5, p.1-6, jul 2014. Frontiers Media SA.

ZHU, L. et al. Association of TLR2 and TLR4 Polymorphisms with Risk of Cancer: A Meta-Analysis. **Plos One**, v. 8, n. 12, p.82-85, dez 2013.