

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LAURA DE CASTRO REZENDE

ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO Thr399Ile DO GENE *TLR-4* E A
SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE PRÓSTATA

PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2020

LAURA DE CASTRO REZENDE

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO Thr399Ile DO GENE TOLL-LIKE 4 E A
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

**Orientadora: Profa. Dra. Thaise Gonçalves de
Araújo**

**PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2020**

LAURA DE CASTRO REZENDE

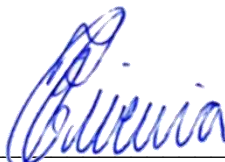
Associação entre o polimorfismo Thr399Ile do gene *Toll-like 4* e a susceptibilidade ao câncer de próstata

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 Dra. Thaise Gonçalves de Araújo - Instituto de Biotecnologia
Presidente



Professora Dra. Terezinha Aparecida Teixeira - Instituto de Biotecnologia
Membro



Professora Dra. Luciana Almeida de Oliveira - Instituto de Biotecnologia
Membro

Patos de Minas - MG, 16 de Dezembro de 2020.

AGRADECIMENTOS

A seção de agradecimentos é de grande importância para mim, afinal acredito que nada se conquista sem a participação de pessoas especiais. Registro aqui meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma ajudaram para o meu crescimento pessoal e profissional! A todos o meu muito obrigada!

Gostaria de agradecer primeiramente a minha querida orientadora Thaise Gonçalves de Araújo, um exemplo de pessoa, pesquisadora e docente. Obrigada por ser inspiração e por acreditar no meu potencial. Agradeço pela disponibilidade, pela compreensão e pela paciência para comigo diante de todas as dificuldades para realização do nosso trabalho. Não há como expressar a gratidão que eu sinto, muito obrigada!

Agradeço à minha família, pois sem vocês a vida não faria sentido! A minha mãe, Kátia Simone, e a meu pai, Ricardo, pelo dom da vida e por serem pais tão maravilhosos. Amo e admiro vocês dois! A minha melhor amiga e amada irmã Maria Eugênia por estar sempre comigo mesmo de longe, sempre escutando e apoiando. A vovó Helena por simplesmente ser a mais linda e doce vovó do mundo! Agradeço a vocês pelo amor incondicional, pelos ensinamentos, pelo exemplo, pela compreensão, pela união nos momentos alegres e tristes, pela torcida e por serem meu porto seguro. Vocês são minha vida, amo muito vocês!!

A minha gatinha Jajá por ser tão carinhosa e engraçada. O ronronar mais gostoso e dentinho mais lindo que já vi! A sua presença e companhia foram essenciais para mim, mamãe te ama muito!

Ao meu amigo irmão Vini por tornar a vida mais leve. Obrigada pela amizade, amor, risadas, conversas e por estar comigo sempre. Agradeço de coração por todas as nossas trocas, eu amo você muito! Aos amigos Babi e Luquinhas por serem minha segunda família de Patos, por todo carinho e amor que construímos, amo vocês! A Camila pelo companheirismo e amizade sem julgamentos. Ao Pê, Fer, Eric, Bia pela amizade sincera ao longo desses cinco anos, levarei nossa amizade para vida toda, obrigada!

As minhas amigas da vida: Maria Luiza e Camila. Obrigada por estarem comigo desde sempre, por serem as melhores, pela cumplicidade, pelos conselhos, risadas e momentos vividos. Vocês são tudo pra mim, amo vocês!

Aos professores da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) Campi Patos de Minas, pelos ensinamentos. Em especial Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira por aceitar fazer parte desta banca, obrigada!

À técnica Luciana por ter me acolhido, pelos ensinamentos e pela prestatividade. Obrigada também pela agradável companhia durante meu tempo no laboratório e por aceitar fazer parte desta banca!

Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram! Sem vocês este trabalho não teria sido concluído, obrigada a todos!

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo tumor mais frequente em homens e a segunda maior causa de morte pela doença. A descoberta de biomarcadores pode contribuir para o diagnóstico precoce, ampliando as chances de cura e direcionando novas estratégias terapêuticas. Polimorfismos genéticos são essenciais na definição de grupos de risco, sejam estes relacionados à resistência terapêutica ou ao desenvolvimento de doenças graves como o câncer. Os receptores Toll-like (TLRs) são receptores da imunidade inata que ativam vias de sinalização pró-inflamatórias em resposta a danos intracelulares ou a padrões associados a patógenos. O receptor TLR4 é capaz de reconhecer lipopolissacarídeos, mas também relacionado ao desenvolvimento de tumores. Nossa proposta foi avaliar o polimorfismo Thr399Ile do gene *TLR4* e sua associação com o risco de ocorrência do CaP. Foram analisados 29 pacientes com CaP e 22 com hiperplasia prostática benigna (HPB), genotipados por PCR-RFLP, utilizando a enzima *Hinf*I. Os genótipos encontrados foram CC-homozigotos normais (16 com CaP e 11 com HPB), TT-homozigotos mutantes (10 com CaP e 10 com HPB) e CT-heterozigotos (3 com CaP e 1 com HPB). Contudo, em ambos os grupos de estudo, os genótipos não se encontravam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Além disso, as frequências genotípicas não diferiram estatisticamente entre os indivíduos com CaP e HPB sem correlação com dados clínicos e anatomopatológicos como PSA (Antígeno Prostático Específico), escore de Gleason e TNM. Quanto à distribuição alélica, o alelo C foi mais frequente nos pacientes com CaP, contudo sem significância estatística. Estudos com um maior número de participantes e ensaios funcionais são necessários para elucidar o papel dessa variante no CaP.

Palavras-chave: Câncer de Próstata. Polimorfismo. Biomarcador. SNP. TLR4.

ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the second most common tumor in men and the second leading cause of death from cancer in this group. The discovery of biomarkers can contribute to early diagnosis, increasing the chances of cure and directing new therapeutic strategies. Genetic polymorphisms are essential in defining risk groups, whether related to therapeutic resistance or to the development of chronic diseases such as cancer. Toll-like receptors (TLRs) are innate immunity receptors that activate pro-inflammatory signaling pathways in response to intracellular damage or patterns associated with pathogens. The TLR4 receptor recognizes lipopolysaccharides, but is also related to the development of tumors. Our aim was to evaluate the Thr399Ile polymorphism of the TLR4 gene and its association with the risk of PCa occurrence. Twenty-nine patients with PCa and 22 with benign prostatic hyperplasia (BPH), genotyped by PCR-RFLP, were analyzed using the enzyme Hinf I. The genotypes found were normal homozygous-CC (16 with PCa and 11 with BPH), mutant homozygous-TT (10 with PCa and 10 with BPH) and heterozygous-CT (3 with PCa and 1 with BPH). However, in both groups, the genotypes were not in Hardy-Weinberg equilibrium. In addition, genotypic frequencies were not statistically different between individuals with PCa and BPH without correlation with clinical and anatomopathological data such as PSA (Prostatic-Specific Antigen), Gleason score and TNM. For the allelic distribution, the C allele was more frequent in patients with PCa, however without statistical significance. Studies with a larger number of participants and functional tests are needed to elucidate the role of this polymorphism in PCa.

Keywords: Prostate Cancer. Polymorphism. Biomarker. SNP. TLR4.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%: Porcentagem
°C: Graus Celsius
A: Adenina
AP-1: Proteína ativadora 1
APC: Células Apresentadoras de Antígeno
AR: Receptor de Androgênio
BPH: *Benign Prostatic Hyperplasia*
C: Citosina
CaP: Câncer de Próstata
CD14: Grupo de diferenciação 14
DAMP: Padrões Moleculares Associados a Danos
DC: Células Dendríticas
DNA: Ácido desoxirribonucleico
dNTP: Desoxirribonucleico fosfatado
DP: Desvio padrão
DRE: Exame reto digital
ECD: Ectodomínio
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio
G: Guanina
HBP: Hiperplasia Prostática Benigna
IFN: Interferon
IKK: Quinase inibidora do fator nuclear NF-κB
IL-17: Interleucina-17
IL-6: Interleucina-6
INCA: Instituto Nacional do Câncer
IRAK: Quinase associada ao receptor IL-1
IRF3: Fatores reguladores de Interferons-3
JNK: JUN N-terminal quinase
KCl: Cloreto de Potássio
LBP: Proteína de ligação ao LPS
LRR: Repetições ricas em leucina
LPS: Lipopolissacarídeo
MAPKs: Proteína quinase ativada por mitógeno
MAT: Microambiente Tumoral
MD-2: Proteína de diferenciação mielóide 2
mg: Miligrama (s)
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MHC: Complexo principal de histocompatibilidade
mM: Milimolar
MyD88: Resposta primária de diferenciação mielóide 88
ng: Nanograma (s)
NEMO: Modulador essencial de NF-κB
NF-κB: Fator nuclear potenciador da cadeia leve Kappa de células B ativadas
NK: *Natural-killer*
OMS: Organização Mundial da Saúde
OR: *Odds Ratio*
PAMP: Padrões moleculares associados a patógenos

pb: Pares de bases
PCa: *Prostate Cancer*
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PPR: Receptores Padrão de Reconhecimento
PR: Prostatectomia radical
PSA: Antígeno Prostático Específico
RFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição
RPRs: Receptores padrão de reconhecimento
SI: Sistema Imunológico
SNC: Sistema Nervoso Central
SNPs: Polimorfismos de nucleotídeo único
T: Timina
TAE: Tris Acetato-EDTA
TAK1: Quinase de ativação do fator de crescimento B transformado1
TAM: Macrófagos associados ao tumor
Taq: *Thermus aquaticus*
TBE: Tampão Tris/Borato/EDTA
TBK1: Quinase de ligação TANQUE 1
TIR: Receptor de Toll/Interleucina 1
TIRAP: Receptor *Toll-IL1* contendo proteína adaptadora
TLR: Receptor *Toll-like*
TLR4: Toll-like Receptor 4
TNF: Fator de Necrose Tumoral
TNM: *Tumour Node Metastasis*
TRAF6: Fator associado ao receptor de necrose tumoral 6
TRAM: Molécula adaptadora relacionada ao *TRIF*
TRIF: Interferon-B indutor de adaptador contendo domínio-*TIR*
uL: Microlitro (s)
UFU: Universidade Federal de Uberlândia
USTR: Ultrassonografia Transretal da Próstata

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
1.1 A próstata e suas alterações patológicas.....	10
1.2 Diagnóstico e tratamento do Câncer de Próstata.....	12
1.3 O sistema imunológico no câncer.....	15
1.4 Os receptores TLR4.....	17
1.5 Polimorfismos em genes que codificam TLRs e sua relação com câncer.....	20
OBJETIVOS.....	22
Objetivo geral.....	22
Objetivos específicos.....	22
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
1.6 Obtenção das amostras e extração de DNA.....	22
1.7 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	23
1.8 Genotipagem do polimorfismo Thr399Ile.....	24
1.9 Análise estatística dos dados.....	24
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

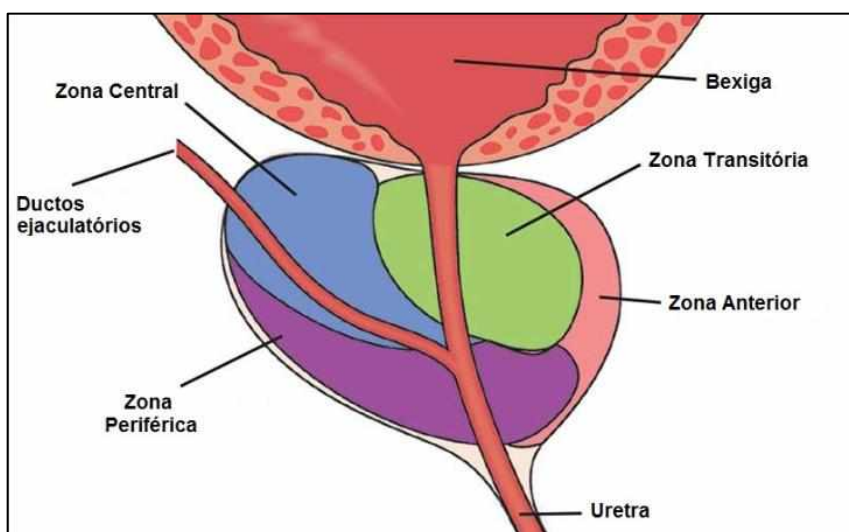
1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 A próstata e suas alterações patológicas

A próstata é uma glândula masculina posicionada sobre os músculos do assoalho pélvico e abaixo da bexiga. Sua principal função é a fabricação de um fluido essencial para a fertilidade que, juntamente, com outros componentes, constituem o sêmen (HARVEY et al., 2014). O reto se localiza atrás do órgão, o que possibilita sua análise por toque digital. Neste percebe-se sua elasticidade, a qual se deve à sua histologia, formada por tecido conjuntivo elástico e fibras musculares lisas (HARVARD, 2011).

A próstata é dividida em quatro zonas (Figura 1), sendo estas a anterior fibromuscular, a periférica, a central e a transitória (AARON, 2016). A zona anterior fibromuscular é composta por tecido conjuntivo fibroso e fibras musculares, raramente com células malignas (ZIMMERMANN, 2015). A zona periférica localiza-se posteriormente e compõe o corpo principal da glândula, onde ocorrem 70% dos casos de câncer. A zona central envolve os ductos ejaculatórios, onde são identificados 5% dos casos de Câncer de Próstata (CaP). Já a zona transitória contorna a uretra, localiza-se centralmente e 20% dos tumores prostáticos são identificados nessa região (SPERLING, 2012). Importante ressaltar que os tumores prostáticos são heterogêneos com diferentes fenótipos e comportamentos biológicos, o que dificulta o seu tratamento (COHEN et al., 2008).

Figura 1: Representação anatômica da glândula prostática evidenciando sua posição relativa à bexiga e à uretra. São também identificadas as zonas periférica, central, transitória e anterior fibromuscular do órgão.



Fonte: <https://pt.dreamstime.com/ilustra%C3%A7%C3%A3o-stock-zonas-da-gl%C3%A2ndula-de-pr%C3%B3stata-image92469829>.

Com o passar dos anos, o tecido da zona de transição apresenta um crescimento benigno, conhecido como hiperplasia prostática benigna (HBP), a qual é comum em homens a partir dos 40 anos de idade. Outras patologias prostáticas incluem a inflamação da glândula (prostatite) e o CaP (WOODARD et al., 2016). O câncer é uma doença em que as células se multiplicam desordenadamente, invadindo tecidos e órgãos. A proliferação anormal se deve a mutações em diferentes genes, comprometendo os pontos de checagem que controlam a divisão celular e inibindo a apoptose (UK, 2014). Conforme sua origem, podem ser classificados como carcinomas, quando provenientes de células epiteliais, como sarcomas, quando acometem tecido conjuntivo ou muscular, como linfomas, quando afetam o sistema linfático ou hematopoiético, como cânceres do sistema nervoso central (SNC) quando há o crescimento de células anormais nos tecidos do cérebro ou da medula espinhal e adenocarcinomas quando originários em glândulas. Cerca de 95% dos cânceres prostáticos são definidos como adenocarcinomas (ONCOGUIA, 2015).

O CaP é o segundo tipo de tumor mais incidente entre indivíduos do sexo masculino no Brasil e nos Estados Unidos, atrás somente do câncer de pele não melanoma. Nesses países, é a segunda causa de morte entre homens por câncer, após o câncer de pulmão (SCHILITZ, 2020). Em nível global, ocupa a terceira posição no *ranking* dos mais comuns, representando 10% do total de cânceres no mundo (BRAY et al., 2018). No Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, são esperados 65.840 novos diagnósticos e 15.391 óbitos (Tabela 1) (INCA, 2020a).

Tabela 1: Estimativa dos novos casos de câncer na população brasileira masculina para cada ano do triênio 2020-2022. Fonte: Adaptado de INCA, 2020.

Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	65.840	29,2
Traqueia, Brônquio e Pulmão	20.520	9,1
Cólon e Reto	17.760	7,9
Estômago	13.360	5,9
Cavidade Oral	11.180	5,0
Esôfago	8.690	3,9
Bexiga	7.590	3,4
Laringe	6.470	2,9
Leucemias	5.920	2,6
Sistema Nervoso Central	5.870	2,6
Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	225.460	100,0
Todas as Neoplasias	309.230	

Apesar dos inúmeros avanços nos métodos diagnósticos, os índices continuam alarmantes, o que evidencia a necessidade de se buscar alternativas para o rastreamento da doença. Aliam-se a essa conjuntura, os sintomas tardios e a constante detecção já em estádios avançados. Nesse cenário, o crescimento da lesão pode obstruir o sistema urinário acarretando: diminuição do fluxo urinário, urgência, hesitação, noctúria e esvaziamento incompleto da bexiga (YOUNG et al., 2015.; HE et al., 2012). Quanto aos fatores de risco, destacam-se: idade, etnia, aspectos ambientais e histórico familiar. Aproximadamente três quartos dos casos ocorrem em homens com mais de 65 anos, o que torna o CaP associado à terceira idade. A incidência de casos aumenta após os 55 anos e atinge o pico entre 70 e 74 anos. Contudo, a agressividade do tumor diminui com a idade, ou seja, quando em indivíduos jovens tendem a apresentar um pior prognóstico (JHA et al., 2014). Quanto à etnia, o índice de pacientes negros diagnosticados com CaP é maior. Nos Estados Unidos, o risco de desenvolvimento da doença é 60% menor em caucasianos e a mortalidade de pacientes afro-americanos é aproximadamente o dobro. Características genéticas e fatores socioeconômicos contribuem para essa realidade epidemiológica (GANN, 2002). Considerando às condições ambientais, estas estão relacionadas à dieta, como a ingestão de gordura saturada, e ao estilo de vida (tabagismo, sedentarismo e exposição ocupacional) (LI et al., 2013). Finalmente, o histórico familiar também se encontra relacionado e homens com parente de primeiro grau (pai ou irmão) já diagnosticado com CaP possuem duas vezes o risco da população geral de desenvolverem a doença. Além disso, o histórico familiar é responsável pelo surgimento da doença em homens jovens e em estágio mais avançado (SPENCE et al., 2014).

1.2 Diagnóstico e tratamento do Câncer de Próstata

A detecção do CaP, na atualidade, ainda é desafiadora. Minimizar o desconforto e a exposição do paciente a biópsias desnecessárias e a outros procedimentos invasivos é essencial, uma vez que são evitados comorbidades e transtornos psicológicos associados (SANDHU et al., 2012). A busca por alterações na próstata é realizada principalmente por quatro métodos: dosagem de antígeno prostático específico (PSA), exame reto digital (DRE), ultrassonografia transretal da próstata (USTR) e biópsia (INCA, 2020b).

O PSA é uma proteína associada com a via androgênica, comumente encontrada em níveis abaixo de 4ng/mL em indivíduos saudáveis (SOHN, 2015). No CaP, em geral, esse valor é elevado. Contudo, esse antígeno não é definido como um marcador tumoral específico, pois tanto células normais como células transformadas expressam PSA. Níveis alterados também

são encontrados em doenças benignas, como HPB, e em processos inflamatórios, como prostatites. Além disso, pacientes com CaP podem também apresentar valores abaixo de 4ng/mL (SAINI, 2016).

A ressonância magnética computadorizada (MRI) é um exame de imagem pouco utilizado, porém muito preciso. A MRI tem se mostrado efetiva na detecção precoce da doença e vem reduzindo o número de procedimentos cirúrgicos (YANAI et al., 2018). O DRE é um método indolor considerado pouco invasivo. Trata-se de sentir a glândula do paciente através do ânus durante uma consulta com o urologista. Quando a próstata apresenta tamanho e/ou consistência anormais, é indicada a biópsia (AHL; RIDDEZ; MOHSENI, 2016). Esta é realizada por agulhamento, dirigida por USTR, e consiste na retirada de uma amostra de tecido para análise histopatológica (HIFUPLANET, 2010). Confirmado o diagnóstico, as lesões prostáticas são posteriormente estadiadas.

Tumores prostáticos são caracterizados de acordo com o sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) e a escala de Gleason (GAUDREAU et al., 2016). O sistema TNM foi descrito por Pierre Denoix em 1944 e se baseia na dimensão e extensão do tumor primário (T), bem como sua invasão aos tecidos adjacentes; no comprometimento dos linfonodos (N) e na presença de metástase (M) (APPLE, 2016). O escore de Gleason, originalmente desenvolvido por Donald Gleason na década de 1960 e posteriormente revisado em 2016, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), é um sistema de pontuação baseado na morfologia das células cancerígenas (HUMPHREY, 2004), sendo definido por cinco padrões. O 1 ocorre quando a amostra se assemelha ao tecido normal da próstata e o grau 5 quando as células se apresentam excessivamente diferentes da arquitetura celular prostática. Nos graus de 2 a 4, as características morfológicas identificadas se encontram entre esses extremos. Como o CaP é uma lesão heterogênea, é realizada uma somatória de pontos das duas áreas predominantes. Dessa forma, a menor pontuação é 2 e a maior possível, 10. As leituras contemporâneas do escore de Gleason separam os pacientes em 3 diferentes grupos de risco: baixo, intermediário e de alto risco (CHEN et al, 2016).

A metástase é a principal causa de morte associada ao CaP (KLAASSEN et al., 2016; LIU et al, 2017). O primeiro foco metastático são os ossos, o que pode ocasionar dor e aumento dos níveis de cálcio no sangue (AHEARN et al., 2016). Nesse contexto, a cintilografia óssea é um exame de imagem rotineiramente realizado para investigar a suspeita de doença avançada (ABREU et al, 2005).

A escolha do tratamento adequado, por sua vez, depende do estadiamento, dos níveis de PSA no sangue, da idade do paciente, da presença de comorbidades e da história clínica

relacionada à recorrência do tumor. Além disso, devem ser considerados os efeitos colaterais do tratamento e a opinião do paciente (ADASP, 2017). Dentre as estratégias terapêuticas estão a quimioterapia, a cirurgia, a radioterapia, a hormonioterapia e a imunoterapia. Em diferentes casos são adotados métodos combinados visando uma melhor resposta do paciente (CHEN; ZHAO, 2013).

A quimioterapia é o tratamento sistêmico com drogas antineoplásicas alvejando células tumorais circulantes. Carece de especificidade afetando, simultaneamente, células normais do corpo, o que causa severos efeitos colaterais como queda de cabelo, diarreia, fadiga, náuseas, vômitos e infecções (ONCOGUIA, 2018).

A prostatectomia radical (PR) é o tratamento padrão para pacientes com expectativa de vida superior a 10 anos e que apresentam o CaP localizado. A técnica se baseia na remoção cirúrgica completa da próstata, das vesículas seminais e ampolas do ducto deferente (HEALTH et al., 2017). Além da PR para CaP localizados, há ainda a radioterapia, um tratamento que utiliza radiação ionizante para eliminar ou inibir localmente o crescimento de células tumorais, sem que o tecido normal da bexiga e do reto sejam afetados. Os pacientes tratados com essa técnica respondem de maneira satisfatória, com diminuição dos níveis de PSA por cerca de 18 meses (GANN, 2002).

A hormonioterapia é utilizada para tratamento de pacientes recorrentes ou para aqueles com a doença já avançada. A terapia hormonal objetiva diminuir os níveis de andrógenos, uma vez que esses hormônios conduzem à proliferação de células tumorais (DAI; HEEMERS; SHARIFI, 2017). Na castração química são empregados anti-androgênicos, destacando-se os ligantes do receptor de androgênio (AR), responsáveis por impedir sua atividade transcricional. Já a castração cirúrgica (orquidectomia) ocorre por meio da retirada dos testículos, de onde são originados 95% dos níveis de testosterona circulante. No entanto, após 18 meses, muitos pacientes refratam à privação de androgênio, definindo uma forma letal da doença conhecida como CaP resistente à castração (CRPC) (MELEGH; OLTEAN, 2019). Para estes, são necessárias terapias adicionais, como a imunoterapia (NEVEDOMSKAY; BAUMGART; HAENDLER, 2018).

Na imunoterapia são empregados agentes que modulam o sistema imunológico (SI) do paciente (EREMINA et al., 2020). Os imunomoduladores podem aumentar o número de moléculas apresentadoras de antígeno e estimular o reconhecimento e eliminação de células neoplásicas, promovendo a ativação de linfócitos B e T (MAIA; HANSEN, 2017). De fato, o SI está diretamente relacionado com o câncer, seja no seu surgimento e/ou progressão. Portanto,

compreender os aspectos genéticos e moleculares de receptores e mediadores imunológicos é essencial na descoberta de novos alvos e no desenho de estratégias terapêuticas inovadoras.

1.3 O sistema imunológico no câncer

O SI mantém a homeostase do organismo, defendendo-o contra agentes patogênicos e controlando neoplasias malignas. Seus componentes verificam os tecidos com o propósito de eliminar células mutadas recém-formadas, antes de estas constituírem massas tumorais agressivas. Contudo, mecanismos para escapar desse refinado controle são desenvolvidos pelas células transformadas. Estas proliferam em resposta à imunorregulação, incluindo situações de comprometimento da resposta de defesa, tolerância imunológica, baixa expressão de moléculas pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), alteração em marcadores de superfície e falhas nos mecanismos de comunicação celular (PANDYA et al., 2016).

O SI é dividido em dois grandes grupos, inato ou natural e adaptativo ou adquirido, os quais se encontram em constante interlocução. O sistema inato é considerado inespecífico, sendo definido como a primeira linha de defesa no combate a moléculas estranhas. Este grupo é composto por barreiras físicas como pele e membranas mucosas, por células efetoras como as *Natural Killer* (NK), macrófagos e células dendríticas (DC), por proteínas sinalizadoras como as citocinas e por receptores como os Toll-Like (TLR) (RAVAL et al, 2014). O sistema adaptativo é caracterizado por especificidade e diversidade de reconhecimento, especialização e memória imunológica. A imunidade adaptativa é mediada por células altamente especializadas, os linfócitos B e T (CRUVINEL et al., 2010).

Os epitélios da pele e da mucosa são barreiras físicas e representam a primeira linha de defesa do organismo contra agentes externos. A pele é formada por uma rede de células e biomoléculas que atuam como constante sentinelas (NGUYEN; SOULIKA, 2019). As células NK são uma população de linfócitos citotóxicos capazes de identificar e eliminar agentes infecciosos e células mutadas sem exposição prévia ao antígeno. Além disso, são responsáveis por recrutar macrófagos e ativar DCs e linfócitos (ABEL et al., 2018; JOBIM; JOBIM, 2008). Já os macrófagos e as DCs são fagócitos do grupo das células apresentadoras de antígeno (APCs). Estas possuem receptores padrão de reconhecimento (PPRs) que são capazes de detectar padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), típicos de células tumorais (MUKHERJEE; KARMAKAR; BABU, 2016). Os PPRs são responsáveis por ativar vias de sinalização inflamatória, seguidas pela liberação de citocinas – interleucina-1 (IL-1), IL-6 e TNF (Fator de Necrose Tumoral), de

interferons (IFNs) e de quimiocinas, que recrutam leucócitos para o local da infecção (BESEDOVSKY; LANGE, HAACK, 2019).

A principal classe de PPRs são os TLRs, receptores capazes de detectar ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e polissacarídeos. Os TLRs encontram-se expressos na membrana (TLR1, 2, 4, 5, 6) ou nos compartimentos endossômicos (TLR3, 7, 8, 9) de células dendríticas, macrófagos, NK e neutrófilos (DALMARONI et al., 2016). Quando ativados, os TLRs fazem o recrutamento de neutrófilos, modulam a função dos macrófagos e a maturação de DCs, as quais expressam proteínas do MHC. Consequentemente há a sinalização para respostas imunitárias adaptativas através da ativação de linfócitos T (BEUTLER, 2009).

Os linfócitos são uma classe de glóbulos brancos com alta diversidade de receptores de superfície para antígenos. Os linfócitos B, gerados a partir de células-tronco da medula óssea, reconhecem antígenos apresentados pelas APCs e, quando ativados, atuam na produção de anticorpos, resposta conhecida por imunidade humoral. Os linfócitos T são gerados na medula óssea e armazenados no timo, onde sofrem maturação. Conforme a diferenciação e de acordo com suas funções efetoras, os linfócitos T são classificados em duas categorias principais: T auxiliares (TCD4) e T citotóxicos (TCD8). Os TCD4, através da liberação de um diverso padrão de citocinas, recrutam células do SI que eliminam patógenos e ativam macrófagos, linfócitos B e linfócitos TCD8. Os TCD8, por sua vez, induzem a célula-alvo à apoptose. Após o desempenho de suas funções, a maioria dos linfócitos B e T específicos sofre apoptose, porém, alguns permanecem como células de memória. Por conseguinte, em uma nova exposição ao antígeno, a resposta se dará de forma mais rápida e eficiente (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

As citocinas e quimiocinas produzidas por células do SI mediante lesão celular são responsáveis por promover a inflamação tecidual. Este processo biológico desempenha importantes funções no organismo, como o combate a patógenos e a reparação de tecidos danificados (MUNN, 2016). A inflamação é classicamente separada em aguda e crônica. A resposta inflamatória aguda acontece imediatamente após o dano, a partir das moléculas da imunidade inata, com curta duração. Já a inflamação crônica inicia-se tardiamente, desencadeada por persistência do estímulo inicial, podendo durar meses ou anos. Os diversos mediadores inflamatórios, porém, são observados no microambiente tumoral (MAT) (COUSSENS; WERB, 2002).

O MAT é caracterizado por conter células neoplásicas e um complexo conjunto de células não neoplásicas. Dentre estas encontram-se fibroblastos, células endoteliais e células imuno-inflamatórias (CARVALHO, 2013). A inflamação pode contribuir para a fisiopatologia

do CaP com a liberação crônica de citocinas, suprimindo respostas anti-tumorais, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) e promovendo o crescimento do tumor (DAI et al., 2017).

Os macrófagos associados ao tumor (TAMs) são comumente encontrados no MAT do CaP e estão associados com a progressão tumoral ou à imunossupressão, dependendo de seu fenótipo de ativação (RUNHAN et al., 2016). Os TAMs são classificados em M1 e M2, de acordo com a resposta elaborada. Os macrófagos ativados com perfil M1 são anti-tumorais e pró-inflamatórios, enquanto os macrófagos M2 são promotores tumorais e expressam citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Além disso, já foi observado altos níveis de fator de transformação de crescimento beta (TGF-beta) no MAT do CaP. A proteína TGF-beta é responsável pelo controle de proliferação e diferenciação celulares, o que contribui para a progressão do tumor. Ademais, o TGF-beta está relacionado à supressão da resposta antitumoral do SI, por meio da inibição do recrutamento e acúmulo de linfócitos T reguladores (Tregs) e bloqueio da atividade de células NK, tornando o MAT predominantemente imunossupressor (MAIA; HANSEN, 2017).

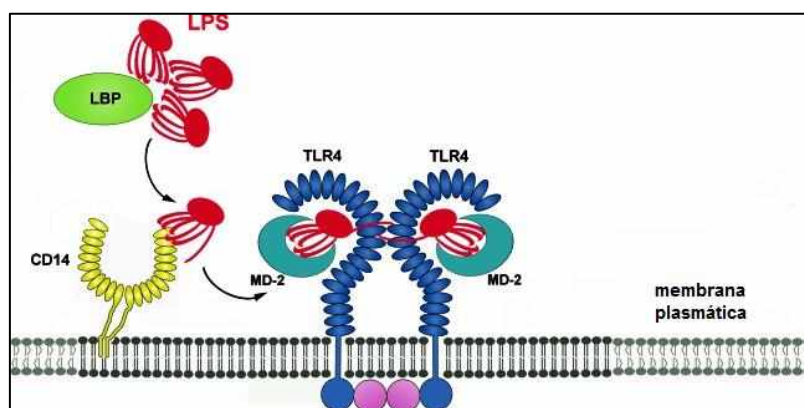
Portanto, diferentes estratégias de imunoterapia podem ser empregadas no tratamento do CaP com papel central desempenhado pela inflamação. Nesse sentido, a constante sinalização inflamatória proporcionada pela ativação dos TLRs presentes nas células do MAT está relacionada com a susceptibilidade à tumores (YANG et al, 2010). Contudo, o papel dos TLRs no CaP ainda é controverso. O receptor TLR3, por exemplo, foi associado a atividade anti-tumoral ao desencadear a apoptose e parada de crescimento de células neoplásicas (ZHAO et al., 2014). Já o TLR4 foi associado ao desenvolvimento do tumor por meio da expressão e secreção de citocinas imunossupressoras (PEI et al, 2014).

1.4 Os receptores TLR4

O gene *TLR4* foi o primeiro gene que codifica para receptor do tipo Toll identificado em humanos. Este é formado por 3 exons e se encontra no cromossomo 9q32-32 (GENECARDS, 2018). O receptor TLR4 estruturalmente é composto por: (i) um domínio de ligação ao ligante extracelular, denominado ectodomínio (ECD), o qual é constituído por repetições ricas em leucina (LRR), (ii) um domínio helicoidal e (iii) um domínio intracelular conhecido por TIR (Receptor de Toll/Interleucina 1), responsável pelo recrutamento de moléculas adaptadoras (GIOIA; ZANONI., 2015). O TLR4 é expresso na membrana plasmática e reconhece lipopolissacarídeos (LPS), um dos principais componentes da membrana de bactérias Gram-negativas (OBLAK; JERALA, 2011).

Quando ativado, o TLR4 desencadeia uma cascata de eventos de sinalização intracelular que culminam na resposta adaptativa. Porém, para que haja a ligação do TLR4 ao LPS é necessário um complexo multirreceptor formado pela proteína de ligação ao LPS (LPB) e por dois correceptores, sendo estes: o grupo de diferenciação 14 (CD14) e a proteína de diferenciação mieloide 2 (MD-2). A LBP se liga à membrana rica em LPS das bactérias, formando micelas e facilitando a extração de monômeros de LPS pela proteína CD14. A CD14 transfere o LPS para a MD-2 ligada ao TLR4. Dessa forma, sequencialmente, esse complexo de receptores atua extracelularmente para uma interação eficiente entre o ligante microbiano LPS e o TLR4, o qual dimeriza e inicia a transdução de sinais (Figura 2) (BRUBAKER et al, 2015).

Figura 2: Desenho representativo da proteína de ligação ao LPS (LPB) e seu funcionamento no reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS). O LPB se liga ao LPS e possibilita que a proteína CD14 (grupo de diferenciação 14) extraia seus monômeros. A CD14 transfere o LPS para o MD-2 (proteína de diferenciação mieloide 2) no complexo MD-2/TLR4 para que, então, se inicie a transdução do sinal. Fonte: Adaptado de Pióciennikowska, 2014.

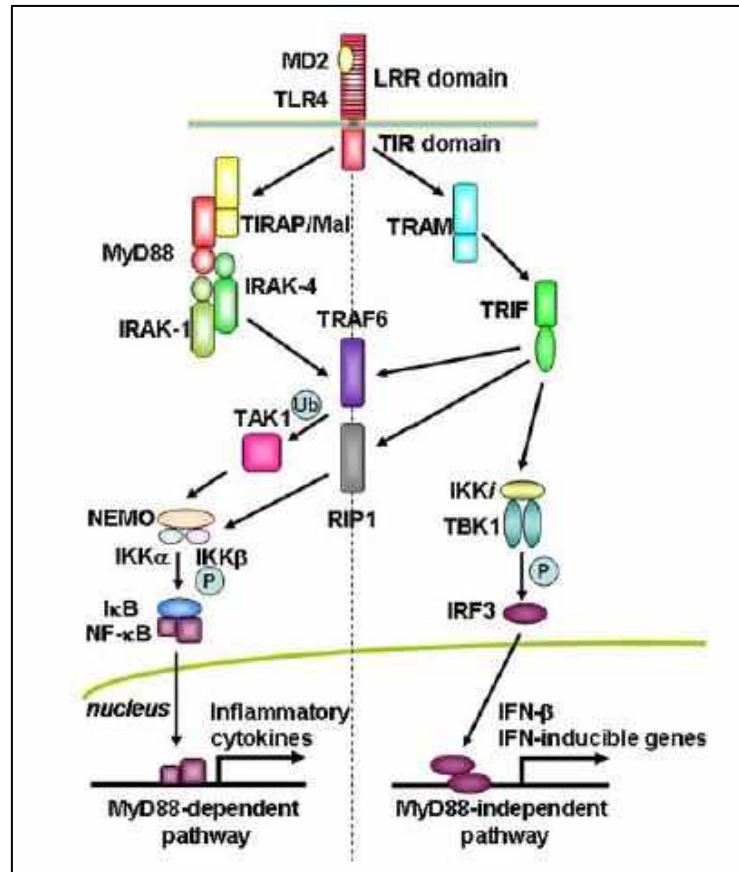


A ligação do LPS ao ECD presente no TLR4 ativa uma via de sinalização complexa que envolve diversas proteínas acessórias. Após o reconhecimento do LPS, a porção TIR do receptor recruta moléculas adaptadoras que contêm o domínio TIR, sendo estas: resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MyD88), receptor *Toll-IL1* contendo a proteína adaptadora (TIRAP), molécula adaptadora relacionada ao *TRIF* (TRAM) e interferon-B indutor de adaptador contendo domínio-*TIR* (TRIF). Essas moléculas atuam na transdução intracelular de sinais e estimulam fatores de transcrição e quinases, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias. O TLR4, dentre a família TLR, é o único que recruta quatro diferentes adaptadores e possui capacidade de iniciar duas cascatas de sinalização: a via dependente da proteína de MyD88 e a via dependente de TRIF, independente de MyD88 (MAESHIMA; FERNANDEZ, 2013).

As vias do TLR4 possuem cinéticas diferentes. A dimerização do TLR4 na via dependente de MyD88 primeiramente recruta TIRAP que auxilia na conexão e interação entre o MyD88 e o TLR4 (KAWAI; AKIRA, 2011). Posteriormente, o MyD88 recruta e ativa a quinase 4 associada à IL-1R (IRAK-4), enzima que fosforila IRAK-1. A fosforilação de IRAK1 possibilita a ligação do fator associado ao receptor de necrose tumoral 6 (TRAF6), componente que ativa a TAK1 (Quinase de ativação do fator de crescimento B transformado 1). Um complexo constituído por TAK1 e proteínas de ligação a TAK-1 (TAB1, TAB2 e TAB3) é formado e induz duas vias de ativação (NARDO, 2015). A primeira consiste na associação dessas moléculas ao complexo IKK (Quinase inibidora do fator nuclear NF-kB) constituído por IKKalfa, IKKbeta e pelo modulador essencial de NF-kB (NEMO), o que culmina com a fosforilação de Ikb e a ativação de NF-kB. Este regula a expressão de citocinas inflamatórias, como interleucina-17 (IL-17) e IL-6 (BRYANT et al, 2015). A segunda via ativada simultaneamente pelo complexo TAK1 se dá pela fosforilação de dois membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), as quinases JUN N-terminal (JNK) e a p38. Estas interagem com fatores de transcrição chamados de AP-1 (Proteína ativadora 1) que também irão transcrever genes envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias (YAN et al, 2016).

A sinalização dependente de TRIF ocorre por meio do adaptador TRAM que conecta o TLR4 ao TRIF. O TRIF recruta o TRAF6 e as proteínas quinases TBK1 (Quinase de ligação TANQUE 1) e IKKi, as quais ativam IRF3 (Fatores reguladores de Interferons-3). Com essa combinação única de proteínas adaptadoras, o TLR4 consegue mediar a ativação tardia de NF-kB mesmo na ausência de MyD88 e de IFN-1 (Figura 3) (KIESER; KAGAN, 2017).

Figura 3: Ativação das vias de receptores do tipo Toll 4 (TLR4) dependente de MyD88 (Resposta Primária de Diferenciação Mielóide 88) e dependente de TRIF (Interferon-B Indutor de adaptador contendo domínio TIR). A transdução de sinal resulta na transcrição de citocinas pró-inflamatórias, envolvendo os fatores de transcrição NF-Kb (Fator Nuclear Potenciador da Cadeia Leve Kappa de células B ativadas), de IFN-1 (Interferon-1) e de IRF-3 (Fatores reguladores de Interferon-3). Fonte: Adaptado de Shizuo, 2006.



Considerando a sinalização celular e a consequente secreção de citocinas ocasionadas pela ativação do receptor TLR4, torna-se necessário elucidar sua relação com o câncer. A detecção de polimorfismos no gene *TLR4* se mostra promissora no entendimento da resposta imune a tumores. Assim, polimorfismos no gene *TLR4* podem auxiliar na compreensão da biologia do CaP, bem como podem se tornar biomarcadores de susceptibilidade da doença.

1.5 Polimorfismos em genes que codificam TLRs e sua relação com câncer

As alterações na sequência do DNA tais como inserções, deleções, substituições ou repetições de pares de bases (pb), quando ocorrem na população em uma frequência superior a 1%, são conhecidas por polimorfismos. Essas variações genéticas podem aparecer em decorrência de falhas aleatórias nos processos celulares ou podem ser ocasionadas por exposição a agentes físicos e/ou químicos. Apesar de não resultarem diretamente na manifestação de doenças, os polimorfismos podem aumentar a susceptibilidade naquelas decorrentes da combinação de fatores, como o câncer, por participarem na modulação de resposta celular frente a estímulos ambientais (ROSA et al., 2016).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são os mais comuns, caracterizados pela troca de apenas uma base [adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G)] na sequência de DNA em uma região codificante ou intrônica. Os SNPs podem ser classificados como sinônimo, quando ocorre troca de nucleotídeos sem alterar o aminoácido, e não-sinônimos, quando há alteração na sequência de aminoácidos. Os não sinônimos podem ainda ser diferenciados em mutações do tipo missense, quando, em consequência à alteração, o códon codifica um aminoácido diferente, e em nonsense, quando há a criação de um códon de parada prematuro, resultando em proteínas não-funcionais (SILVA et al., 2010). Além destas, pode ocorrer a mutação que conduz a uma mudança na matriz de leitura, conhecida como *frameshift*, a qual decorre de *indels* (inserção e/ou deleção) (OSTRANDER, 2020).

O estudo de polimorfismos associados ao SI tem se destacado, uma vez que considera a associação entre marcas de susceptibilidade e a inflamação. O genótipo GG do polimorfismo 572G/C identificado no gene que codifica para IL-6 já foi associado ao aumento do risco de CaP em asiáticos (WANG; CHEN; CHEN, 2018). Além disso, mutações nos genes que codificam para TLRs também têm sido descritos. Polimorfismos no gene *TLR3* e no gene *TLR2* têm sido relacionados ao câncer gástrico (LUO et al, 2015); no *TLR9* ao câncer de cólon (SEMLALI et al, 2016b) e no *TLR4* e *TLR9* ao câncer cervical (PANDEY et al., 2019).

Dentre os identificados no gene *TLR4* destaca-se a mutação Thr399Ile (399C> T, T399I, rs4986791), caracterizada pela substituição da base C para T e consequente mudança de aminoácidos de Treonina para Isoleucina no códon 399. Essa troca prejudica o domínio extracelular do receptor TLR4 reduzindo sua resposta inflamatória (KIM et al., 2011), o que caracteriza como fator de risco para gastrites e lesões pré-malignas na população indiana (ACHYUT et al., 2007). A inflamação crônica têm sido associada ao CaP, sendo que essa pode ser mediada pelo TLR4 (PANDEY et al., 2019). Mutações nesse gene e o risco ao CaP têm sido correlacionados (CHEN et al., 2005; ZHENG, 2004) e hipotetizamos que a mutação Thr399Ile possa ser um biomarcador para o CAP e, portanto, poderá auxiliar na triagem molecular desses pacientes contribuindo para o seu diagnóstico precoce. De fato, SNPs podem atuar como marcadores genéticos e podem ser analisados por meio das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e de Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP) (ARAÚJO et al., 2009), definindo marcas de susceptibilidade ao câncer.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o papel do polimorfismo Thr399Ile do gene *TLR4* como fator de risco para o CaP.

Objetivos específicos

- Estabelecer o perfil genotípico para o polimorfismo Thr399Ile do gene *TLR4* em pacientes com CaP e HPB;
- Caracterizar a distribuição dos genótipos e alelos encontrados na população avaliada;
- Definir o papel do polimorfismo Thr399Ile do gene *TLR4* na susceptibilidade ao CaP;
- Correlacionar os dados encontrados com os níveis de PSA, já utilizado na prática clínica;
- Correlacionar os resultados com os dados histopatológicos dos pacientes;
- Avaliar o potencial do polimorfismo Thr399Ile do gene *TLR4* como biomarcador para o CaP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras e extração de DNA

No presente trabalho foram analisadas amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de próstata (CaP) e com hiperplasia prostática benigna (HPB). As amostras foram coletadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pela equipe médica e ambulatorial do setor de Urologia, mediante autorização dos pacientes, os quais assinaram o Termo de Consentimento. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa sob o número de parecer 005/2001.

Nesse estudo foram incluídos 51 pacientes. Destes, 29 foram diagnosticados com CaP (idade média de 63,59 anos $\pm$ 8,79) e 22 com HPB (idade média de 70,14 anos $\pm$ 8,62). Para o primeiro grupo, a média do PSA foi de 12,81ng/uL ($\pm$ 16,29) e para o segundo a média foi de 10,38ng/uL ($\pm$ 13,29). Quanto aos aspectos histopatológicos dos tumores, 82,76% foram classificados como T1-T2 e 17,24% como T3. Além disso, 37,93% dos pacientes apresentaram lesões com escore de Gleason $\geq$ 7 e 62,06% com escore $<$ 7.

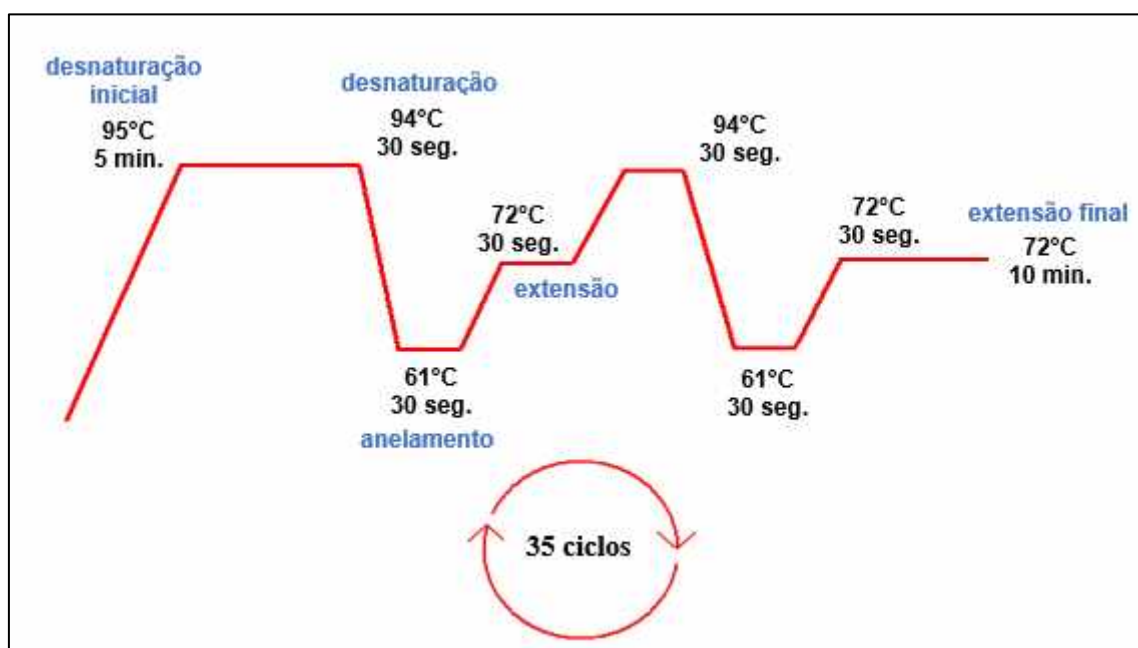
O DNA foi extraído seguindo o protocolo previamente publicado por Sambrook (1989) e sua qualidade avaliada em gel de agarose 0,8%, imerso em tampão TBE (45mM Tris Borato, pH 8,3 e 1mM EDTA) 0,5X, corado com GelRed 1X (Uniscience) e visualizado por luz ultravioleta (sistema de vídeo documentação – Locus Biotecnologia). O material foi mantido a -20°C para os ensaios posteriores.

2.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para análise do polimorfismo Thr399Ile, 2μL do DNA extraído de cada paciente foi primeiramente amplificado em reações de 20μL contendo os seguintes reagentes: 0,5U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen), 1X Tampão da enzima (50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8.3), 2mM de MgCl₂, 200 μM dNTPs e 5pmol dos oligonucleotídeos iniciadores (5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGAGAA-3' e 5'-ACCTGAAGACTGGAGAGTCAGTTAAATGCT-3'). Reações controle foram também preparadas sem o material genética, a fim de monitorar possíveis contaminações dos reagentes.

As condições para amplificação por PCR foram calibradas considerando-se as seguintes etapas: 1) desnaturação inicial; 2) desnaturação; 3) anelamento; 4) extensão; e 5) extensão final. Na figura 4 visualiza-se as condições estabelecidas para a ciclagem.

Figura 4: Condições da reação de PCR para amplificação da sequência do gene *TLR4* em que se encontra o polimorfismo Thr399Ile. Fonte: Próprio autor.



Os produtos finais da PCR foram verificados após corrida eletroforética. Para cada 5µL de produto amplificado foram adicionados 2µL de Tampão de Carreamento (12,5 mg de azul de bromofenol, 12,5 mg de xileno cianol e 4g de sacarose) e GelRed 1X (Uniscience), resolvidos em gel de agarose 1,5%. O gel foi submetido à voltagem constante de 100 volts por 40 minutos, em tampão TBE 0,5x e posteriormente visualizado em transluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados em sistema de video-documentação (*Molecular Imaging* - Locus).

2.3 Genotipagem do polimorfismo Thr399Ile

Para genotipagem do polimorfismo Thr399Ile foi realizada uma restrição enzimática com o produto amplificado na PCR utilizando a enzima de restrição *Hinf* I. Cada reação foi preparada para um volume final de 10µL, contendo 1X Tampão da enzima, 1U de *Hinf*I e 5µL de produto amplificado. O volume final foi completado com água ultrapura. A reação foi incubada a 37°C por 16 horas em banho seco (Agimaxx).

Os alelos foram visualizados em gel de agarose 3%, submetido à voltagem constante de 50 volts por 240 minutos em tampão TAE (Tris-acetato, pH 8.0 e EDTA) 0,5%, corados com GelRed 1X e posteriormente visualizados em transluminador de luz ultravioleta e fotodocumentados em sistema de video-documentação (*Molecular Imaging* - Locus).

2.4 Análise estatística dos dados

As frequências genotípicas e alélicas foram apropriadamente tabuladas e posteriormente comparadas com o diagnóstico, idade, níveis séricos de PSA pré-operatório, pontuação de Gleason e TNM utilizando o teste de Chi-quadrado com o auxílio do *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A chance de ocorrência foi estimada pelo teste de *oddsratio* (OR). Esta e as análises concernentes ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para os alelos identificados foram realizadas no software BioEstat (5.0).

Para as análises estatísticas descritivas e inferenciais os níveis séricos de PSA foram categorizados em: 1) <10 ng/mL; e 2) ≥10 ng/mL; a variável pontuação de Gleason foi dicotomizada em: 1) <7; e 2) ≥7; e a variável TNM foi dividida em: 1) T1-T2; e 2) T3. Vale ressaltar que o intervalo de confiança estabelecido foi de 95% (IC 95%) com nível de significância (α) estabelecido $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CaP é uma doença complexa causada pelo acúmulo de alterações genéticas nas células prostáticas (WANG et al., 2018). O diagnóstico precoce permanece como prioritário, o que evidencia a necessidade de se validar marcas de susceptibilidade na população e de se identificar grupos de risco. A descoberta de alterações genéticas em nível molecular pode auxiliar nessa triagem, desonerando os sistemas de saúde ao ampliar as chances de cura. De fato, os polimorfismos genéticos podem ser determinantes no desenvolvimento de diferentes doenças, incluindo o câncer, ao interferirem no funcionamento de transcritos e proteínas (MORRIS et al., 2015; LANGSENLEHNER et al., 2007). Nesse sentido, atuam como biomarcadores de rastreio, diagnósticos, prognósticos ou preditivos.

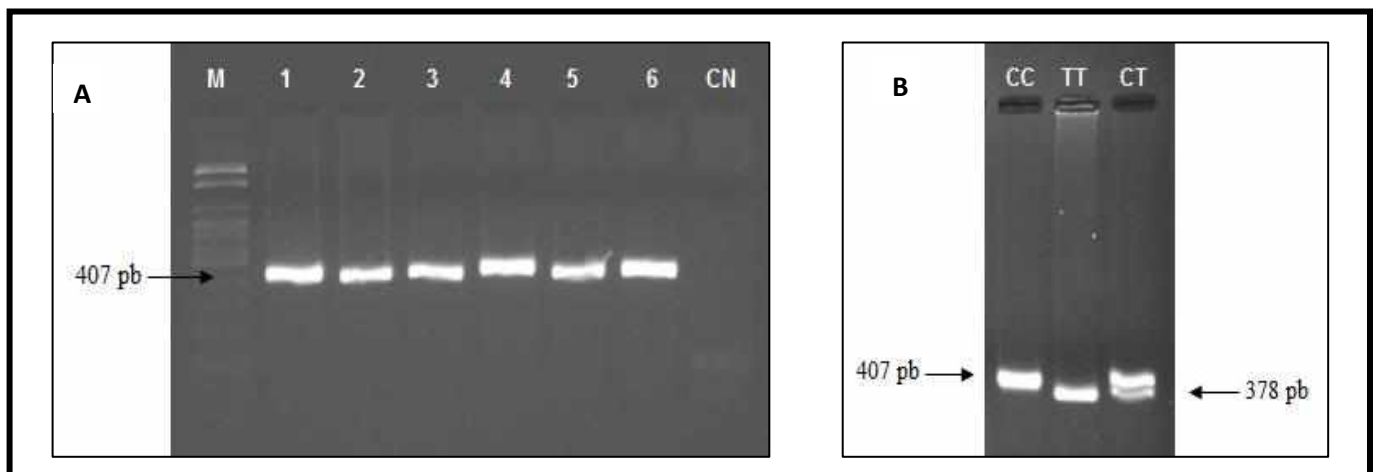
No câncer, genes que codificam para respostas inflamatórias têm se destacado, uma vez que a inflamação crônica gera um microambiente propenso à carcinogênese com a liberação de citocinas envolvidas na proliferação celular, inibição da apoptose e geração de radicais livres, capazes de causar danos ao DNA. As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) levam à instabilidade genômica, mutações deletérias e modificações pós-traducionais aberrantes (SAMADI et al., 2015). No CaP, estudos anteriores correlacionaram a inflamação intra-prostática crônica decorrente da presença de patógenos com o aparecimento e progressão da doença (DENNIS et al., 2002; SARMA et al., 2006).

A cascata de sinalização do TLR4 inclui mecanismos evolutivamente conservados ativando NF-kB. Originalmente, o TLR4 foi descrito como receptor de LPS, porém é capaz de reconhecer DAMPs e proteínas de superfície viral (GEORGEL et al., 2007). O gene *TLR4* é altamente polimórfico e suas variantes genéticas podem reduzir ou promover a sinalização imunológica, com diferentes papéis no desenvolvimento de tumores conforme as funções desempenhadas pelo receptor. Hold e colaboradores (2007) associaram o alelo G do polimorfismo Asp299Gly ao surgimento de carcinoma gástrico não cardíaco. Semlali e colaboradores (2016a) observaram que o alelo G da variante genética rs10759931 aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de cólon.

O SNP Thr399Ile (399C> T, T399I, rs4986791) vêm sendo estudado em diferentes neoplasias uma vez que, ao alterar o aminoácido codificado, modifica o reconhecimento do ligante e, conseqüentemente, a resposta inflamatória (FERWERDA et al., 2008). Sua influência na população brasileira ainda não foi avaliada. Nesse contexto, hipotetizamos que a mutação Thr399Ile possa ser um marcador genético para o CaP, auxiliando na triagem dos pacientes. Primeiramente, uma região de 407pb do gene *TLR4* foi amplificada (Figura 5A). Observa-se a

presença de uma banda única, o que evidencia o sucesso da PCR, sem quaisquer amplicons inespecíficos ou contaminantes no controle negativo da reação. As amostras foram então genotipadas para o polimorfismo Thr399Ile do gene *TLR4* utilizando a enzima de restrição *Hinf* I e o padrão obtido encontra-se representado na Figura 5B. Indivíduos homozigotos normais CC apresentam uma única banda de 407pb. Os heterozigotos CT, duas bandas de tamanhos distintos com 407pb e 378pb. Finalmente, pacientes homozigotos mutantes TT possuem uma única banda visível de 378pb.

Figura 5: Amplificação do fragmento de 407pb do gene *TLR4* e padrão de genotipagem obtido para o polimorfismo Thr399Ile. (A) Produto amplificado. M: marcador de 100pb. Colunas 1-3: produto amplificado a partir de amostras de pacientes com Câncer de Próstata. Colunas 4-6: produto amplificado a partir das amostras de pacientes com HPB. CN: controle negativo interno de reação. (B) Genótipos obtidos após restrição com a enzima *Hinf*I. CC = indivíduo homozigoto selvagem, TT = indivíduo homozigoto mutante e CT = indivíduo heterozigoto. Fonte: Próprio autor.



O estudo incluiu 51 amostras (Tabela 2), sendo 29 pacientes com CaP, livres de tratamento, e 22 com HPB. A idade dos indivíduos foi estatisticamente superior para os indivíduos com HPB ($p = 0,03$) comparados com os com CaP, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo para os níveis de PSA sérico ($p = 0,45$). As frequências genotípicas observadas em pacientes com CaP foram de 55,17% (16/29) de homozigotos selvagens CC, 10,35% (3/29) de heterozigotos CT e 34,48% (10/29) de homozigotos mutantes TT. Em pacientes com HPB observou-se 50% (11/22) de homozigotos normais CC, 4,55% (1/22) de heterozigotos CT e 45,45% (10/22) de homozigotos mutantes TT. Quanto à distribuição alélica, o alelo C foi mais frequente nos pacientes com CaP, contudo sem significância estatística (Tabela 2).

O polimorfismo Thr399Ile para ambos os grupos (CaP e HPB) não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), o que indica que os genótipos estão em processo de seleção, que o fluxo de migração não é desprezível e há influência de deriva genética. De fato, nosso estudo é limitante em seu número de participantes e uma análise em um coorte maior é essencial para melhor caracterizar a influência desse SNP na população.

Tabela 2: Distribuição genotípica e alélica para o polimorfismo Thr399Ile do gene *TLR4* nos grupos de pacientes diagnosticados com Câncer de Próstata (CaP) e Hiperplasia Prostática Benign (HPB). Os indivíduos foram categorizados conforme a idade e valores de PSA sérico. Fonte: Próprio autor.

SNP	CaP (N=29)			HPB (N=22)		
	N (%)	*Idade	*PSA	N (%)	*Idade	*PSA
<i>Thr399Ile</i>						
CC	16 (55,17)	64,06 (9,78)	10,34 (13,33)	11 (50)	69,4 (8,56)	12,26 (18,36)
CT	3 (10,35)	67,33 (5,03)	28,4 (40,53)	1 (4,55)	64 (ND)	6,09 (ND)
TT	10 (34,48)	61,7 (8,15)	12,08 (8,49)	10 (45,45)	71,6 (9,22)	8,75 (5,38)
Frequência alelo C	35 (60,34)			23 (52,27)		
Frequência alelo T	23 (39,66)			21 (47,73)		
$\S P_{HWE}$	<0,0001			<0,0001		
$P\chi^2$	$^1PCa \times HPB = 0,61$ $^2PCa \times HPB = 0,54$					

*: média ($\pm$ DP)

$\S P_{HWE}$: equilíbrio de Hardy-Weinberg (probabilidade para a população não estar em equilíbrio)

N: número de indivíduos

ND: não determinado

PSA: Antígeno Prostático Específico

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

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único

Para avaliar a associação entre os genótipos/alelos e o risco ao CaP, foi calculada a razão de chances (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Valores de OR são comumente calculados em estudos acerca da etiologia de diferentes doenças. O OR é um cálculo estatístico realizado em estudos caso-controle que possibilita estimar a chance de um evento ocorrer, ou seja, a probabilidade de desenvolvimento de uma doença (RUMEL, 2020). O genótipo homozigoto selvagem (CC) foi utilizado como referência nas análises (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição genotípica e alélica para o polimorfismo Thr399Ile do gene *TLR4* e o risco de desenvolvimento do Câncer de Próstata (CaP) comparado à Hiperplasia Prostática Benigna (HPB). Fonte: Próprio autor.

SNP	CaP (N=29) N(%)	HPB (N=21) N(%)	OR	IC 95%	P
<i>Thr399Ile</i>					
CC	16 (55,17)	11 (50)	1,00	Referência	-
CT	3 (10,35)	1 (4,55)	0,48	0,04-5,29	0,96
TT	10 (34,48)	10 (45,45)	1,45	0,45-4,66	0,74
Modelo C					
CC+CT	19 (65,52)	12 (54,55)	1,00	Referência	-
TT	10 (34,48)	10 (45,45)	1,58	0,51-4,93	0,61
Modelo T					
CC	16 (55,17)	11 (50)	1,00	Referência	-
TT+CT	13 (44,83)	11 (50)	1,23	0,40-3,74	0,93

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

OR: Odds Ratio

Novamente, não foi identificada associação do SNP Thr399Ile do gene *TLR4* com a suscetibilidade ao CaP ($p>0,05$). Nossos resultados se encontram em conformidade com os já publicados por Singh e colaboradores (2013) com pacientes do norte da Índia, em que as frequências dos genótipos não foram associadas com o risco de desenvolvimento de CaP quando comparadas aos pacientes hiperplásicos. Contudo, os dados da Tabela 3 também demonstram prevalência do alelo C no grupo de indivíduos com tumor. Sugerimos que a presença do alelo selvagem está associada ao funcionamento ativo do receptor TLR4 levando à inflamação tecidual e provocando danos ao DNA e CaP. Sendo assim, a presença da variante possui um efeito protetor contra a carcinogênese.

No Brasil, um estudo prévio do SNP Thr399Ile e sua associação com lesões gástricas não identificou o genótipo homozigoto mutante TT na população amostrada, o que levou os autores a concluir que esse polimorfismo não é relevante para a carcinogênese gástrica (OLIVEIRA, 2012a). Segundo Davoodi e Seow (2011) a mutação também não predispõe ao risco de câncer colorretal (CRC). Em contrapartida, Messaritakes e colaboradores (2018) relataram que o SNP foi significativamente associado a uma maior suscetibilidade ao câncer

gástrico em pacientes gregos e ao desenvolvimento de CRC, correlacionando com a ocorrência de metástases e menor sobrevida global. Nesse contexto, nós categorizamos os indivíduos diagnosticados com CaP conforme os dados clínicos (PSA) e histopatológicos (Gleason e TNM), os quais são importantes para o acompanhamento da doença (Tabela 4). Nenhuma associação significativa foi observada.

Tabela 4: Polimorfismo Thr399Ile do gene *TLR4* agrupado em pacientes com Câncer de Próstata com diferentes níveis séricos de PSA, pontuação de Gleason e TNM.

SNP	PSA N (%)				Gleason N (%)				TNM N (%)			
	<10 ng/mL	≥10 ng/mL	OR (IC95%)	P	<7	≥7	OR (IC95%)	P	T1-T2	T3	OR (IC95%)	p
Thr399Ile												
CC	12 (41.38)	4 (13.79)	1,00	Ref.	10 (34.48)	6 (20.69)	1,00	Ref.	15 (51.72)	1 (3.45)	1,00	Ref.
CT	2 (6.90)	1 (3.45)	1.5 (ND)	0,68	1 (3.45)	2 (6.90)	3,33 (ND)	0,76	2 (6.90)	1 (3.45)	7,5 (ND)	0,70
TT	4 (13.79)	6 (20.69)	4,5 (0,82-24,57)	0,17	7 (24.14)	3 (10.34)	0,71 (0,13-3,87)	0,97	7 (24.14)	3 (10.34)	6,43 (0,56-73,35)	0,28
Modelo C												
CC+CT	14 (48.28)	5 (17.24)	1,00	Ref.	11 (37.93)	8 (27.60)	1,00	Ref.	17 (58.62)	2 (6.90)	1,00	Ref.
TT	4 (13.79)	6 (20.69)	4,2 (0,83-21,35)	0,17	7 (24.14)	3 (10.34)	0,59 (0,11-3,01)	0,81	7 (24.14)	3 (10.34)	3,64 (0,50-26,76)	0,42
Modelo T												
CC	12 (41.38)	4 (13.79)	1,00	Ref.	10 (34.48)	6 (20.68)	1,00	Ref.	15 (51.72)	1 (3.45)	1,00	Ref.
TT+CT	6 (20.69)	7 (24.14)	3,5 (0,73-16,85)	0,23	8 (27.60)	5 (17.24)	1,04 (0,23-4,70)	0,74	9 (31.03)	4 (13.79)	6,67 (0,64-69,35)	0,21

IC 95%: intervalo de confiança de 95%

PSA: Antígeno Prostático Específico

TNM: Tumour Node Metastasis

Ref: genótipo de referência

SNPs no gene *TLR4* apresentam divergência ente grupos étnicos (OLIVEIRA, 2012b), o que justifica os dados conflitantes da literatura e os resultados aqui demonstrados. Além disso, a população brasileira é altamente miscigenada (SCHWARCZ, 2012), o que pode ser um fator preponderante na determinação de genótipos de susceptibilidade. Finalmente, estudos multidisciplinares são necessários para melhor compreender a influência de mutações no gene *TLR4* e seus efeitos biológicos na etiopatologia do CaP.

4 CONCLUSÃO

Nosso trabalho foi o primeiro a avaliar a influência do SNP Thr399Ile do gene *TLR4* na susceptibilidade ao CaP na população brasileira. Contudo, os genótipos não se encontram em HWE e não foi associado à ocorrência e progressão doença. Portanto, estudos adicionais são necessários em um número maior de indivíduos, bem como a realização de ensaios voltados para a compreensão dos efeitos biológicos dessa mutação na tumorigênese prostática.

REFERÊNCIAS

- AARON, L.; FRANCO, O. E.; HAYWARD, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics Of North America**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.279-288, ago. 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ucl.2016.04.012.
- ABEL, A. M.; YANG, C.; THAKAR, M. S.; MALARKANNAN, S. Natural Killer Cells: development, maturation, and clinical utilization. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 9, 13 ago. 2018. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01869.
- ABREU, B. A. L.; CHAVES, G. A.; SOARES JUNIOR, J.; ABREU, E. L.; FONTES, E. A. C.; ABREU, E. L.; BONA, J. W. Cintilografia óssea no câncer de próstata. **Radiologia Brasileira**, [s.l.], v. 38, n. 5, p.365-369, set. 2005. FapUNIFESP. SciELO. DOI: 10.1590/s0100-39842005000500011.
- ACHYUT, B. R.; GHOSHAL, U. C.; MOORCHUNG, N.; MITTAL, B.; Association of Toll-like receptor-4 (Asp299Gly and Thr399Ile) gene polymorphism with gastritis and precancerous lesions. **Human Immunol**, 68.11 p. 901-907, 2007. DOI: 10.1016/j.humimm.2007.10.006.
- ADASP, 2017. **Understanding Your Pathology Report: Prostate Cancer**. American Cancer Society, 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/tests/understanding-your-pathology-report/prostate-pathology/prostate-cancer-pathology.html>>. Acesso em: 08 maio de 2020.
- AHEARN, T. U. Calcium-Sensing Receptor Tumor Expression and Lethal Prostate Cancer Progression. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 6, p. 2520-2527, 2016. DOI: 10.1210/jc.2016-1082.
- 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 BV. DOI: 10.1016/j.amsu.2016.07.006.
- APPLE, S. Sentinel Lymph Node in Breast Cancer: Review Article from a Pathologist's Point of View. **The Korean Society of Pathologist**, v.50, n.2, p. 83-95, mar 2016. Journal of Pathology Translational Medicine. DOI: 10.4132/jptm.2015.11.23
- ARAÚJO, K. L. de et al. O papel dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) Pvu II e Xba I e das Pequenas Repetições em Tandem (STRs)(TA) no Receptor de

Estrogênio Alfa (ESR1) na Suscetibilidade do Câncer da Mama (BRCA). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 2, p. 185-192, 2009.

BESEDOVSKY, L.; LANGE, T.; HAACK, M. The Sleep-Immune Crosstalk in Health and Disease. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 99, n. 3, p. 1325-1380, 1 jul. 2019. American Physiological Society. DOI: 10.1152/physrev.00010.2018.

BEUTLER, B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 227, n. 1, p.248-263, jan. 2009. Wiley. DOI: 10.1111/j.1600-065x.2008.00733.x.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 68, n. 6, p. 394-424, 12 set. 2018. Wiley. DOI: 10.3322/caac.21492.

BRUBAKER, S. W.; BONHAM, K. S.; ZANONI, I.; KAGAN, J. C. Innate Immune Pattern Recognition: a cell biological perspective. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 257-290, 21 mar. 2015. Annual Reviews. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112240.

BRYANT, C. E.; SYMMONS, M.; GAY, N. J. Toll-like receptor signalling through macromolecular protein complexes. **Molecular Immunology**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.162-165, fev. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.06.033.

CARVALHO, L. R. **Inflamação e cancer hepático e pulmonar em camundongos selecionados para máxima ou mínima resposta inflamatória aguda**. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. 2013.

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. DOI: 10.5812/ircmj.6499.

CHEN, N.; ZHOU, Q. The evolving Gleason grading system. **Chinese Journal of Cancer Research**. v. 28, n. 1, p. 58-64, 2016. DOI: 10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.04.

CHEN, Y. C., GIOVANNUCCI, E., LAZARUS, R., KRAFT, P., KETKAR, S., HUNTER, D. J. Sequence variants of Toll-like receptor 4 and susceptibility to prostate cancer. **Cancer research**, v. 65, n. 24, p. 11771-11778, 2005. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2078.

COHEN, R. J. et al. Central Zone Carcinoma of the Prostate Gland: A Distinct Tumor Type With Poor Prognostic Features. **The Journal of Urology**. v. 179, n. 5, p. 1762-1767, 2008. DOI: 10.1016/j.juro.2008.01.017.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, [s.l.], v. 420, n. 6917, p. 860-867, dez. 2002. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/nature01322.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: parte i. fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s.l.], v. 50, n. 4, p. 434-447, ago. 2010. Fap UNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s0482-50042010000400008.

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. DOI: 10.1186/s40880-017-0198-3.

DAI, C; HEEMERS, H; SHARIFI, N. Androgen Signaling in Prostate Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 9, 7 abr. 2017. Cold Spring Harbor Laboratory. DOI: 10.1101/cshperspect.a030452.

DALMARONI, M.; GERSWHIN, M.; ADAMOPOULOS, I. The critical role of toll-like receptors – From microbial recognition to autoimmunity: a comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, v.15, n.1, p.1-8, jan 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.08.009.

DAVOODI, H.; SEOW, F.. Variant Toll-like receptor4 (Asp299Gly and Thr399Ile alleles) and Toll-like receptor2 (Arg753Gln and Arg677Trp alleles) in colorectal cancer. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, p. 91-99, 2011.

DENNIS, L. K; LYNCH, C. F; TORNER, J. C. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. **Urology**, [S.L.], v. 60, n. 1, p. 78-83, jul. 2002. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0090-4295(02)01637-0.

ONCOGUIA. **O que é Câncer**. Instituto Oncoguia, 2015. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/cancer/12/1/>>. Acesso em: 12 maio de 2020.

ONCOGUIA. **Efeitos colaterais da quimioterapia**. Instituto Oncoguia, 2018. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/efeitos-colaterais-da-quimioterapia/3706/593/>>. Acesso em: 20 dezembro de 2020.

EREMINA, N. V.; KAZEY, V. I.; MISHUGIN, S. V.; LEONENKOV, R. V.; PUSHKAR, D. Y.; METT, V. L.; GUDKOV, A. V. First-in-human study of anticancer immunotherapy drug candidate mobilan: safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics in prostate cancer patients. **Oncotarget**, [s.l.], v. 11, n. 14, 7 abr. 2020. Impact Journals, LLC. DOI: 10.18632/oncotarget.27549.

FERWERDA, B.; MCCALL, M. B. B.; VERHEIJEN, K.; KULLBERG, B-Jan.; VEN, A. J. A. M. van D.; MEER, J. W. M. van D.; NETEA, M. G.. Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms. **Molecular Medicine**, [S.L.], v. 14, n. 5-6, p. 346-352, 25 jan. 2008. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.2119/2007-00135.ferwerda.

GANN, P. H. Risk factors for prostate cancer. **Reviews in urology**, v. 4, n. Suppl 5, p. S3, 2002.

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. SAGE Publications. DOI: 10.4137/bic.s31802.

GENECARDS, 2018. **TLR4 Gene (Protein Coding)**. Disponível em: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TLR4>>. Acesso em: 10 março de 2020.

GEORGEL, P.; JIANG, Z.; KUNZ, S.; JANSSEN, E.; MOLS, J.; HOEBE, K.; BAHRAM, S.; OLDSTONE, M.B.A.; BEUTLER, B.. Vesicular stomatitis virus glycoprotein G activates a specific antiviral Toll-like receptor 4-dependent pathway. **Virology**, [S.L.], v. 362, n. 2, p. 304-313, jun. 2007. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.virol.2006.12.032.

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. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.05.008.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, [s.l.], v. 140, n. 6, p. 883-899, mar. 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.025.

HARVARD. **Prostate Basics**. Prostate Knowledge, 2011. Disponível em: <<https://www.harvardprostateknowledge.org/prostate-basics>>. Acesso em: 10 maio de 2020.

HARVEY, B., SIMON, M. D. **Prostate Enlargement (Benign Prostatic Hyperplasia)**. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2014. Disponível em:

<<https://www.niddk.nih.gov/health-information/urologic-diseases/prostate-problems/prostate-enlargement-benign-prostatic-hyperplasia>>. Acesso em: 30 maio de 2020.

HE, S. et al. Potent activity of the Hsp90 inhibitor ganetespib in prostate cancer cells irrespective of androgen receptor status or variant receptor expression. **International Journal of Oncology**, v. 42, n. 1, p. 35-43, 2012. DOI: 10.3892/ijo.2012.1698.

HEALTH Q. O. et al. Robotic surgical system for radical prostatectomy: a health technology assessment. **Ontario health technology assessment series**, v. 17, n. 11, p. 1, 2017.

HIFUPLANET. **Câncer da próstata**: diagnóstico e classificação. Tratamento do câncer localizado da próstata por ultrassons focalizados de alta intensidade (HIFU), 2010. Disponível em: <<http://www.hifu-planet.com.br/cancer-da-prostata/diagnostico-classificacao>>. Acesso em: 14 julho de 2020.

HOLD, G. L.; RABKIN, C. S.; CHOW, W-H.; SMITH, M. G.; GAMMON, M. D.; RISCH, H. A.; VAUGHAN, T. L.; MCCOLL, K. E.L.; LISSOWSKA, J.; ZATONSKI, W.. A Functional Polymorphism of Toll-Like Receptor 4 Gene Increases Risk of Gastric Carcinoma and Its Precursors. **Gastroenterology**, [S.L.], v. 132, n. 3, p. 905-912, mar. 2007. Elsevier BV. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.12.026.

HUMPHREY, P. A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. **Modern Pathology**. v. 17, n. 1, p. 292-306, 2004. DOI: 10.1038/modpathol.3800054.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Estatísticas de Câncer**. 2020a. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 31 julho de 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Câncer de próstata**. 2020b. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 18 julho de 2020.

JHA, G. G.; ANAND, V.; SOUBRA, A.; KONETY, B. R. Challenges of managing elderly men with prostate cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 6, p. 354-364, 13 maio 2014. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.71.

JOBIM, M.; JOBIM, L. F. J. Células natural killer e vigilância imunológica. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 84, n. 4, p. 58-67, ago. 2008. FapUNIFESP (SciELO). DOI: 10.1590/s0021-75572008000500009.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. **Immunity**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.637-650, maio 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.05.006.

KIESER, K. J.; KAGAN, J. C. Multi-receptor detection of individual bacterial products by the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 17, n. 6, p. 376-390, 2 maio 2017. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/nri.2017.25.

KIM, E. J. et al. Association Between Toll-Like Receptors/CD14 Gene Polymorphisms and Inflammatory Bowel Disease in Korean Population. **Journal Of Korean Medical Science**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.72-77, 2012. Korean Academy of Medical Sciences (KAMJE). DOI: 10.3346/jkms.2012.27.1.72.

KLAASSEN, Z. et al. Factors predicting skeletal-related events in patients with bone metastatic castration-resistant prostate cancer. **Cancer**, [s.l.], v. 123, n. 9, p.1528-1535, 27 dez. 2016. Wiley. DOI: 10.1002/cncr.30505.

LANGSENLEHNER, U.; WOLF, G.; LANGSENLEHNER, T.; GERGER, A.; HOFMANN, G.; CLAR, H.; WASCHER, T. C.; PAULWEBER, B.; SAMONIGG, H.; KRIPPL, P.. Genetic polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and breast cancer risk. The Austrian “tumor of breast tissue: incidence, genetics, and environmental risk factors study. **Breast Cancer Research And Treatment**, [S.L.], v. 109, n. 2, p. 297-304, 17 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s10549-007-9655-z.

LI, J. et al. Ethnical disparities of prostate cancer predisposition: genetic polymorphisms in androgen-related genes. **American Journal of Cancer Research**, v. 3, n. 2, p. 127-151, 2013.

LIU, W. et al. Circulating tumor cells in prostate cancer: Precision diagnosis and therapy. **Oncology Letters**, v. 14, n. 2, p. 1223-1232, 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.6332.

LUO, B.; HAN, L.; LIU, S.; WANG, X.; SHI, Y.; ZHAO, Z.; ZHAO, C. Toll-like receptor gene polymorphisms and susceptibility to Epstein-Barr virus-associated and -negative gastric carcinoma in Northern China. **Saudi Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], v. 21, n. 2, p. 95, 2015. Medknow. DOI: 10.4103/1319-3767.153832.

MAESHIMA, N.; FERNANDEZ, R. C. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [s.l.], v. 3, p. 1-2, 2013. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00003.

MAIA, M. C.; HANSEN, A. R. A comprehensive review of immunotherapies in prostate cancer. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, [s.l.], v. 113, p. 292-303, maio 2017. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.02.026.

- MELEGH, Z.; OLTEAN, S. Targeting Angiogenesis in Prostate Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 11, p. 2676, 31 maio 2019. MDPI AG. DOI: 10.3390/ijms20112676.
- MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; CRUVINEL, W. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos t e b. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s.l.], v. 50, n. 5, p. 552-580, out. 2010. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1590/s0482-50042010000500008.
- MESSARITAKIS et al.. Evaluation of the detection of Toll-like receptors (TLRs) in cancer development and progression in patients with colorectal cancer. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 1-2, 8 jun. 2018. Public Library of Science (PLOS). DOI: 10.1371/journal.pone.0197327.
- MORRIS, E. J. A.; PENEGAR, S; WHIFFIN, N; BRODERICK, P; BISHOP, D. T; NORTHWOOD, E; QUIRKE, P; FINAN, P; HOULSTON, R. S.. A Retrospective Observational Study of the Relationship between Single Nucleotide Polymorphisms Associated with the Risk of Developing Colorectal Cancer and Survival. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 2, 24 fev. 2015. Public Library of Science (PLOS). DOI: 10.1371/journal.pone.0117816.
- 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. DOI: 10.1016/j.bjid.2015.10.011.
- MUNN, L. L. Cancer and inflammation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.1370-1382, 12 dez. 2016. Wiley. DOI: 10.1002/wsbm.1370.
- NARDO, D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, [s.l.], v. 74, n. 2, p.181-189, ago. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.02.025.
- NEVEDOMSKAYA, E.; BAUMGART, S. J.; HAENDLER, B. Recent advances in prostate cancer treatment and drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 5, p. 1359, 2018. DOI: 10.3390/ijms19051359.
- NGUYEN, A. V.; SOULIKA, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 8, p. 1811, 12 abr. 2019. MDPI AG. DOI: 10.3390/ijms20081811.
- OBLAK, A.; JERALA, R. Toll-Like Receptor 4 Activation in Cancer Progression and Therapy. **Clinical And Developmental Immunology**, [s.l.], v. 2011, p.1-12, 2011. Hindawi Limited. DOI: 10.1155/2011/609579.

OLIVEIRA, J. G.. Polymorphisms of the TLR2 and TLR4 genes are associated with risk of gastric cancer in a Brazilian population. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 1235-1236, 2012a; 2012b. Baishideng Publishing Group Inc. DOI: 10.3748/wjg.v18.i11.1235.

OSTRANDER, E. A. **Frameshift Mutation**. National Human Genome Research Institute, 2020. Disponível em: <<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Frameshift-Mutation>>. Acesso em: 02 junho de 2020.

PANDEY, N. O.; CHAUHAN, A. V.; RATHATHA, N. S.; PATEL, P. K.; KHANDELWAL, R.; DESAI, A. N.; CHOXI, Y.; KAPADIA, R. S.; JAIN, N. D. Association of TLR4 and TLR9 polymorphisms and haplotypes with cervical cancer susceptibility. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 1-2, 5 jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1038/s41598-019-46077-z.

PANDYA, P. H.; MURRAY, M. E.; POLLOK, K. E.; RENBARGER, J. L. The Immune System in Cancer Pathogenesis: potential therapeutic approaches. **Journal Of Immunology Research**, [s.l.], v. 2016, p. 1-13, 2016. Hindawi Limited. DOI: 10.1155/2016/4273943.

PEI, Z.; LIN, D.; SONG, X.; LI, H.; YAO, H. TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGF β 1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide. **Cellular Immunology**, [s.l.], v. 254, n. 1, p. 20-27, 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.cellimm.2008.06.007.

PIÓCIENNIKOWSKA, A.; HROMADA-JUDYCKA, A.; BORZĘCKA, K.; KWIATKOWSKA, K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 557-581, 22 out. 2014. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s00018-014-1762-5.

RAVAL, R. R. et al. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. **Journal For Immunotherapy Of Cancer**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.2-14, 2014. Springer Nature. DOI: 10.1186/2051-1426-2-14.

ROSA, R. R. et al. **Polimorfismos de nucleotídeo único em genes de metalotioneína e o risco de carcinoma epidermoide oral em uma população brasileira**. 2016. 116 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

RUMEL, Davi. "Odds ratio": algumas considerações. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, n. 3, pág. 253-258, junho de 1986. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-

89101986000300011&lng=en&nrm=iso>. acesso em 23 de novembro de 2020. DOI: /10.1590/S0034-89101986000300011.

RUNHAN, R. 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. DOI: 10.5489/cuaj.3418.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, v. 2, n. 39, p.97-106, jan 2016. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1007/s13402-016-0268-6.

SAMADI, Abbas K. et al. A multi-targeted approach to suppress tumor-promoting inflammation. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2015. DOI: 10.1016 / j.semcancer.2015.03.006.

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

SANDHU, G. S.; ANDRIOLE, G. L. Overdiagnosis of Prostate Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 2012, n. 45, p. 146-151, 2012. DOI: 10.1093/jncimonographs/lqs031.

SARMA, A. V.; MCLAUGHLIN, J. C.; WALLNER, L. P.; DUNN, R. L.; COONEY, K. A.; SCHOTTENFELD, D.; MONTIE, J. E.; WEI, J. T.. Sexual Behavior, Sexually Transmitted Diseases and Prostatitis: the risk of prostate cancer in black men. **Journal Of Urology**, [S.L.], v. 176, n. 3, p. 1108-1113, set. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). DOI: 10.1016/j.juro.2006.04.075.

SCHILITZ, A. O. C.; LIMA, F. C. S.; OLIVEIRA, J. F. P.; SANTOS, M. O.; REBELO, M. S. **Estimativa 2020 - Incidência de câncer no Brasil**. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. 2020. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 02 junho de 2020.

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.

SEMLALI, A.; PARINE, N. R.; AMRI, A. A.; AZZI, A.; ARAFAH, M.; KOHAILAN, M.; SHAIK, J.; A. A. M.; ALJEBREEN, A.; ALHARBI, O. Association between TLR-9 polymorphisms and colon cancer susceptibility in Saudi Arabian female

patients. **Oncotargets And Therapy**, [s.l.], v. 10, p. 1-11, dez. 2016a. Informa UK Limited. DOI: 10.2147/ott.s106024.

SEMLALI, A. et al. Expression and polymorphism of toll-like receptor 4 and effect on NF- κ B mediated inflammation in colon cancer patients. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0146333, 2016b. DOI: 10.1371/journal.pone.0146333

SILVA, M. S. et al. **Estudo de associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes e refratariedade medicamentosa em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial**. 2010. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SINGH, S.; PRIYADARSHINI, A.; CHAKRABORTI, A.; MANDAL, A.. Asp299Gly and Thr399Ile polymorphism of TLR-4 gene in patients with prostate cancer from North India. **Indian Journal Of Urology**, 2013. Medknow. DOI: 10.4103/0970-1591.109982.

SOHN, E. Screening: Diagnostic dilemma. **Nature**, v. 528, n. 1, p. 120-122, 2015. DOI: 10.1038/528S120a.

SPENCE, A. R. et al. Circumcision and prostate cancer: a population-based case-control study in Montréal, Canada. **Bju International**, [s.l.], v. 114, n. 6, p.90-98, 28 maio 2014. Wiley. DOI: 10.1111/bju.12741.

SPERLING, D. **Prostate Zone Anatomy, Prostate Cancer and Imaging**. Speling Prostate Center, 2012. Disponível em: < <http://sperlingprostatecenter.com/prostate-zone-anatomy-prostate-cancer-and-imaging/>>. Acesso em: 08 abril de 2020.

UK, Cancer Research. **How cancer starts**. Disponível em: <<https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts>>. Acesso em: 11 abril de 2020.

WANG, G.; ZHAO, D.; SPRING, D. J.; DEPINHO, R. A.. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes & Development**, [S.L.], v. 32, n. 17-18, p. 1105-1140, 1 set. 2018. Cold Spring Harbor Laboratory. DOI: 10.1101/gad.315739.118.

WANG, Y.; CHEN, X.; CHEN, Y. Interleukin-6 gene -572G/C polymorphism and prostate cancer risk. **African Health Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 267-272, 22 jun. 2018. African Journals Online (AJOL). DOI: 10.4314/ahsv18i2.10.

WOODARD, T. J. et al. Management of Benign Prostatic Hyperplasia in Older Adults. **The Consultant Pharmacist**, [s.l.], v. 31, n. 8, p.412-424, 1 ago 2016. American Society of Consultant Pharmacists. DOI: 10.4140/tcp.n.2016.412.

YAN, T.; YU, X.; SUN, X.; MENG, D.; JIA, J. A new steroidal saponin, furotrilliumoside from *Trillium tschonoskii* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in Raw264.7 cells by targeting PI3K/Akt, MARK and Nrf2/HO-1 pathways. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 115, p.37-45, dez. 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.fitote.2016.09.012.

YANAI, Y. et al. Evaluation of prostate-specific antigen density in the diagnosis of prostate cancer combined with magnetic resonance imaging before biopsy in men aged 70 years and older with elevated PSA. **Molecular And Clinical Oncology**, [s.l.], p.656-660, 19 set. 2018. Spandidos Publications. DOI: 10.3892/mco.2018.1725.

YANG, H.; ZHOU, H.; FENG, P.; ZHOU, X.; WEN, H.; XIE, X.; SHEN, H.; ZHU, X. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 92, 2010. Springer Science and Business Media LLC. DOI: 10.1186/1756-9966-29-92.

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; ZHANG, Y.; ZHANG, Q.; WANG, F.; ZHANG, D. Toll-Like Receptors and Prostate Cancer. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 5, p. 1-2, 23 jul. 2014. Frontiers Media SA. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00352.

ZHENG, S. L.. Sequence Variants of Toll-Like Receptor 4 Are Associated with Prostate Cancer Risk: results from the cancer prostate in sweden study. **Cancer Research**, [S.L.], v. 64, n. 8, p. 2918-2922, 15 abr. 2004. American Association for Cancer Research (AACR). DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3280.

ZIMMERMANN, C. **The Prostate**. Canadian Cancer Society, 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/prostate/prostate-cancer/the-prostate/?region=on>>. Acesso em: 11 abril de 2020.