



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MATEUS GOES QUINTELA

**O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E A EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES
DE AGRESSIVIDADE NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

MACAPÁ-AP
2022

MATEUS GOES QUINTELA

**O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E A EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES
DE AGRESSIVIDADE NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaaios Biológicos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Augusto Castilho-Martins

MACAPÁ-AP
2022

MATEUS GOES QUINTELA

**O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E A EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES
DE AGRESSIVIDADE NO CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na área de concentração Ensaio Biológicos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

DATA DE APROVAÇÃO: 25/02/2022



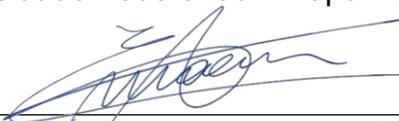
Examinadora: Prof. Dra. Artemis Socorro do Nascimento Rodrigues
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP



Examinador: Prof. Dr. Olavo Magalhães Picanço Júnior
Universidade Federal do Amapá – UNIFAP



Examinador: Prof. Dr. Fernando Antônio de Medeiros
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP



Orientador: Prof. Dr. Emerson Augusto Castilho Martins
Universidade Federal do Amapá - UNIFAP

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Jamile da Conceição da Silva – CRB-2/1010

- Q7p Quintela, Mateus Goes.
O papilomavírus humano (HPV) e a expressão de biomarcadores de agressividade no câncer de próstata / Mateus Goes Quintela – 2022.
1 recurso eletrônico. 66 folhas : ilustradas (Coloridas).
- Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2022.
Orientador: Professor Doutor Emerson Augusto Castilho Martins
- Modo de acesso: World Wide Web.
Formato de arquivo: Portable Document (PDF)
- Inclui referências e anexos.
1. Neoplasia de próstata. 2. Próstata – Câncer. 3. Papilomavírus. 4. Biomarcador. I. Martins, Emerson Augusto Castilho, orientador. II. Título.

Classificação Decimal de Dewey. 22 ed. 616.99263

QUINTELA, Mateus Goes. **O papilomavírus humano (HPV) e a expressão de biomarcadores de agressividade no câncer de próstata.** Orientador: Emerson Augusto Castilho Martins. 2022. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Campus Marco Zero, Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Macapá, 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos amores da minha vida: meus avós, Manoel e Graça, à minha tia, Keila, aos meus pais, Lilian e Kennedy e aos meus irmãos, Leticia, Bruno (*in memoria*) e Gustavo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Nossa Senhora de Nazaré e a todos os guias que sempre estiveram comigo, me protegendo e encorajando.

Agradeço aos meus avós, Manoel e Graça, por todo cuidado e amor que me foram dados em todas as etapas da vida, sem vocês a realização deste sonho não seria possível.

Agradeço ao meu irmão Bruno (*in memoriam*), que tornou meus dias mais felizes, você sempre estará comigo. Amo-te eternamente!

Agradeço à minha tia, Keila, por ser a minha maior inspiração e motivação para alçar voos cada vez mais altos.

Aos meus pais, Kennedy e Lilian e aos meus irmãos Letícia e Gustavo, vocês me ensinaram a ser persistente e guerreiro mesmo em meio às adversidades.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Emerson Castilho, pelo conhecimento e experiências compartilhadas, pelas longas conversas construtivas, por ter acreditado em mim e por ter possibilitado o desenvolvimento de competências que nem eu imaginava possuir, sua dedicação e bondade são admiráveis.

Agradeço à professora Dra. Artemis Rodrigues, por ter me apresentado o universo da biologia molecular e por ter me auxiliado a trilhar este caminho desde a graduação.

Ao meu amigo Gabriel, que esteve ao meu lado durante todo este percurso, vivenciando os momentos de alegrias e frustrações, você é um grande amigo, um grande profissional e um excelente pesquisador. Nós conseguimos!

Agradeço a Ma. Jemima, amiga, técnica do laboratório de Biologia Molecular. Sou grato pelas palavras de incentivo quando as forças pareciam diminuir, sou grato por ter me ensinado dicas preciosas para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Alice, Arthur Arantes, Beatriz, Cleice, Giovana, Izabela, Rafaella, Mateus, Naiza, Nicolas, Natália, Rafael, Tainá, Eduarda, Débora, Henrique e Flávia por terem tornado esta caminhada mais leve e por serem luz em minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro à pesquisa. Ao Ministério Público do Trabalho do Pará e Amapá, pelo apoio financeiro com equipamentos indispensáveis à pesquisa.

À UNIFAP pela estrutura de laboratório disponibilizada.

Agradeço ao professor e médico cirurgião Nalisson Pereira por me ter cedido

as amostras para a execução deste trabalho.

Minha gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*Porque se chamavam homens,
também se chamavam sonhos e
sonhos não envelhecem.*

Milton Nascimento

RESUMO

O câncer é uma doença iniciada pela desregulação gênica ocorrida pelo acúmulo de mutações no DNA. No processo de desenvolvimento do tumor os genes são expressos de maneira diferencial como forma de manutenção da heterogeneidade fenotípica característica das células cancerígenas. Portanto, avaliar o perfil de expressão dos genes em diferentes etapas clínicas da doença e sob influência de determinados fatores torna-se essencial para a compreensão dos mecanismos oncogênicos e de potenciais alvos terapêuticos e de prognóstico no câncer. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da infecção pelo HPV no perfil de expressão de cinco alvos moleculares envolvidos em mecanismos de agressividade do câncer em tecidos neoplásicos malignos da próstata. Para isto, foram coletadas amostras de biópsias prostáticas de 42 pacientes da cidade de Macapá-AP; destas, 30 foram diagnosticadas com câncer prostático e 12 sem a doença; do total de amostras, o HPV foi detectado em cinco pacientes com câncer (n=5) e em dois sem câncer (n=2). A análise de expressão gênica dos alvos *HOXC6*, *MCPIP3*, *CREB3L4*, *LINC01082* e *TRIP13* ocorreram por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real de RNA retrotranscrito (RT-qPCR) pelo método comparativo de ciclo de quantificação, ou também denominado ciclo Threshold. O presente estudo encontrou os genes *HOXC6* e *TRIP13* com expressão aumentada no câncer de próstata comparado ao grupo sem câncer; o RNA não codificante 01082 foi significativamente menos expressos na presença do câncer prostático; o gene *HOXC6* foi estatisticamente mais expresso em biópsias prostáticas classificadas como mais agressivas. A presença do HPV alterou a consistência dos genes *HOXC6* e *LINC01082* como marcadores de câncer, pois a diferença antes encontrada destes genes na presença e ausência do câncer não foi observada para estas mesmas variáveis na presença do HPV. Para o gene *MCPIP3*, a presença do HPV em amostras cancerígenas conferiu a redução drástica na expressão deste alvo, chamando atenção ao fato deste gene desempenhar importante função na diminuição dos mecanismos inflamatórios. Portanto, o presente estudo contribui com evidências de três potenciais biomarcadores de prognóstico de câncer de próstata na população estudada e demonstra que o HPV contribui para a expressão gênica diferencial no microambiente prostático cancerígeno.

Palavras-chave: câncer de próstata. Biomarcador. Expressão Gênica. HPV.

ABSTRACT

Cancer is a disease initiated by gene dysregulation caused by the accumulation of mutations in DNA. In the process of tumor development, genes are differentially expressed as a way of maintaining the phenotypic heterogeneity characteristic of cancer cells. Therefore, evaluating the gene expression profile at different clinical stages of the disease and under the influence of certain factors becomes essential for understanding oncogenic mechanisms and potential therapeutic and prognostic targets in cancer. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of HPV infection on the expression profile of five molecular targets involved in mechanisms of cancer aggressiveness in malignant neoplastic tissues of the prostate. For this, samples of prostate biopsies were collected from 42 patients in the city of Macapá-AP; of these, 30 were diagnosed with prostate cancer and 12 without the disease; of the total samples, HPV was detected in five patients with cancer (n=5) and in two without cancer (n=2). The analysis of gene expression of the targets *HOXC6*, *MCPIP3*, *CREB3L4*, *LINC01082* and *TRIP13* occurred by real-time quantitative polymerase chain reaction of retrotranscribed RNA (RT-qPCR) by the comparative method of quantification cycle, or also called Threshold cycle. The present study found *HOXC6* and *TRIP13* genes with increased expression in prostate cancer compared to the non-cancer group; non-coding RNA 01082 was significantly less expressed in the presence of prostate cancer; the *HOXC6* gene was statistically more expressed in prostate biopsies classified as more aggressive. The presence of HPV altered the consistency of the *HOXC6* and *LINC01082* genes as cancer markers, since the difference previously found in these genes in the presence and absence of cancer was not observed for these same variables in the presence of HPV. For the *MCPIP3* gene, the presence of HPV in cancer samples resulted in a drastic reduction in the expression of this target, drawing attention to the fact that this gene plays an important role in reducing inflammatory mechanisms. Therefore, the present study contributes evidence of three potential prognostic biomarkers of prostate cancer in the studied population and demonstrates that HPV contributes to differential gene expression in the cancerous prostate microenvironment.

Keywords: prostate cancer. Biomarker. Gene expression. HPV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Marcas registradas do câncer.....	21
Figura 2 - Morfologia do HPV.....	26
Figura 3 - Organização do genoma do HPV.....	27
Figura 4 - Anatomia da próstata.....	29
Figura 5 - Mecanismo de progressão do câncer de próstata.....	30
Figura 6 - Score de Gleason.....	31
Figura 7 - Incidência e mortalidade mundial de câncer em homens no ano de 2020	32
Figura 8 - Incidência estimada de casos de câncer de acordo com a localização ...	33
Figura 9 - Plot de amplificação.....	41
Figura 10 - Curva padrão de diluição.....	42
Figura 11 - Curva de dissociação.....	43
Figura 12 - Perfil de expressão dos alvos em amostras cancerígenas e não cancerígenas de próstata.....	44
Figura 13 - Perfil de expressão gênica dos alvos de acordo com o Score de Gleason	46
Figura 14 - Perfil de expressão gênica dos alvos de acordo com a presença do HPV	47
Figura 15 - Perfil de expressão gênica geral dos grupos analisados.....	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Protocolo para reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para detecção do HPV37
- Tabela 2** - Protocolo de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para análise de expressão gênica38
- Tabela 3** - Descrição dos primers39
- Tabela 4** - Valor (média \pm erro padrão) de Δ Ct (diferença entre ciclos de limiar de detecção entre o gene alvo e o controle endógeno *GAPDH*) de amostras de biópsia de próstata com e sem câncer, obtidos a partir de qPCR de DNA complementar produzido com o RNA extraído das amostras, para cinco alvos diferentes, e valor de Expressão Relativa (ER), que representa quantas vezes o gene é expresso nas amostras com câncer comparado às amostras sem câncer em conjunto com a significância estatística representada pelo símbolo asterisco.45
- Tabela 5** - Valor (média \pm erro padrão) de Δ Ct (diferença entre ciclos de limiar de detecção entre o gene alvo e o controle endógeno *GAPDH*) de amostras de biópsia de câncer de próstata entre o grupo com score <8 e ≥ 8 obtidos a partir de qPCR de DNA complementar produzido com o RNA extraído das amostras, para cinco alvos diferentes, e valor de Expressão Relativa (ER), que representa quantas vezes o gene é expresso nas amostras com score <8 comparado às amostras com score ≥ 846
- Tabela 6** - Valor (média \pm erro padrão) de Δ Ct (diferença entre ciclos de limiar de detecção entre o gene alvo e o controle endógeno *GAPDH*) de amostras de biópsia de câncer de próstata entre o grupo amostral cancerígeno com HPV e sem HPV obtidos a partir de qPCR de DNA complementar produzido com o RNA extraído das amostras, para cinco alvos diferentes, e valor de Expressão Relativa (ER), que representa quantas vezes o gene é expresso nas amostras com câncer e com HPV comparado às amostras com câncer sem HPV.47
- Tabela 7** - Valores do teste ANOVA a partir do Δ Ct (diferença entre ciclos de limiar de detecção entre o gene alvo e o controle endógeno *GAPDH*) de amostras de biópsia próstata entre o grupo amostral cancerígeno com HPV e sem HPV e não cancerígeno com HPV e sem HPV obtidos a partir de qPCR de DNA complementar produzido com o RNA extraído das amostras, para cinco alvos diferentes.49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
cAMP	Adenosina 3,5 Monofosfato Cíclico
AP	Amapá
AR	Receptor Androgênico
CAEE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CK14	Citoqueratina 14
CK18	Citoqueratina 18
CK5	Citoqueratina 5
CK8	Citoqueratina 8
cm	Centímetros
CREB3L4	Proteína 3 de ligação ao elemento responsivo a AMP cíclico 4
Ct	Ciclo Threshold
DHT	Dihidrotestosterona
DHT-AR	Dihidrotestosterona-Receptor Androgênico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
Ga	Gauge
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GLOBOCAN	Observatório Global de Câncer
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
H ₂ O	Fórmula Molecular da Água
HOX	Homeobox
HOXC6	Homeobox C6
HPV	Papilomavírus Humano
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kbp	Quilo Pares de Bases
LCR	Long Control Region
LH	Hormônio Luteinizante
LINC01082	RNA não codificante 01082

M	Molar
MCP1P3	Do inglês <i>Zinc finger CCCH-type containing 12C</i>
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
n°	Número
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
ORF	Open Reading Frame
p	Braço Curto do Cromossomo
p53	Proteína 53
p63	Proteína 63
pH	Potencial Hidrogeniônico
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PSA	Antígeno Prostático Específico
q	Braço Longo do Cromossomo
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real
s	Segundos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF- α	Interferón Alfa
TNM	Tumor, Linfonodo e Metástase
TRIP13	Do inglês <i>Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein 13</i>
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
X	Veze
x g	Veze a gravidade
Δ Ct	Varição do ciclo <i>Threshold</i>
$\Delta\Delta$ Ct	Varição da variação do ciclo <i>Threshold</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
ng/mL	Nanogramas por mililitro
ER	Expressão relativa

DF	Grau de Liberdade
Sq	Soma dos quadrados
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
TCGA	Do inglês <i>The Cancer Genome Atlas</i>
N	Número

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
4.1 O CÂNCER.....	20
4.2 BIOMARCADORES DE AGRESSIVIDADE	22
4.2.1 Gene <i>CREB3L4</i>	22
4.2.2 Gene <i>HOXC6</i>	23
4.2.3 Gene <i>MCPIP3</i>	24
4.2.4 Gene <i>TRIP13</i>	24
4.2.5 RNA Longo Não-Codificante 01082	25
4.3 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO	26
4.3.1 Biologia do HPV	26
4.3.2 Ciclo de infecção do HPV	27
4.3.3 Classificação do HPV	28
4.2 A PRÓSTATA E O CÂNCER	29
4.2.1 A próstata	29
4.2.2 Desenvolvimento e classificação do câncer de próstata	30
4.2.3 Rastreamento e diagnóstico	31
4.2.4 Epidemiologia do câncer de próstata	32
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 CASUÍSTICA	34
5.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	34
5.3 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS	34
5.5 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	35
5.6 QUANTIFICAÇÃO DO RNA E DNA EXTRAÍDO	36
5.7 DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	36
5.8 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (TRANSCRIÇÃO REVERSA – RT) ..	37
5.9 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PRIMERS	37

5.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL DE DNA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-qPCR)	38
5.11 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE mRNA.....	39
5.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
6 RESULTADOS	41
6.1 VALIDAÇÃO DOS PRIMERS	41
6.1.1 Plot de amplificação	41
6.1.2 Gráfico de curva padrão	42
6.1.3 Curva de dissociação	43
6.2 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS ALVOS.....	44
7 DISCUSSÃO.....	50
8 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Assim como a evolução das espécies, as trilhões de células que compõem o corpo humano estão sujeitas às forças mutacionais e à ação da seleção natural. Este processo de evolução somática ocorre pelo acúmulo de mutações não intencionais ao DNA durante as constantes divisões celulares; mudanças estas ocasionadas por fatores intrínsecos e extrínsecos às células, como, por exemplo, a exposição aos agentes estressores mutagênicos (MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015).

Como consequência das mutações surge o câncer, caracterizado pelo crescimento desregulado de células de um determinado tecido. Esta condição clínica pode surgir em qualquer órgão humano, porém, em alguns tecidos, a doença pode ser milhões de vezes mais frequente; este fenômeno está associado ao número aumentado de divisões celulares, à capacidade de manutenção da homeostase tecidual e principalmente à “má sorte” em acumular estas mutações aleatórias durante a replicação (TOMASETTI; VOGELSTEIN, 2015).

Entre os fatores desencadeantes dos cânceres estão àqueles relacionados às infecções por micro-organismos, apontados como causa de 20-25% de todas as neoplasias humanas (ARALDI *et al.*, 2018). Atualmente, um dos principais agentes infecciosos envolvidos na carcinogênese é o papilomavírus humano (HPV), estes vírus são responsáveis por expressar oncoproteínas que alteram e inativam importantes mecanismos de regulação da proliferação celular, induzindo a formação dos tumores (SZYMONOWICZ; CHEN, 2020).

O HPV tem sido amplamente associado ao desenvolvimento de diversos tipos de cânceres, entre eles o câncer do colo do útero, câncer anogenital, cabeça e pescoço (DE MARTEL *et al.*, 2017); contudo, os mecanismos moleculares e os aspectos clínicos da infecção viral com o desenvolvimento de outros tipos de cânceres são incipientes, como, por exemplo, a relação com o câncer prostático.

Por esta razão, este estudo teve o objetivo de avaliar a influência da infecção pelo papilomavírus humano em amostras teciduais de câncer de próstata de pacientes da cidade de Macapá no perfil de expressão de genes envolvidos em mecanismos moleculares de agressividade do câncer.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença que afeta milhões de pessoas anualmente. Estudos prospectivos estimam que os números de casos de câncer anual passem de 19,3 milhões em 2020 para 30,2 milhões em 2040, para o câncer de próstata, a prospecção é de 1,9 milhões de casos para 2,4 milhões nos respectivos anos (GLOBOCAN, 2022).

Atualmente, diante do desenvolvimento e aprimoramento de técnicas moleculares e genéticas, é possível demonstrar comportamentos a nível gênico que aumentam as chances de um indivíduo vir a desenvolver alguma neoplasia maligna; bem como possibilitar a predição do comportamento tumoral, contribuindo assim para a escolha terapêutica mais especializada e conseqüentemente para o aumento da sobrevida.

Deste modo, compreender o comportamento de genes em diferentes circunstâncias pode contribuir fortemente para a identificação de potenciais genes que impactem o diagnóstico e o tratamento do câncer. Outro importante fator ainda pouco elucidado na literatura é o envolvimento do papilomavírus humano nos mecanismos oncogênicos específicos do câncer de próstata, considerando que nenhum alvo selecionado para o presente estudo foi investigado na presença da infecção viral do HPV.

Por fim, ressalta-se a escassez de estudos que investiguem os mecanismos genéticos e moleculares de maneira geral em torno do câncer na população do Amapá, haja vista que são poucos os grupos de pesquisa que exploram a genética molecular do câncer no Estado; este fator acaba por causar lacunas científicas que fragilizam a aplicação de tecnologias de diagnóstico ou de novas terapias gênicas individualizadas em razão da insuficiência de estudos disponíveis em torno da nossa população.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos genes *HOXC6*, *MCPIP3*, *CREB3L4*, *TRIP13* e do RNA não codificante *LINC01082* em tecidos prostáticos cancerígenos e não cancerígenos com ou sem HPV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial dos alvos selecionados como biomarcadores para o câncer de próstata;
- Comparar o potencial dos alvos selecionados como biomarcadores de agressividade de acordo com a classificação de Gleason;
- Avaliar o potencial dos alvos selecionados como biomarcadores para o câncer de próstata na presença do HPV.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 O CÂNCER

A formação do câncer é um produto dos processos evolutivos das espécies. A transição da unicelularidade dos seres primitivos para a multicelularidade exigiu o desenvolvimento de redes moleculares regulatórias que acompanhasse a complexidade dos organismos evolutivamente recém-emergidos, com a finalidade de regular a divisão celular, remover células danificadas e reparar o DNA. Paradoxalmente, esta transformação criou pontos de vulnerabilidade genômica que, quando mutados, levam ao surgimento de células potencialmente cancerígenas (NEDELCO, 2020; TRIGOS et al., 2018).

Cada vez que uma célula somática se divide, o DNA é replicado para as células-filhas; embora este processo seja rigorosamente preciso, é improvável que mutações não sejam introduzidas nas células seguintes. O acúmulo destes danos ao genoma, em conjunto com as modificações epigenéticas e a expressão estocástica dos genes, induzem à proliferação indiscriminada de uma população de células com genótipo e fenótipos caóticos, favorecendo os mecanismos oncogênicos (HENG; HENG, 2020; SOMARELLI, 2021; TURAJLIC et al., 2019; WILLIAMS; SOTTORIVA; GRAHAM, 2019).

Assim, o tumor pode ser representado como um ambiente geneticamente desregulado e por uma população diversificada de células. Esta heterogeneidade tumoral encontrada no câncer é o gatilho necessário para ativar os princípios evolutivos darwinianos de seleção natural, pois os múltiplos fenótipos celulares possibilitam também uma diversidade de características e comportamentos que moldarão o percurso da proliferação das células com uma finalidade: a sobrevivência (KOTLER; BROWN, 2020; NIJMAN, 2020; SCOTT; MARUSYK, 2017; SOMARELLI, 2021). Portanto, o câncer poderia ser definido como uma forma de evolução que deu errado no corpo humano.

À luz evolutiva, as características fenotípicas de uma célula cancerígena poderiam se equiparar aos mecanismos de adaptação das espécies no ambiente. No ano 2000 e atualizado em 2011, Hanahan e Weinberg (2011), descreveram 10 características comuns a todos os tipos de câncer (Figura 1) que fornecem à célula tumoral a capacidade de adaptação, sobrevivência e proliferação em condições metabólicas hostis, inativando os dispositivos humanos anticâncer e alterando o

microambiente tecidual em benefício do tumor (HANAHAN, D; WEINBERG, 2000; HANAHAN, Douglas; WEINBERG, 2011). Essas características são:

Figura 1 - Marcas registradas do câncer.



Imagem representativa das dez características comuns a todos os tipos de câncer, conhecidas como *hallmarks* de câncer. **Fonte:** Adaptado de Maccarthy-Morrogh e Martin (2020).

Mediadas pelo dogma central da biologia molecular, onde uma molécula de DNA é transcrita em um RNA e traduzido em uma cadeia de aminoácidos, cada atividade do câncer envolve a atuação de dezenas a centenas de proteínas, expressas pela combinação de diversos genes que podem ser suficientes para desencadear a carcinogênese e conduzir a evolução clínica da doença (SEGUNDO-VAL; SANZ-LOZANO, 2016).

De modo geral, os estudos em torno dos perfis de expressão dos genes têm sugerido novos insights sobre a progressão clínica dos tumores, dos mecanismos moleculares que conduzem a oncogênese e das vias celulares e extracelulares que operam os fenótipos do câncer, permitindo a expansão do conhecimento em torno da resistência medicamentosa, de novas terapias, alvos que possam atuar no prognóstico da doença e na identificação de potenciais biomarcadores genéticos (BARBIERI; KOUZARIDES, 2020; DESTERRO; BAK-GORDON; CARMO-FONSECA, 2020).

4.2 BIOMARCADORES DE AGRESSIVIDADE

Biomarcadores são observações biológicas que são capazes de prever um desfecho clínico ou um resultado intermediário em uma patologia. Estes importantes mecanismos são muito utilizados em diversas doenças humanas aplicadas ao rastreamento, diagnóstico, caracterização, monitoramento, prognóstico, escolha terapêutica individualizada, previsão de tratamento e reações adversas aos medicamentos (ARONSON; FERNER, 2017).

Na oncologia, a identificação de biomarcadores têm avançado mediante o crescimento das pesquisas genômicas, transcriptômicas e proteômicas, que possibilitaram a identificação de redes moleculares de sinalização capazes de gerar respostas quanto o início e progressão do câncer (KARCZEWSKI; SNYDER, 2018). Na transcriptômica, métodos cada vez mais tecnológicos, como técnicas de sequenciamento de RNA (RNAseq), qPCR *array*, microarranjos e a RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real) têm auxiliado a ciência na compreensão do comportamento dos genes no câncer em diferentes estágios e condições.

Desta forma, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a influência do papilomavírus humano (HPV) na expressão de cinco genes cujos níveis de seus transcritos estão relacionados com a agressividade do câncer.

4.2.1 Gene *CREB3L4*

O gene *CREB3L4* (Proteína 3 de ligação ao elemento responsivo a AMP cíclico 4), também conhecido como *AlbZIP*, *Tisp40* ou *ATCE1*, localiza-se no cromossomo 1, região q21.3 e expressa a proteína de mesmo nome, que atua na ativação da transcrição e no processamento de proteínas (ENSEMBL).

Quanto ao seu envolvimento na carcinogênese, o *CREB3L4* foi encontrado em up regulation (regulado para cima, com maior expressão gênica) em uma linhagem de células dependentes de andrógeno no câncer de próstata, sendo relacionado à proliferação celular ao inibir as fases intermediárias do ciclo celular (KIM *et al.*, 2017). Em conjunto com o gene *MUC1*, este gene promoveu a invasão e metástase em múltiplos tumores mamários, tornando-o potencial alvo terapêutico e de prognóstico neste tipo de câncer (JING *et al.*, 2019). Ainda no câncer de mama, mas em análises *in silico*, foi verificado que este gene é encontrado em superexpressão; já o silenciamento do gene promoveu a regressão da proliferação celular e indução à

apoptose *in vitro* (PU *et al.*, 2020).

No câncer gástrico, um estudo encontrou correlação entre a superexpressão deste alvo com estágios mais avançados do tumor e menor sobrevida dos pacientes. Os ensaios ainda demonstraram que este gene promoveu a proliferação celular, reduziu a apoptose e induziu a formação de estruturas endoteliais semelhantes a vasos sanguíneos (angiogênese) (WANG, N. *et al.*, 2021).

Desta forma, é possível verificar que o *CREB3L4* está envolvido em múltiplas marcas registradas do câncer, como na ativação da invasão e metástase, indução à angiogênese, resistência à morte celular e indução à proliferação, sendo imprescindível a investigação deste alvo em outros tipos de cânceres, na presença do HPV e fora das análises restritas a linhagens celulares.

4.2.2 Gene *HOXC6*

O Homeobox C6 (*HOXC6*) é um gene localizado no cromossomo 12, região q13.13. Este gene possui 2 éxons que codificam a proteína HOXC6 que possui 153 aminoácidos (ENSEMBL). Este gene faz parte da família HOX, que englobam genes que desempenham importante função no de tumores. Na neoplasia da próstata, este gene foi relatado em superexpressão e desenvolvimento embrionário e como fator de transcrição de reguladores da proliferação e diferenciação celular (SHEN *et al.*, 2017).

O *HOXC6* vem sendo amplamente investigado em diversos tipos associado às formas clínicas mais agressivas (WANG *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2020). No câncer gástrico este gene também foi identificado com expressão aumentada e como fator de ativação de outros genes regulados para cima em cânceres; também se observou associação clínica com a metástase e menores taxas de sobrevida em pacientes com este tipo de câncer (CHEN *et al.*, 2016; FUJIKI *et al.*, 2008; JUNG *et al.*, 2020).

O gene *HOXC6* atua no desenvolvimento do câncer cervical em associação com outros genes (WANG *et al.*, 2020a). Em glioblastomas este gene promoveu a proliferação de células tumorais e aumentou a capacidade invasiva, da mesma forma que o silenciamento deste gene diminuiu drasticamente esta capacidade nas células tumorais (YAN *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2019). O *HOXC6* foi selecionado não somente pela atuação na metástase e proliferação, mas pela sua capacidade de aumentar a expressão de outros genes carcinogênicos e pela ausência de estudos avaliando a relação ao HPV.

4.2.3 Gene *MCPIP3*

O gene *MCPIP3* (*Zinc finger CCCH-type containing 12C*), também conhecido como *KIAA1726*, está localizado no cromossomo 11 na porção q22.3. Este gene codifica a proteína ZC3H12C, que possui 883 aminoácidos (ENSEMBL).

Estudos sobre a atuação deste gene na carcinogênese são escassos. Há um único trabalho encontrado em bases de dados da *PubMed* que investigou a expressão deste gene no câncer colorretal e seu provável envolvimento no desenvolvimento patológico. O estudo encontrou esse gene menos expresso em células tumorais malignas comparadas a tecidos adjacentes normais; os pesquisadores também propuseram que a superexpressão deste gene inibe a migração em uma linhagem de células de câncer colorretal, sugerindo que o *MCPIP3* desempenha um papel negativo na capacidade proliferativa dos tumores neste tipo de câncer (SUK *et al.*, 2018).

Contudo, uma das características que mais chamam atenção para este gene é o envolvimento nos mecanismos inflamatórios devido à capacidade das proteínas expressas por este gene de degradarem citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6), funcionando como um gene que limita a inflamação (LIU *et al.*, 2021). Estes fatores destacam a relevância de identificar o perfil de expressão deste gene na neoplasia maligna da próstata e na infecção pelo HPV.

4.2.4 Gene *TRIP13*

O gene *TRIP13* (*Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein 13*) é localizado no cromossomo 5, região p15.33. Os transcritos deste gene desempenham atividades fundamentais na mitose, sobretudo na montagem do fuso e nas vias de reparo do DNA responsáveis pela manutenção da estabilidade do cromossomo (LU *et al.*, 2019). No entanto, evidências acumuladas mostraram que a desregulação dos níveis da proteína expressas por este gene são operacionais em vários tumores (WANG *et al.*, 2020b).

Curiosamente, o destaque para este gene no desenvolvimento do câncer passou a ser dado muito recentemente. Muitos estudos demonstraram o envolvimento deste gene na migração, invasão, metástase de células tumorais em diversos tipos de câncer, dentre eles o câncer colorretal (AGARWAL *et al.*, 2020; KURITA *et al.*, 2016), glioblastoma (ZHANG *et al.*, 2019), bexiga (GAO *et al.*, 2019) e ovário (ZHOU; SHU, 2019). A expressão elevada deste gene também foi correlacionada ao pior prognóstico

e com as formas mais agressivas do câncer esofágico (DI *et al.*, 2019), renal (KOWALEWSKI *et al.*, 2020), pulmão (LI *et al.*, 2018) e colorretal (SHENG *et al.*, 2018).

Alguns trabalhos avaliaram o comportamento de células cancerígenas com o silenciamento do gene *TRIP13*: foi observada que a diminuição e o bloqueio deste gene promovem a apoptose e inibem a capacidade proliferativa e metastática das células de câncer (AGARWAL *et al.*, 2020; DONG *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020b; YAO *et al.*, 2018). Outros estudos apontaram o envolvimento deste gene com a resistência medicamentosa (BANERJEE *et al.*, 2014; LU *et al.*, 2019; TAO *et al.*, 2017).

Apesar destes importantes achados, poucos realizaram estudos deste alvo no câncer de próstata e não há registro de estudos envolvendo o HPV. Em um deles o alvo foi descrito envolvido na capacidade metastática das células tumorais prostáticas e com expressão elevada em tumores com maior classificação no Score de Gleason, que avalia a agressividade tumoral neste tipo de câncer (DONG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019). Estas funções atribuídas ao *TRIP13* o tornam potencial alvo de novas terapias e investigações futuras.

4.2.5 RNA Longo Não-Codificante 01082

O RNA Longo Não-Codificante 01082 ou simplesmente *LINC01082* faz parte de uma classe de moléculas que atua na regulação da expressão gênica em diferentes níveis, no silenciamento epigenético no genoma e participa da regulação pós-transcricional da estabilidade dos RNAs mensageiros (GOODALL; WICKRAMASINGHE, 2021; PANNI *et al.*, 2020).

Os RNAs não codificantes já foram descritos em superexpressão em diversos tipos de câncer; no entanto o *LINC01082* é uma molécula encontrada em regulação negativa, isto é, menos expressa, no câncer de bexiga, cólon e colorretal (HUANG *et al.*, 2019b; LU *et al.*, 2021; OUSATI-ASHTIANI *et al.*, 2017). Recentemente, um importante estudo encontrou este RNA também menos expresso no câncer de cólon, e ainda descreveu que a expressão aumentada desta molécula atua na inibição da migração e invasão celular, sendo um forte candidato relacionado à atividade supressora tumoral e promissor alvo terapêutico (XIONG *et al.*, 2019). Na literatura, há poucos trabalhos acerca deste gene, dado a sua importância, tampouco existem estudos que avaliaram alguma associação com o HPV.

4.3 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO

4.3.1 Biologia do HPV

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus epiteliotrópico da família Papillomaviridae, de 55 nm de diâmetro, sem envelope, com um genoma de 8 mil pares de bases nitrogenadas (kbp) e DNA circular envolvido por um capsídeo composto por 72 capsômeros. Abaixo, é possível observar a estrutura morfológica viral: na imagem à esquerda, uma representação atômica do capsídeo; ao centro, um diagrama representando a organização dos 72 capsômeros do HPV; e à direita uma micrografia eletrônica de contraste negativo dos vírions, onde a barra branca representa uma escala de 100 nm (International committee on taxonomy of viruses - ICTV) (Figura 2).

Figura 2 - Morfologia do HPV.

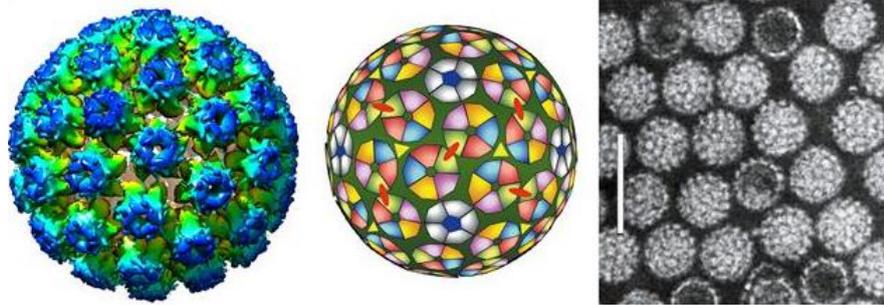


Imagem representativa da estrutura morfológica viral. À esquerda a renderização atômica do capsídeo do HPV derivado de uma reconstrução de imagem de microscopia crioelétrica do HPV tipo 16; ao centro a organização dos 72 capsômeros, a estrutura icosaédrica é composta por capsômeros pentaméricos para um total de 360 proteínas do capsídeo; à direita uma micrografia eletrônica de contraste negativo dos vírions do HPV1 onde a barra branca representa 100nm. **Fonte:** Adaptado de International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).

O genoma do HPV (Figura 3) divide-se em uma fase de leitura aberta (do inglês, *Open Reading Frame*, ORF), onde se localizam os genes codificadores de proteínas e a região reguladora não codificante (do inglês, *Upstream Regulatory Region*, ou URR). As ORFs são compostas pela região precoce ou inicial; na região precoce estão os genes E6, E7, E1, E2, E4 e E5, responsáveis pelas principais atividades do ciclo de replicação viral e por conduzir os mecanismos oncogênicos; a região tardia, representada pelos genes envolvidos na codificação das proteínas do capsídeo viral, os genes L1 e L2 (ARALDI *et al.*, 2017; BALASUBRAMANIAM *et al.*, 2019).

Figura 3 - Organização do genoma do HPV.

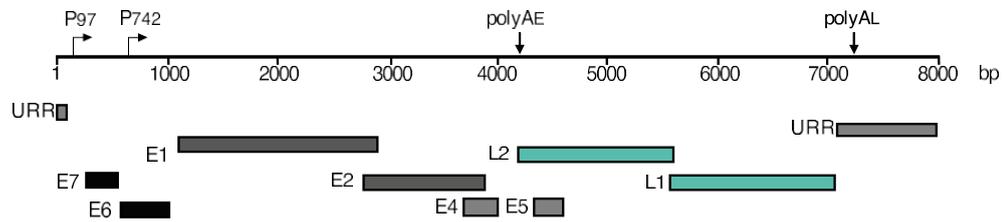


Imagem representativa da estrutura genômica do HPV, representando seus 8.000 pares de bases (bp) e a região de fase de leitura aberta (ORF) que divide o genoma em região precoce, com os genes E6, E7, E1, E2, E4 e E5 e a região tardia com os genes L1 e L2, a região URR representa a região reguladora não codificante. **Fonte:** Adaptado de Spriggs e Laimins (2017).

Os genes da região precoce sintetizam proteínas não estruturais e na região tardia as proteínas estruturais. Os genes E1 e E2 atuam na replicação do DNA viral e no controle de transcrição de outros genes; os genes E4 e E5 atuam na amplificação do DNA do HPV e na liberação do vírus na superfície epitelial; E6 e E7 atuam na proliferação viral e na alteração do ciclo celular. Os genes da região tardia (L1 e L2) desempenham função essencial na incorporação do DNA viral ao genoma da célula hospedeira e pela codificação das proteínas do capsídeo viral (COSPER *et al.*, 2021; EGAWA; DOORBAR, 2017).

4.3.2 Ciclo de infecção do HPV

O ciclo do HPV tem início quando o vírus tem acesso às células basais por meio de microabrasões presentes no epitélio. Em seguida, a proteína L1 do capsídeo interage com o receptor proteoglicano de sulfato de heparina, presente na superfície das células epiteliais basais, fazendo com que o vírus entre na célula via endocitose e ocorra o desmonte do capsídeo para a entrada do genoma viral no núcleo celular pelos poros nucleares (AKSOY; GOTTSCHALK; MENESES, 2017).

No núcleo, os genes reguladores de transcrição e replicação (E1 e E2) são ativados, aumentando o genoma viral entre 50-100 cópias por célula. Posteriormente, com o processo de maturação das células basais, os epissomassão distribuídos para as células filhas mediados pela proteína E2, e estas células migram para as camadas epiteliais superiores, progredindo o ciclo do HPV e ativando a expressão das oncoproteínas E6 e E7 (MAC; MOODY, 2020).

A proteína E6 tem essencial função na inativação da apoptose, que ocorreria naturalmente em virtude da infecção viral, e pelo estímulo à proliferação celular

provocado pela expressão de E7. Para o bloqueio da apoptose, o gene E6 promove a degradação das proteínas apoptóticas p53 e pRb; já a expressão de E7 ativa o *checkpoint* da fase G1 para S no ciclo celular dos queratinócitos, que normalmente sofreriam diferenciação terminal, provocando a expansão do compartimento das células epiteliais ativas na replicação do DNA, ou seja, exacerbando o processo replicativo e expandindo o número de cópias virais (HUSSAIN *et al.*, 2021).

Por fim, o ciclo de infecção viral do HPV entra na fase tardia, onde ocorre a replicação vegetativa do genoma e a formação do vírion, no qual atuam os genes E1, E2, E4, E5 e os genes tardios L1 e L2: os quatro primeiros genes terão a função de manter constante a replicação viral, e os genes L1 e L2 serão responsáveis pela síntese do capsídeo do HPV, onde o L1 codificará as principais proteínas do capsídeo e atuará na montagem dos vírions e o gene L2 com a função de transportar as proteínas L1 ao núcleo e encapsular o DNA viral (MAC; MOODY, 2020).

4.3.3 Classificação do HPV

Existem, atualmente cerca de 222 tipos de HPV identificados até o período de dezembro de 2020, que são classificados em cinco gêneros principais relacionados a diferentes doenças: são 65 alfapapilomavírus, 54 betapapilomavírus, 99 gamapapilomavírus, 3 mupapilomavírus e um único gênero nupapilomavírus.

A classificação entre estes gêneros se dá pelo tropismo do capsídeo viral com a superfície celular hospedeira, o gênero betapapilomavírus, gamapapilomavírus, mupapilomavírus e nupapilomavírus possuem tropismo cutâneo, portanto, clinicamente dão origem às verrugas nas mãos e pés, enquanto que o gênero alfa tem tropismo pelas mucosas, afetando diretamente a boca e a região urogenital. Além desta classificação, os HPV do gênero alfapapilomavírus são classificados quanto ao risco, podendo ser de baixo risco como os subtipos 6 e 11 e de alto risco como o subtipo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58, 59, 66 e 68, que estão relacionados ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, dentre eles: câncer cervical, vaginal, vulvar, anal, peniano e de cabeça e pescoço (COSPER *et al.*, 2021).

Em relação ao câncer de próstata, alguns estudos já identificaram a presença de HPV de alto risco na glândula (ARAUJO-NETO *et al.*, 2016; ATASHAFROOZ; ROKHBAKSH-ZAMIN, 2016; GLENN *et al.*, 2017; MEDEL-FLORES *et al.*, 2018); no entanto, as evidências em torno dos mecanismos genéticos da infecção e do desenvolvimento e progressão do câncer prostático ainda são escassos.

4.2 A PRÓSTATA E O CÂNCER

4.2.1 A próstata

A próstata é uma importante glândula do sistema reprodutor masculino, localizada na cavidade pélvica, em frente ao reto, abaixo da bexiga e em torno do primeiro segmento da uretra. Sua principal função é secretar componentes do líquido seminal que atuam na ejaculação e manutenção da sobrevivência dos espermatozoides (FRANCIS; SWAIN, 2018; SAUER *et al.*, 2020). Anatomicamente, a próstata é dividida em quatro zonas: zona periférica, zona central, zona de transição e o estroma fibromuscular (Figura 4).

Figura 4 - Anatomia da próstata

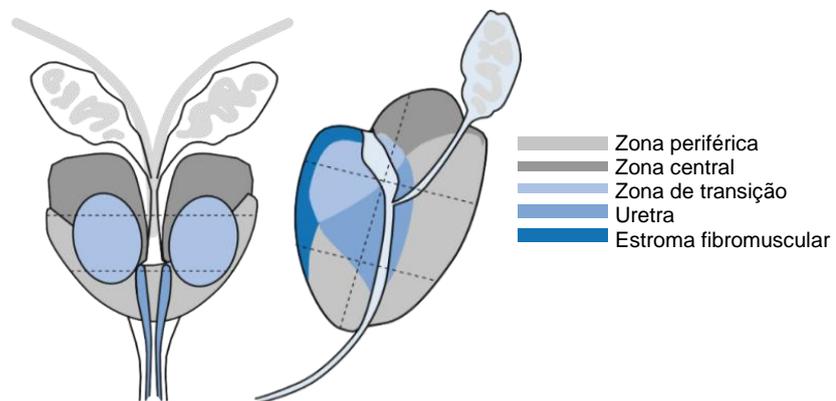


Imagem representativa da anatomia da próstata e suas respectivas divisões: zona periférica, zona central, zona de transição, uretra e estroma fibromuscular. **Fonte:** adaptado de Franiel e Röhke (2017).

Quanto a organização histológica, no lúmen prostático há a presença de uma única camada de células epiteliais lumbinais secretoras, que expressam as citoqueratinas 8 e 18 (CK8/18), o receptor de androgênio (AR) e o antígeno prostático específico (PSA); abaixo da camada epitelial, localizam-se as células basais, que expressam citoqueratinas 5 e 14 (CK5/14) e a proteína p63; por fim, no estroma estão as células endoteliais, neurônios e fibroblastos que secretam os componentes da matriz extracelular (REBELLO *et al.*, 2021).

O desenvolvimento da próstata é controlado pelos hormônios androgênicos, dos quais 95% correspondem à testosterona, que é produzida nas células de Leydig dos testículos por estímulo do hormônio luteinizante (LH) liberado pela hipófise, que por sua vez é regulado pelo hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) do hipotálamo. A testosterona entra nas células prostáticas por difusão simples e rapidamente é metabolizada pela enzima 5-alfa-redutase, que atua na conversão

irreversível da testosterona em um subproduto mais ativo, a dihidrotestosterona(DHT). A DHT se liga aos receptores androgênicos (AR) presentes no citoplasma das células da próstata e realiza a fosforilação, dimerização e translocação do complexo para o núcleo celular; este complexo, chamado DHT-AR aciona a expressão de genes envolvidos nas funções secretoras e de desenvolvimento glandular (GROSSE; BARTSCH; BANIAHMAD, 2012; TAN *et al.*, 2015).

4.2.2 Desenvolvimento e classificação do câncer de próstata

O processo de formação do tumor prostático (Figura 5) é iniciado nas células epiteliais do lúmen da glândula. A fase inicial caracteriza-se como a etapa neoplásica intraepitelial, onde as células lumiais passam a se proliferar; com o tempo as células passam a se multiplicar mais rapidamente até que a camada de células basais seja aos poucos destruídas (adenocarcinoma). Por conseguinte, as células basais são completamente desarranjadas (adenocarcinoma invasivo), fazendo com que os grupos de células tumorais passem a invadir estruturas próximas e se desprendam de seu local de origem e migrem para órgãos e tecidos adjacentes como os ossos, característica da metástase (RYBAK; BRISTOW; KAPOOR, 2015; VISVADER, 2011; WANG *et al.*, 2018).

Figura 5 - Mecanismo de progressão do câncer de próstata.

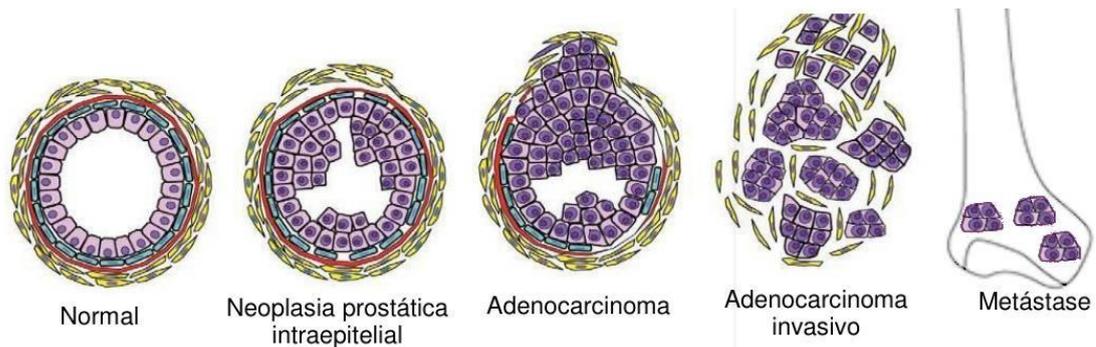


Imagem representativa do mecanismo de progressão do câncer de próstata, do epitélio normal, ao crescimento de células no lúmen, à invasão da camada basal pelas células epiteliais até a completa ruptura da camada basal e extravasamento de células tumorais para outros tecidos, como os ossos, representados na imagem. **Fonte:** adaptado de Vasioukhin (2004).

A classificação do câncer de próstata auxilia no diagnóstico e na tomada de decisão clínica para o tratamento da patologia, que pode ser realizado de duas formas: pelo sistema TNM e pelo Score de Gleason. O TNM classifica o câncer de próstata em três estágios, onde T1 refere-se ao tumor primário, N à invasão aos linfonodos e

M à metástase.

Já o Score de Gleason avalia a progressão do câncer de acordo com a disposição histológica das células tumorais. Nesta classificação, o câncer de próstata é dividido em 5 grupos: O grupo 1 (score ≤ 6) dificilmente será encontrado em biópsias com suspeita de câncer de próstata, pois corresponde a células individuais bem delimitadas e discretas, ou seja, com conformação normal, não neoplásica. O grupo 2 (score $3+4=7$) em sua maioria apresenta células bem formadas e poucas anormais com relação ao tamanho, já a partir do grupo 3 (score $4+3=7$) há a observação da formação inicial dos tumores, com o surgimento de células malformadas; o grupo 4 (score 8) é classificado por três scores, pela prevalência exclusiva de glândulas malformadas e o estroma é infiltrado por células normais. O último grupo de classificação, grupo 5 (score ≥ 9) corresponde a ausência de células glandulares ou com necrose tecidual, com ou sem malformação (CHEN; ZHOU, 2016; REBELLO *et al.*, 2021) (Figura 6).

Figura 6 - Score de Gleason

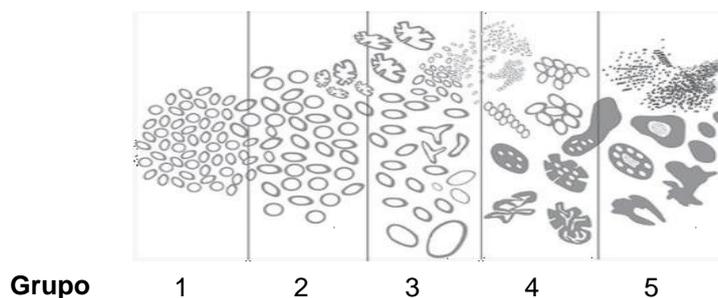


Imagem representativa da classificação de Gleason. Cada grupo engloba diferentes scores, o grupo 1 (score <6), grupo 2 ($3+4=7$), grupo 3 ($4+3=7$), grupo 4 (score 8) e grupo 5 (score ≥ 9). **Fonte:** adaptado de Rebello *et al.*, 2021.

4.2.3 Rastreamento e diagnóstico

O rastreamento do câncer de próstata é essencial para aumentar as chances de cura. No geral, este processo é feito pelo teste sanguíneo do antígeno prostático específico (PSA); no entanto, cada vez mais estudos têm demonstrado que somente o valor do PSA não é preciso na detecção precoce do câncer, pois a expressão desta proteína pode ser desregulada por muitos outros fatores, como por exemplo, no crescimento benigno da próstata (REBELLO *et al.*, 2021).

Desta forma, atualmente também são englobados os valores do PSA total e PSA livre, além de outros testes adicionais, como o antígeno 3 do câncer de próstata

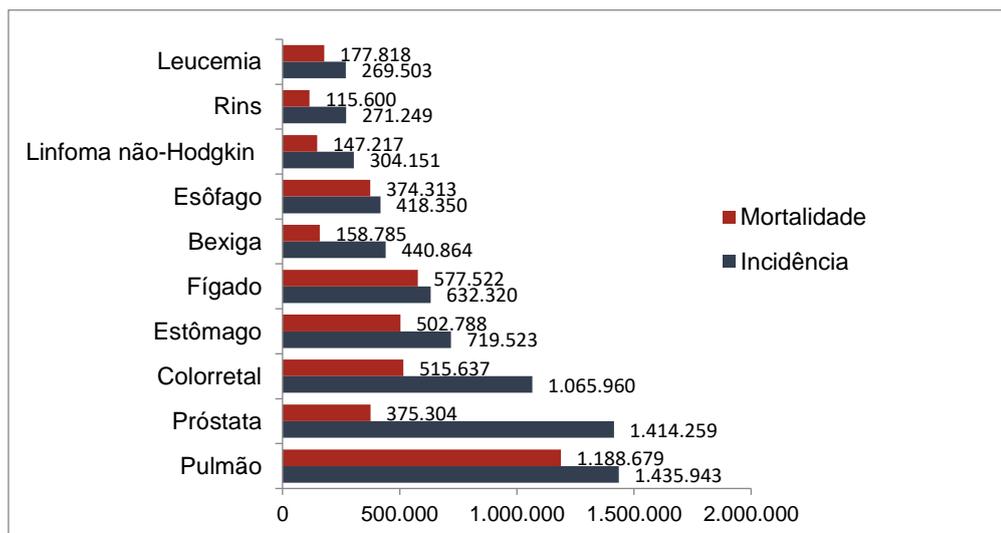
(PCA3) na urina. O diagnóstico do câncer de próstata envolve a combinação de outros métodos e tecnologias, como, por exemplo, a ultrassom transuretral, para a obtenção da visualização de imagens da conformação da próstata para coleta de biópsias, o ultrassom Doppler colorido que mensura o fluxo sanguíneo no interior da glândula e também indicam locais para coleta de tecido para análises histológicas (BARRY; SIMMONS, 2017).

Portanto, geralmente alterações nos exames de imagem e nos níveis de PSA exigem confirmação histológica através da biópsia em associação com o score de Gleason. O exame de biópsia consiste em um procedimento invasivo de retirada de um fragmento de próstata para análise histológica e/ou molecular para a confirmação de presença de alterações teciduais por células cancerígenas.

4.2.4 Epidemiologia do câncer de próstata

Anualmente milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer. Em 2020, foram registrados mundialmente cerca de 19,3 milhões de casos de câncer e 9,9 milhões de óbitos em decorrência da doença. Deste total, o câncer de próstata foi responsável por 1,4 milhão de casos e 375.304 mortes, configurando-se como segundo tipo de câncer com maior incidência em homens (*Global Cancer Observatory, 2020*) (Figura 7).

Figura 7 - Incidência e mortalidade mundial de câncer em homens no ano de 2020

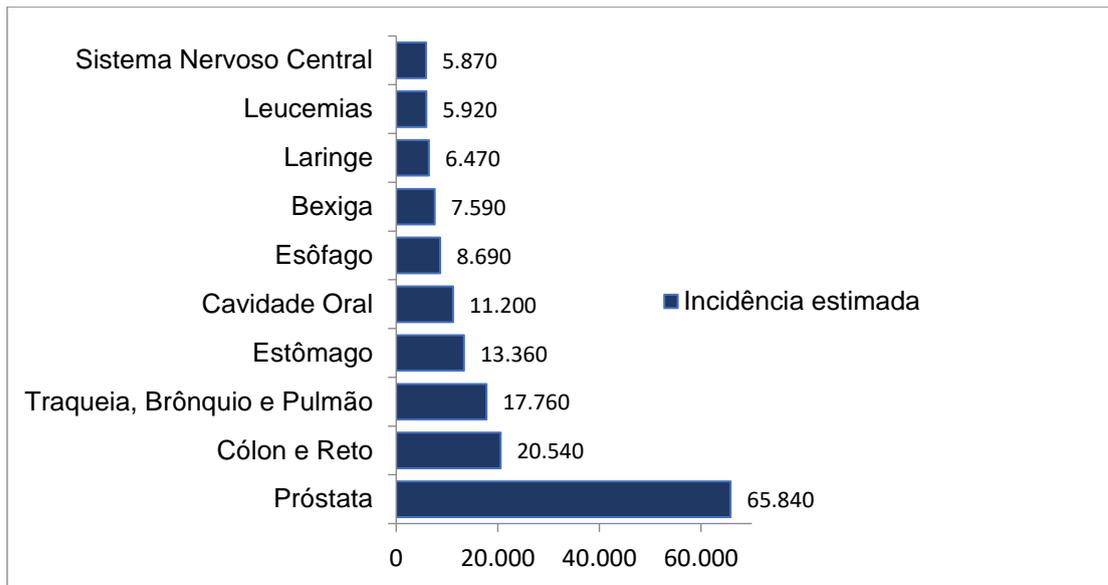


Fonte: GLOBOCAN (2022)

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2020), confirmou 626 mil casos de câncer, sendo destes, 65.840 casos de câncer prostático, considerado o tipo

de câncer com maior prevalência em homens brasileiros, seguido do colorretal e dos cânceres do trato respiratório (Figura 8). Quanto à mortalidade, o câncer de próstata foi causa da morte de 13,1% do total de óbitos por câncer em 2019, com 15.983 mortes.

Figura 8 - Incidência estimada de casos de câncer de acordo com a localização



Fonte: INCA (2020)

No Amapá o câncer de próstata foi o tipo de câncer com maior taxa de incidência. Ao todo o Estado teve 450 casos de câncer diagnosticados em homens no ano de 2020, destes, 100 foram na próstata, 60 no estômago, 30 nas vias respiratórias, 20 na cavidade oral, 20 casos de leucemia e 90 casos restantes classificados em “outras localizações” (INCA, 2020).

Estudos prospectivos estimam que até 2040 surjam cerca de 30,2 milhões de câncer no mundo, de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da Organização Mundial da Saúde (2020).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

Para a execução do projeto, foi obtida autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), sob o número de Apreciação Ética CAEE nº 68584117.5.0000.0003. Os pacientes com suspeita clínica de câncer de próstata foram atendidos no Instituto de Oncologia e Mastologia de Macapá-AP e foram convidados a integrar a pesquisa mediante a formalização da participação com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (Anexo 1). Foram incluídas no estudo um total de 42 amostras, nas quais foram realizados os testes moleculares por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real de transcritos de RNA (RT-qPCR) para a detecção da infecção por HPV e avaliação do perfil de expressão gênica.

5.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta das biópsias prostáticas foi realizada por profissionais capacitados para a execução do procedimento. Utilizou-se a ultrassonografia transretal, que antecede a coleta para que o médico tenha conhecimento do possível local compatível com neoplasias malignas; em seguida o procedimento de coleta foi realizado com sedação anestésica venosa ou por bloqueio do plexo neural periprostático e a obtenção das biópsias foram feitas com agulhas descartáveis de 18 Ga de calibre por 20 cm de comprimento. Foram coletados no mínimo 12 fragmentos da próstata, sendo um deles destinado às análises moleculares do estudo; estes fragmentos foram imediatamente armazenados em tubos identificados contendo RNALater (Ambion®) e armazenados a -20° C.

5.3 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

O grupo amostral foi composto por 42 indivíduos, sendo 12 do grupo sem câncer de próstata e 30 do grupo com câncer de próstata. O grupo sem câncer apresentou mediana de 64 anos (IC 95%: 57-72) e para o PSA 11,35 ng/mL (IC 95%: 7,68-27,95); o grupo amostral com câncer apresentou mediana de 71 anos (IC 95%: 64-79,5) e 61,28 ng/mL (IC 95%: 15,98-113,5) de PSA total. Do grupo com câncer em cinco havia infecção pelo HPV e para o grupo sem câncer duas amostras.

5.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração de RNA total foi realizada com Trizol (Invitrogen®), seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente o fragmento de tecido prostático foi adicionado em um microtubo de centrifugação de 1,5 mL tipo eppendorf contendo 1mL de Trizol e submetido ao disruptor mecânico de células *TyssueLyser* (QIAGEN®) com auxílio de uma microesfera de inox (*beads*) de 7 mm de diâmetro por aproximadamente 15 min.

Em seguida, o conteúdo foi transferido para um novo tubo, sem a microesfera, para a etapa de separação de fases. Foi adicionado 200µL de clorofórmio e feita agitação manual vigorosa do tubo por 15 s seguido de incubação por 3 min em temperatura ambiente. Os tubos foram submetidos a uma centrifugação de 12.000 x g por 15 min a 4°C, permitindo a visualização da separação da fase aquosa (contendo RNA), interfase (DNA) e fase orgânica (proteínas, lipídeos e fenol-clorofórmio). Cerca de 400µL da fase aquosa foi recuperada em um novo tubo e foi adicionado 500µL de isopropanol a 100% para a precipitação do RNA. O tubo contendo a interfase foi separado para a posterior extração do DNA para detecção do HPV.

Os tubos contendo a fase aquosa e o isopropanol foram brevemente vortexados e mantidos em incubação por 10 min em temperatura ambiente. A partir de então, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 min a 4°C e posteriormente o sobrenadante foi descartado, restando no tubo apenas o *pellet* de RNA. Para a lavagem do *pellet* foi adicionado etanol 75% e seguiu-se uma centrifugação de 7.500 x g por 5 min a 4°C; por conseguinte, a etapa de lavagem foi repetida. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi mantido aberto em bancada por 5 minutos para secagem do *pellet*. Ao fim, o *pellet* de RNA foi ressuscitado em 30µL de água para injeção e armazenados à -20°C.

5.5 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Ao tubo contendo a interfase de DNA e a fase orgânica foi adicionado 300µL de álcool 100% para a precipitação do DNA e feita inversão manual do tubo para homogeneização da solução, seguido de incubação por 3 min em temperatura ambiente. O tubo foi submetido a uma centrifugação de 2.000 x g a 4°C por 5 min para a formação do *pellet* de DNA e posterior retirada do sobrenadante contendo fenol e álcool.

Em seguida, o *pellet* foi lavado com 1 mL de citrato de sódio 1 M em 10% de etanol (pH 8,5) e incubado por 30 min em temperatura ambiente, durante este período,

o tubo foi constantemente invertido para melhor homogeneização. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 2.000 x g a 4°C por 5 min e a solução de lavagem foi retirada do tubo deixando somente o *pellet* de DNA; esta etapa de lavagem foi realizada duas vezes, seguida novamente pela mesma centrifugação.

Ao *pellet* de DNA foram adicionados 1,5 mL de etanol 75%, realizado uma breve vortexagem e incubado por 20 min em temperatura ambiente. Por conseguinte, o tubo foi novamente centrifugado por 5 min a 2.000 x g a 4°C e o etanol foi descartado, deixando o *pellet* secando em bancada por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 30µL de NaOH (8mM), centrifugado a 12.000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante contendo o DNA extraído recuperado para um novo tubo.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DO RNA E DNA EXTRAÍDO

Para avaliar a concentração e a pureza do RNA extraído as amostras foram quantificadas por espectrofotometria através do equipamento *NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific™)*. A razão A260nm/A280nm foi avaliada pelo equipamento, onde a absorbância de ácidos nucleicos é captada em 260nm e de possível contaminação por proteína em 280nm. Assim, as amostras com razão entre 1,8 e 2,0 e com concentração mínima de 50ng/µL para RNA e 10ng/µL para DNA foram consideradas viáveis para as análises moleculares.

5.7 DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Para a detecção do HPV, foi utilizado o equipamento *Real Time PCR System 7500 (Applied Biosystem®)*. O teste foi montado em duplicata para cada amostra utilizando o primer F: 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3' e R: 5'-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAA-3 que amplifica uma região conservada do gene L1 para os tipos de HPV 16, 18, 56, 59 e 66 (QMICHOU *et al.*, 2013). O reagente utilizado para a geração de fluorescência foi o *Power SYBR Green 2x (Applied Biosystems®)*. O protocolo completo da RT-qPCR está descrito na tabela a seguir:

Tabela 1 - Protocolo para reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para detecção do HPV

Reagente	Concentração	Volume/1 reação
Sybr GREEN 2X	-	6,25 µL
Primer forward	10 nM	0,38 µL
Primer reverse	10 nM	0,38 µL
H ₂ O	-	2,99 µL
DNA	-	2,5 µL
Volume final		12,5 µL

Tabela representando os reagentes e suas respectivas concentrações e volumes utilizados para uma reação (uma amostra) no protocolo de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para detecção do HPV. **Fonte:** dados do autor.

A reação seguiu as seguintes condições de ciclagem: 50°C por 5 min, para ativação da enzima; desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 45 ciclos de amplificação, com desnaturação a 95°C por 15 s, associação do primer e extensão a 60°C por 60 s. O resultado para a confirmação de infecção pelo HPV foi feita pela visualização da curva de *Melting* dos controles positivos de reação que constou de linhagens celulares SiHa e HeLa infectadas pelo HPV, que foram adicionadas em todas as reações como controle de qualidade de execução do método.

5.8 SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR (TRANSCRIÇÃO REVERSA – RT)

A síntese do DNA complementar de transcrição reversa de RNA mensageiro (cDNA) foi realizada com o kit comercial *High Capacity RNA-to-cDNA kit* (Applied biosystems®). Para cada amostra foi utilizado 100ng de RNA com 2µL dos primers randômicos (10X), 4µL de buffer (25mM), 2µL de dNTP (0,1M), 1µL da enzima *Transcriptase reversa* e adição de água para injeção até o volume final de 20µL.

Para avaliar a eficiência da reação e de possível contaminação com DNA genômico, foi adotado um controle negativo de transcrição reversa (RT-) que continha todos os componentes da reação, com exceção da enzima. Então os microtubos foram colocados em termociclador modelo *LifeECO da BIOER® Technology* e foram processadas nas seguintes condições: 25°C a 10 minutos, 37°C a 120 minutos, 85°C a 5 minutos. Ao fim da reação, foram adicionados 180µL de água de injeção aos 20µL cDNA.

5.9 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS PRIMERS

Os primers foram testados para avaliação de eficiência e especificidade

através da quantificação relativa de cDNA por curva padrão. Para isso, foram feitas diluições seriadas de cDNA para cada alvo, com cinco pontos de diluição em um fator de 1:3 (1X, 0,33X, 0,11X, 0,03X e 0,01X). A partir do ciclo limiar de detecção ou ciclo de *Threshold* (Ct) foi calculado o coeficiente de correlação (R^2), definido pela forma como os pontos se ajustam à curva padrão pela linearidade e pelo valor de eficiência, correspondendo a quantidade de produto gerado aumentado exponencialmente a cada ciclo. Os valores foram obtidos pelo *software 7500* (ThermoFisher®) e consideradas aceitáveis os experimentos de curva padrão com valor de $R^2 \geq 0,99$ e o de eficiência em um intervalo de 90% a 110%.

5.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL DE DNA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-qPCR)

Para a quantificação relativa cDNA, foi utilizado o equipamento *Real Time PCR System 7500* da Applied Biosystem®. O teste foi montado em triplicata para cada alvo e uma amostra correspondendo ao RT-; para cada amostra foram testados todos os alvos de estudo mais o controle endógeno (*GAPDH*) em uma mesma placa. O reagente utilizado para a geração de fluorescência foi o *Power SYBR Green 2x* (Applied Biosystems®) e a amplificação ocorreu por 45 ciclos. O protocolo completo da RT-qPCR está descrito na tabela abaixo:

Tabela 2 - Protocolo de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para análise de expressão gênica

Reagente	Concentração	Volume/1 reação
Sybr GREEN 2X	-	6,25 μ L
Primer forward	10 nM	0,38 μ L
Primer reverse	10 nM	0,38 μ L
H ₂ O	-	2,99 μ L
cDNA	-	2,5 μ L
Volume final		12,5 μL

Tabela representando os reagentes e suas respectivas concentrações e volumes utilizados em uma reação (uma amostra) no protocolo de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para análise de expressão gênica. **Fonte:** dados do autor.

Todos os primers selecionados para este estudo foram testados a partir da curva padrão e estão descritos na tabela abaixo (Tabela 3), de acordo com suas sequências e referência da literatura. Somente o primer para o alvo *CREB3L4* foi desenhado, para isso utilizamos o *PrimerBlast* da NCBI (*National Center for*

Biotechnology Information) para construir uma sequência para este gene que fosse compatível com as condições estabelecidas para estudos utilizando a RT-qPCR.

Tabela 3 - Descrição dos primers

Gene alvo	Sequência dos Primers	Referência
<i>GAPDH</i>	F: 5'– CGAGATCCCTCCAAAATCAA –3' R: 5'– TCTTGAGGCTGTTGTCATAC–3'	(TSUTSUI <i>et al.</i> , 2015)
<i>CREB3L4</i>	F: 5'– CTGTCTCCGACCAGTTACGG –3' R: 5'– CTTAGGTTTCGGAGGGGCAG–3'	Desenhado
<i>TRIP13</i>	F: 5'– ACTGTTGCACTTCACATTTTCCA –3' R: 5'– TCGAGGAGATGGGATTTGACT –3'	(ZHANG, G. <i>et al.</i> , 2019)
<i>HOXC6</i>	F: 5'– TGACCGTTTCTGTGTGAAGA –3' R: 5'– AGGAACACTGACGGTGCTAA –3'	(JUNG <i>et al.</i> , 2020)
<i>MCPI3</i>	F: 5'– AACCAATCCACTGCCAATTT –3' R: 5'– TTGATGGCAGCAATGTGG –3'	(SUK <i>et al.</i> , 2018)
<i>LINC08102</i>	F: 5' - GAGATAGGACCAACCGTCAGGA–3' R: 5'– TGTGCTTCTCACTTGCAGGGT–3'	(XIONG <i>et al.</i> , 2019)

Tabela representando os primers utilizados na amplificação dos alvos do estudo, confeccionados pela empresa *Thermo Fisher Scientific*. F: primer forward; R: primer reverse. **Fonte:** dados do autor.

A reação seguiu as seguintes condições de ciclagem: 50°C por 5 min, para ativação da enzima; desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 45 ciclos de amplificação, com desnaturação a 95°C por 15 s, associação do primer e extensão a 60°C por 60 s. Foram avaliadas as curvas de dissociação (*Melting*) do DNA amplificado através da rampa de temperatura com detecção simultânea de fluorescência, a fim de avaliar a especificidade dos primers.

5.11 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE mRNA

A quantificação relativa do RNA mensageiro foi obtida pelo método Ct comparativo. Inicialmente foi calculado o valor de Ct a partir da média das triplicatas para cada alvo, em seguida foi calculado o valor de ΔCt , obtido a partir da diferença entre o Ct do gene alvo menos o Ct do gene normalizador (*GAPDH*). Posteriormente calculou-se valor de $\Delta\Delta Ct$, através da diferença entre a média do ΔCt do grupo assumido como controle (sem câncer, sem HPV) com a média do ΔCt do grupo a ser analisado (com câncer, com HPV) com o valor de $\Delta\Delta Ct$ foi aplicada a fórmula para obtenção do valor da expressão relativa dada pela fórmula:

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

5.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas utilizadas para este trabalho foram executadas pelo software *Prism* e pelo programa *Excel*. A análise de expressão gênica foi avaliada por testes de comparação de médias, foi utilizado o Teste T de Student e análise de variância (ANOVA) seguida de teste de comparação de médias de Tukey.

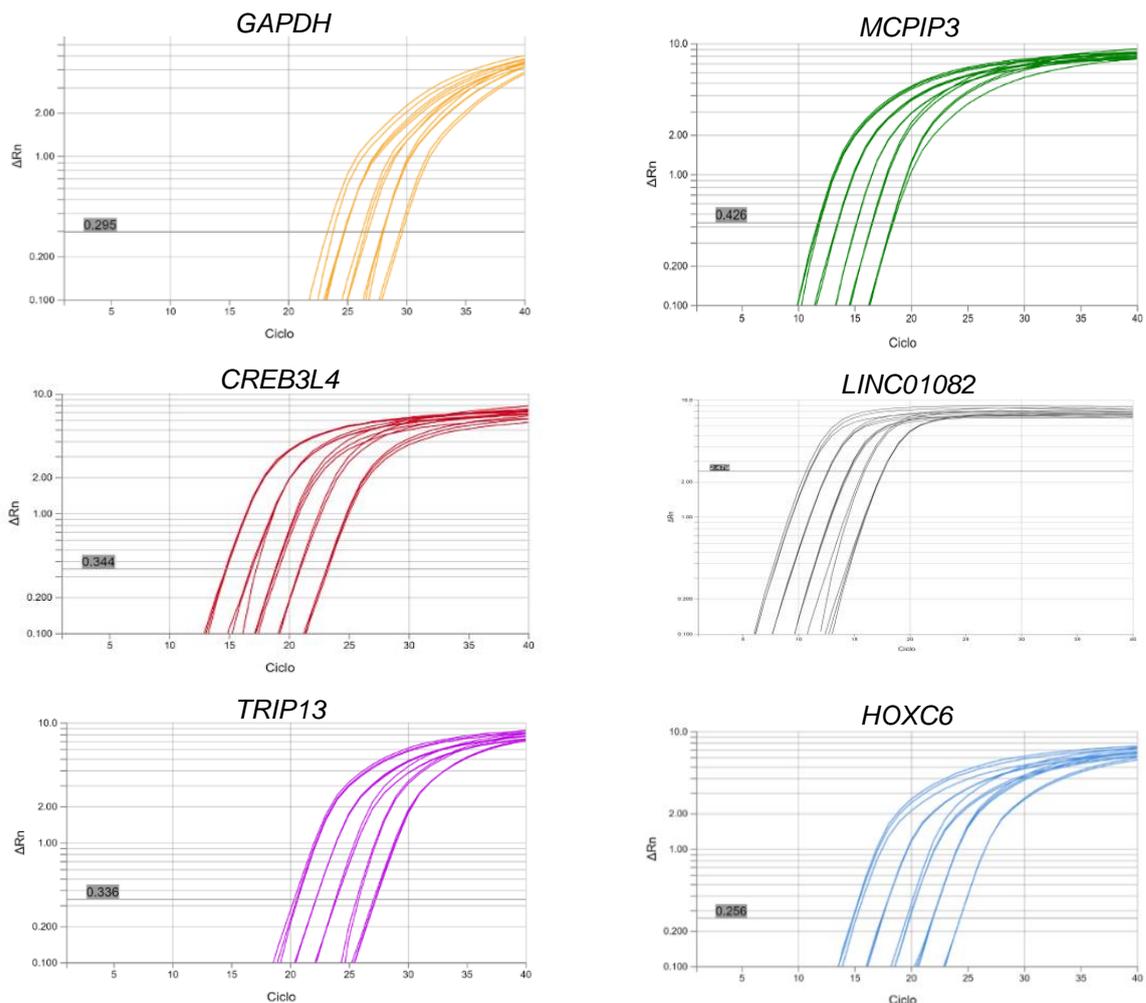
6 RESULTADOS

6.1 VALIDAÇÃO DOS PRIMERS

6.1.1 Plot de amplificação

Para a validação dos primers foi realizado o experimento de curva padrão, no qual se avaliou a eficiência e especificidade dos alvos de acordo com as recomendações da *Life Technologies*®. A partir do plot de amplificação (Figura 9) é possível observar visualmente a captação de fluorescência a cada ciclo amplificado, o eixo x refere-se ao valor do ciclo de threshold e no eixo y encontra-se a variação de cDNA amplificado, a linha cinza que perpassa horizontalmente as diluições corresponde ao local onde os valores da curva padrão foram captados, isto é, o Ct.

Figura 9 - Plot de amplificação

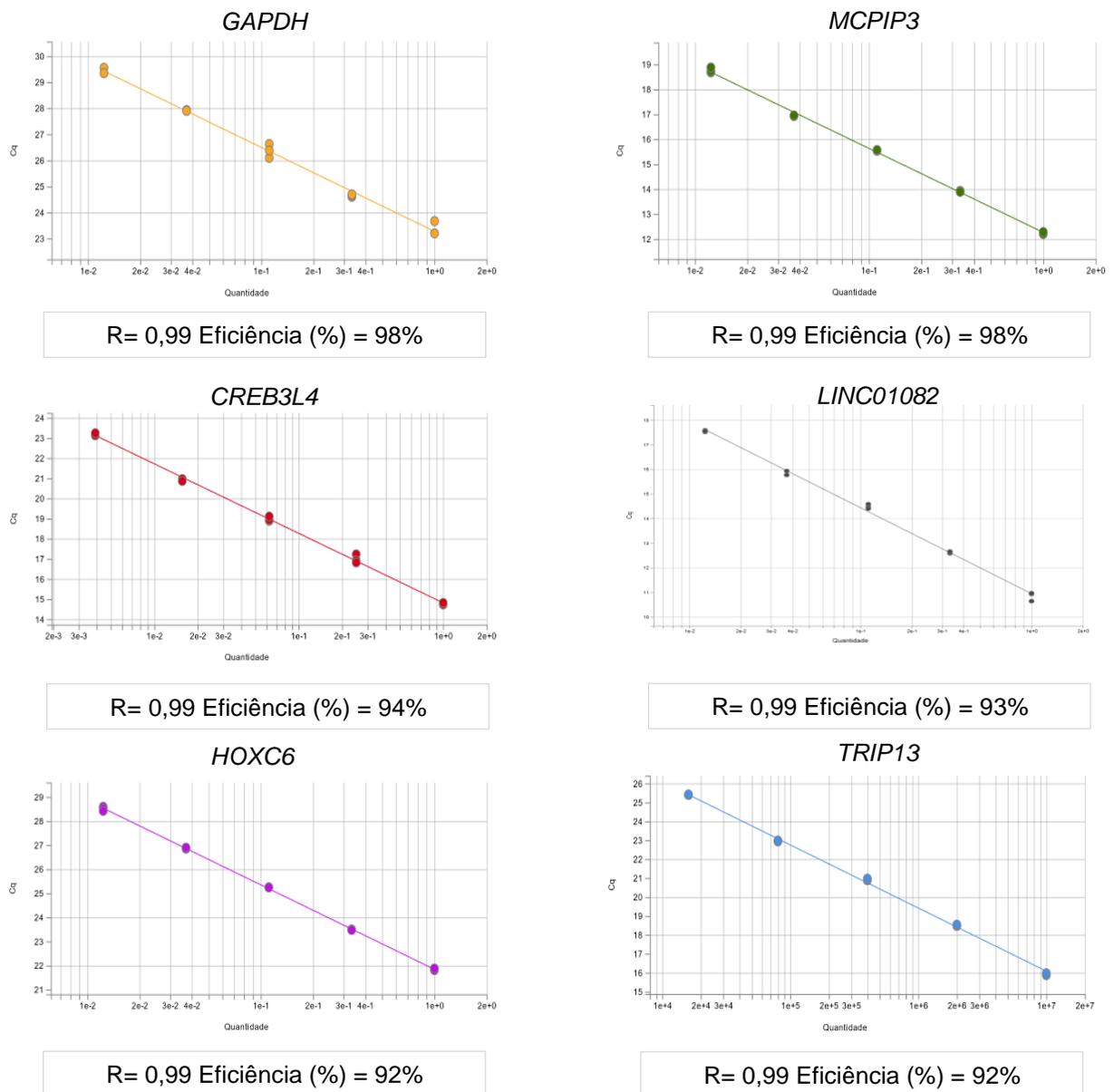


O eixo x representa o valor de Ct de cada diluição, o eixo y indica a variação de cDNA amplificado, a linha horizontal na cor cinza representa o limiar de *Threshold*. **Fonte:** dados do autor.

6.1.2 Gráfico de curva padrão

O gráfico de curva padrão (Figura 10) é representado através de uma regressão linear, demonstrando o valor de cDNA amplificado em x em função do ciclo em y. Deste gráfico resultam os valores de R^2 , ou coeficiente de correlação, que avalia a medida que os pontos se ajustam à curva padrão e o valor de eficiência, que considera a quantidade de produto gerado aumentado exponencialmente a cada ciclo. Para curvas padrão aceitáveis são considerados o valor de $R^2 \geq 0,99$ e de eficiência em um intervalo de 90 a 110%.

Figura 10 - Curva padrão de diluição



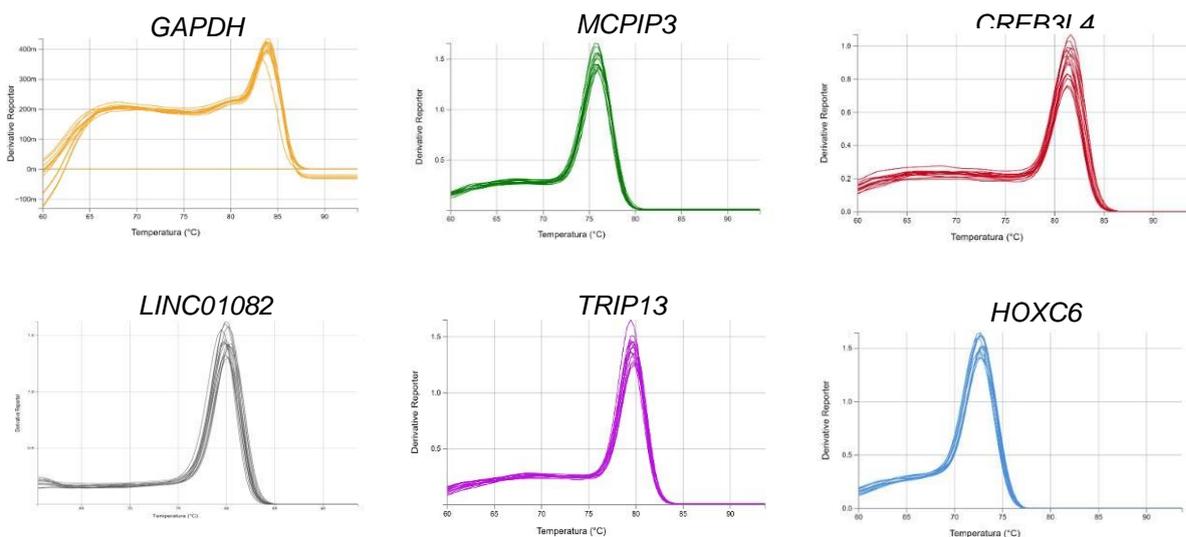
O eixo x representa a quantidade de cDNA amplificado exponencialmente, o eixo y indica a variação do valor de Ct, cada ponto da reta representa uma diluição do cDNA. **Fonte:** dados do autor.

6.1.3 Curva de dissociação

Por fim, o último gráfico analisado para a padronização dos primers a serem utilizados em experimentos de expressão gênica é a curva de dissociação ou também chamada de curva de *Melting*. A função desta análise é avaliar a especificidade do alvo amplificado, em resumo a curva de dissociação faz alusão ao gel de agarose na visualização de resultados de uma PCR convencional, na agarose observa-se o tamanho do fragmento, já na RT-PCR a quantidade de calor necessária para dissociar metade do alvo amplificado, que varia de acordo com a quantidade de Guanina e Citosina, que por possuírem três ligações de hidrogênio entre elas demandam maior temperatura para dissociá-la.

Na PCR em tempo real, após a ciclagem a reação entra no estágio da curva de dissociação, neste momento a temperatura do *template* sofre variação de 60° a 92° graus, fazendo com que as ligações de hidrogênio do cDNA sejam rompidas com o aumento da temperatura e associem-se em temperaturas mais baixas. Assim, o *software* capta a temperatura na qual o produto amplificado encontra-se metade associada e metade desnaturada, permitindo avaliar através da sequência de nucleotídeos a temperatura exata que esta conformação seja alcançada. Abaixo se encontra as figuras com os respectivos picos de dissociação (Figura 11).

Figura 11 - Curva de dissociação

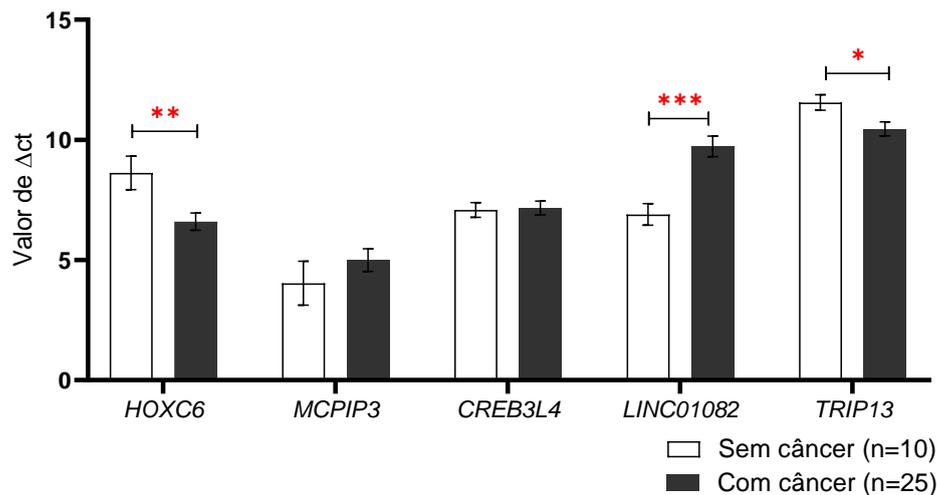


O eixo x representa a temperatura no qual metade do alvo amplificado estava desnaturado e metade associado, o eixo y o *derivative reporter*. **Fonte:** dados do autor.

6.2 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS ALVOS

Para as análises de expressão gênica utilizaram-se as 42 amostras do estudo, que foram desagrupadas de acordo com o objetivo de avaliação (presença e ausência do câncer e presença e ausência do HPV). A representação dos resultados e a análise estatística foram realizadas a partir do valor da média do ΔCt de cada grupo, determinada pelo Ct do gene de interesse menos o Ct do gene de controle endógeno (GAPDH). A primeira análise realizada buscou avaliar o comportamento dos genes *HOXC6*, *MCPIP3*, *CREB3L4*, *TRIP13* e do RNA não codificante *01082* entre tecidos prostáticos com câncer (n=25) e sem câncer (n=10) excluindo as amostras positivas para o HPV (Figura 12).

Figura 12 - Perfil de expressão dos alvos em amostras cancerígenas e não cancerígenas de próstata



O eixo y representa o valor de ΔCt , o eixo x indica os grupos amostrais sem câncer (n=10, barra na cor branca) e com câncer (n=25, barra na cor cinza) para os cinco alvos do estudo com a barra de erro padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ são os valores de significância estatística obtida pelo teste T de Student. **Fonte:** dados do autor.

Dos alvos analisados, os genes *HOXC6* e *TRIP13* e o RNA longo não codificante *01082* apresentaram diferenças no perfil de expressão. O gene *HOXC6* foi expresso 4,07 vezes mais na presença do câncer comparado ao grupo amostral sem câncer; o mesmo ocorreu com o gene *TRIP13* que teve sua expressão aumentada 2,14 vezes na presença do câncer (Tabela 4). Em relação ao RNA não codificante *LINC01082*, a expressão desta molécula foi reduzida para 15% nas amostras com câncer quando comparado às amostras sem câncer. Observa-se para o *MCPIP3* o valor de erro padrão elevado entre os grupos, o que pode ter sido determinante para

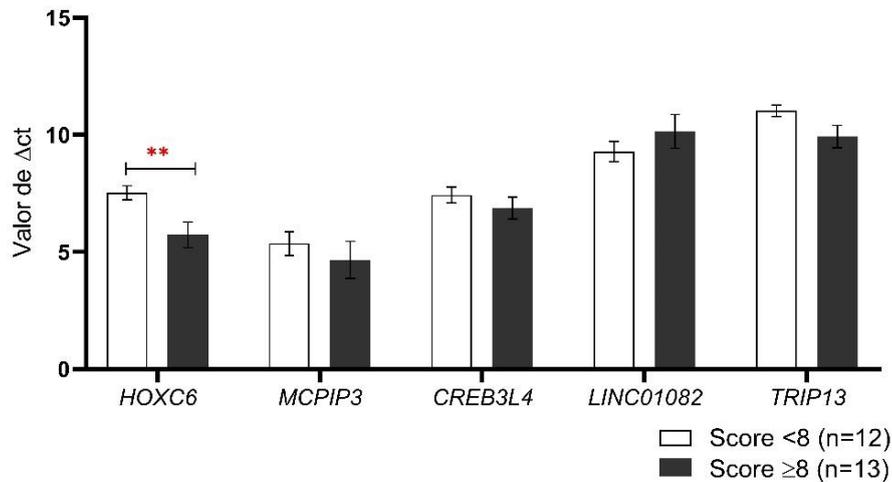
a inconsistência da diferença na média encontrada. O gene *CREB3L4* apresentou médias muito semelhantes entre os grupos comparados, como é possível observar na Tabela 4.

Tabela 4 - Valor (média \pm erro padrão) de Δ Ct (diferença entre ciclos de limiar de detecção entre o gene alvo e o controle endógeno GAPDH) de amostras de biópsia de próstata com e sem câncer, obtidos a partir de qPCR de DNA complementar produzido com o RNA extraído das amostras, para cinco alvos diferentes, e valor de Expressão Relativa (ER), que representa quantas vezes o gene é expresso nas amostras com câncer comparado às amostras sem câncer em conjunto com a significância estatística representada pelo símbolo asterisco.

Gene	Sem Câncer (n=10)	Com Câncer (n=25)	ER
<i>HOXC6</i>	8,62 \pm 0,69	6,59 \pm 0,36	4,07**
<i>MCPIP3</i>	4,03 \pm 0,91	4,99 \pm 0,46	0,94(NS)
<i>CREB3L4</i>	7,08 \pm 0,30	7,16 \pm 0,28	0,86(NS)
<i>LINC01082</i>	6,89 \pm 0,44	9,73 \pm 0,42	0,14***
<i>TRIP13</i>	11,56 \pm 0,32	10,46 \pm 0,29	2,14*

HOXC6 = Homeobox C6; *MCPIP3* = Proteína dedo de zinco do tipo-CCCH; *CREB3L4* = Proteína 3 de ligação ao elemento responsivo AMP cíclico 4); *LINC01082* = RNA longo não codificante 01082; *TRIP13*= Interator do receptor de hormônio da tireóide 13. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; NS = não significativo. **Fonte:** dados do autor.

A segunda análise realizada buscou comparar o perfil de expressão gênica relacionado à agressividade no câncer de próstata. Para isso foi utilizado o Score de Gleason, que classifica o câncer histologicamente através da conformação, disposição, diferenciação e presença de necrose no tecido prostático cancerígeno. As 25 amostras de câncer de próstata (excluindo as positivas para o HPV) foram divididas entre o grupo com score <8 (n=12) que agrupava os scores 3+3, 3+4 e 4+3; e o grupo \geq 8 (n=13) com os scores 4+4, 4+5, 5+4 e 5+5. Nesta avaliação, apenas o gene *HOXC6* apresentou expressão diferencial em relação ao fator agressividade entre os distintos grupos (Figura 13 e Tabela 5).

Figura 13 - Perfil de expressão gênica dos alvos de acordo com o Score de Gleason

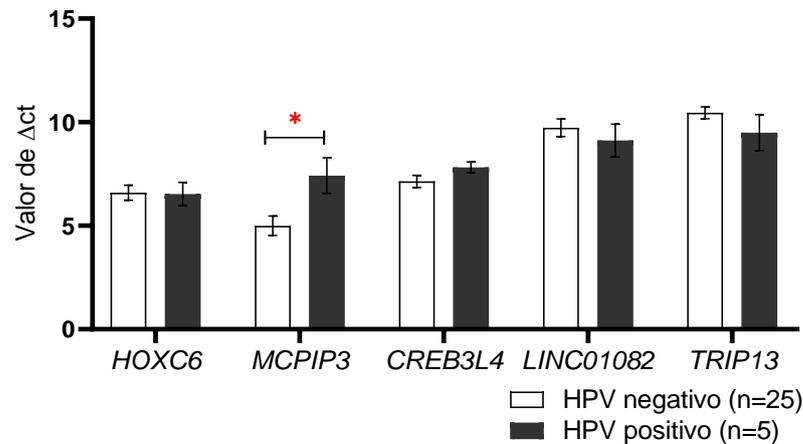
O eixo y representa o valor de ΔC_t , o eixo x indica os grupos amostrais com score <8 (n=12, barra na cor branca) e com score ≥ 8 (n=13, barra na cor cinza) para os cinco alvos do estudo com a barra de erro padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ são os valores de significância estatística obtida pelo teste T de Student. **Fonte:** dados do autor

Tabela 5 - Valor (média \pm erro padrão) de ΔC_t (diferença entre ciclos de limiar de detecção entre o gene alvo e o controle endógeno GAPDH) de amostras de biópsia de câncer de próstata entre o grupo com score <8 e ≥ 8 obtidos a partir de qPCR de DNA complementar produzido com o RNA extraído das amostras, para cinco alvos diferentes, e valor de Expressão Relativa (ER), que representa quantas vezes o gene é expresso nas amostras com score <8 comparado às amostras com score ≥ 8 .

Gene	Score <8 (n=12)	Score ≥ 8 (n=13)	ER
<i>HOXC6</i>	7,53 \pm 0,30	5,73 \pm 0,54	3,48**
<i>MCPIP3</i>	5,35 \pm 0,51	4,66 \pm 0,78	1,61(NS)
<i>CREB3L4</i>	7,43 \pm 0,34	6,87 \pm 0,46	1,47(NS)
<i>LINC01082</i>	9,28 \pm 0,42	10,15 \pm 0,71	0,54(NS)
<i>TRIP13</i>	11,03 \pm 0,24	9,93 \pm 0,47	2,14(NS)

HOXC6 = Homeobox C6; *MCPIP3* = Proteína dedo de zinco do tipo-CCCH; *CREB3L4* = Proteína 3 de ligação ao elemento responsivo AMP cíclico 4); *LINC01082* = RNA longo não codificante 01082; *TRIP13* = Interator do receptor de hormônio da tireóide 13. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS = não significativo. **Fonte:** dados do autor

A partir de então as análises passaram a avaliar efetivamente a presença e ausência do HPV na expressão gênica dos alvos do estudo. Preliminarmente foi comparada a expressão dos genes entre os grupos com câncer na ausência do HPV (n=25) e na presença da infecção viral (n=5), nesta análise o alvo *MCPIP3* foi expresso diferencialmente quando avaliada a infecção viral (Figura 14).

Figura 14 - Perfil de expressão gênica dos alvos de acordo com a presença do HPV

O eixo y representa o valor de ΔCt , o eixo x indica os grupos amostrais HPV negativo (barra na cor branca) e HPV positivo (barra na cor cinza) para os cinco alvos do estudo com a barra de erro padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ são os valores de significância estatística obtida pelo teste T de Student. **Fonte:** dados do autor

Como é possível observar nos gráficos, apenas para o gene *MCPIP3* houve expressão diferencial, sendo este gene menos expresso no grupo positivo para o HPV. A tabela abaixo auxilia na compreensão da ausência de significância estatística para os outros genes (Tabela 6).

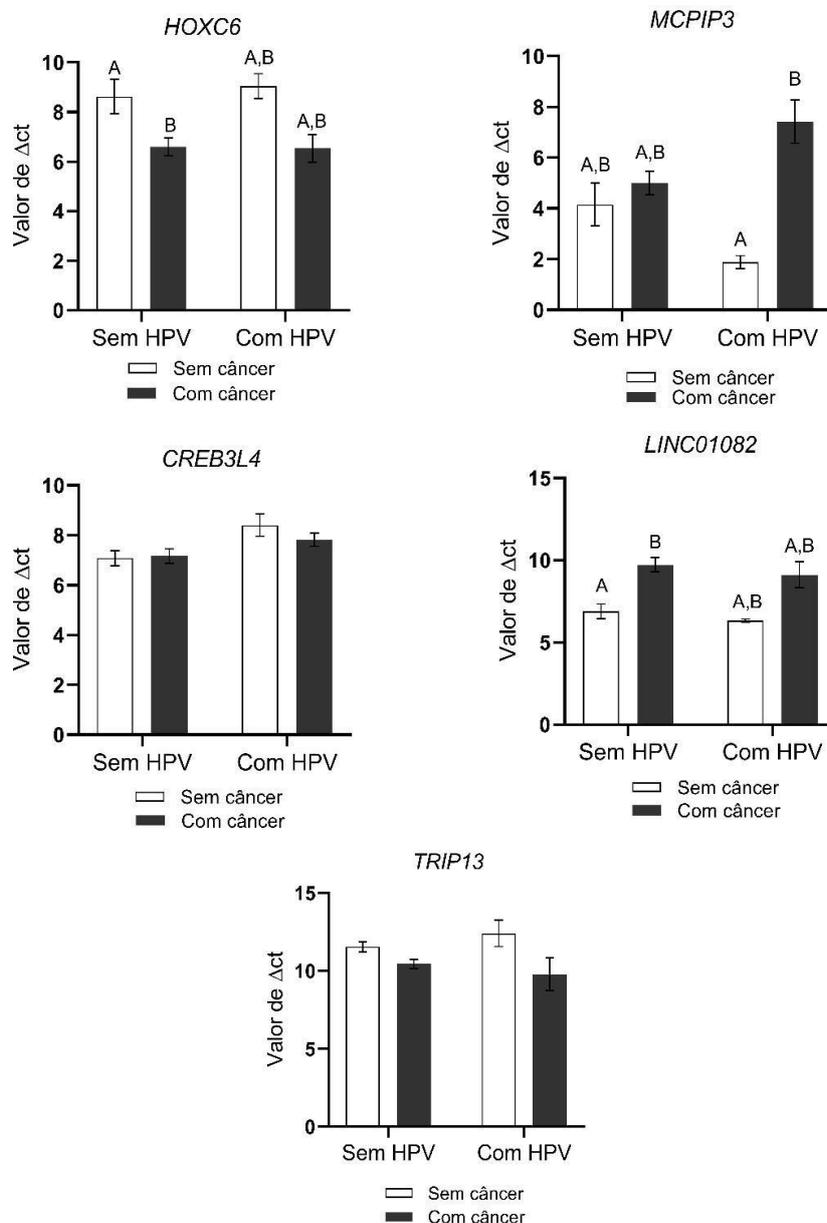
Tabela 6 - Valor (média \pm erro padrão) de ΔCt (diferença entre ciclos de limiar de detecção entre o gene alvo e o controle endógeno GAPDH) de amostras de biópsia de câncer de próstata entre o grupo amostral cancerígeno com HPV e sem HPV obtidos a partir de qPCR de DNA complementar produzido com o RNA extraído das amostras, para cinco alvos diferentes, e valor de Expressão Relativa (ER), que representa quantas vezes o gene é expresso nas amostras com câncer e com HPV comparado às amostras com câncer sem HPV.

Gene	HPV negativo (n=25)	HPV positivo (n=5)	ER
<i>HOXC6</i>	6,59 \pm 0,36	6,52 \pm 0,56	1,04(NS)
<i>MCPIP3</i>	4,99 \pm 0,46	7,42 \pm 0,85	0,18*
<i>CREB3L4</i>	7,16 \pm 0,28	7,82 \pm 0,26	0,62(NS)
<i>LINC01082</i>	9,73 \pm 0,42	9,11 \pm 0,79	1,53(NS)
<i>TRIP13</i>	10,46 \pm 0,29	9,49 \pm 0,86	1,94(NS)

HOXC6 = Homeobox C6; *MCPIP3* = Proteína dedo de zinco do tipo-CCCH; *CREB3L4* = Proteína 3 de ligação ao elemento responsivo AMP cíclico 4); *LINC01082* = RNA longo não codificante 01082; *TRIP13* = Interator do receptor de hormônio da tireóide 13. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS = não significativo. **Fonte:** dados do autor.

Por fim, foi avaliada a influência tanto da presença do câncer quanto a presença do HPV na expressão dos genes marcadores de agressividade (Figura 15) para as 42 amostras, que foram distribuídas em quatro grupos de análises: sem câncer e sem HPV (N=10), com câncer e sem HPV (N=25), com câncer e com HPV (N=5) e grupo sem câncer e com HPV (N=2). Os valores de ΔCt para os grupos amostrais foram analisados por ANOVA two way assumindo como significativo o valor de $P < 0,05$.

Figura 15 - Perfil de expressão gênica geral dos grupos analisados



O eixo y representa o valor de ΔCt , o eixo x indica os grupos amostrais com e sem HPV representados com e sem câncer para os cinco alvos do estudo com a barra de erro padrão; a significância estatística pode ser representada quando os grupos não compartilham a mesma letra (A,B). **Fonte:** dados do autor.

Os resultados da análise de variância, bem como os valores de interação entre as variáveis câncer e HPV podem ser observadas na tabela da ANOVA abaixo (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores do teste ANOVA a partir do ΔCt (diferença entre ciclos de limiar de detecção entre o gene alvo e o controle endógeno GAPDH) de amostras de biópsia próstata entre o grupo amostral cancerígeno com HPV e sem HPV e não cancerígeno com HPV e sem HPV obtidos a partir de qPCR de DNA complementar produzido com o RNA extraído das amostras, para cinco alvos diferentes.

Gene	Fator	DF	Média do Sq	Valor de F	Valor de p
<i>HOXC6</i>	Interação	1	0,2868	F= 0,08	<i>p= 0,77</i>
	HPV	1	0,1519	F= 0,04	<i>p= 0,83</i>
	Câncer	1	24,57	F= 7,25	<i>p= 0,01</i>
	Resíduos	38	3,388		
<i>MCPIP3</i>	Interação	1	26,74	F= 4,84	<i>p= 0,03</i>
	HPV	1	0,01333	F= 0,002	<i>p= 0,96</i>
	Câncer	1	48,01	F= 8,68	<i>p= 0,005</i>
	Resíduos	38	5,523		
<i>CREB3L4</i>	Interação	1	0,5360	F= 0,33	<i>p= 0,56</i>
	HPV	1	4,662	F= 2,93	<i>p= 0,09</i>
	Câncer	1	0,2964	F= 0,18	<i>p= 0,66</i>
	Resíduos	38	1,587		
<i>LINC01082</i>	Interação	1	0,003319	F= 0,0009	<i>p= 0,97</i>
	HPV	1	1,671	F= 0,45	<i>p= 0,50</i>
	Câncer	1	37,61	F= 10,20	<i>p= 0,002</i>
	Resíduos	38	3,688		
<i>TRIP13</i>	Interação	1	4,044	F= 2,013	<i>p= 0,16</i>
	HPV	1	0,01860	F= 0,00926	<i>p= 0,92</i>
	Câncer	1	18,96	F= 9,440	<i>p= 0,003</i>
	Resíduos	38	2,009		

Valores gerados pelo teste ANOVA para os genes *HOXC6* = Homeobox C6; *MCPIP3* = Proteína dedo de zinco do tipo-CCCH; *CREB3L4* = Proteína 3 de ligação ao elemento responsivo AMP cíclico 4); *LINC01082* = RNA longo não codificante 01082; *TRIP13* = Interator do receptor de hormônio da tireóide 13. A tabela apresenta os dados para os fatores interação (câncer vs HPV), câncer e HPV, representados por DF= Grau de liberdade; Média do Sq= Média dos quadrados; Valor de F e Valor p. Em vermelho estão os valores de $P < 0,05$. **Fonte:** dados do autor.

7 DISCUSSÃO

O processo de desenvolvimento do câncer inclui o acúmulo de alterações cromossômicas, genéticas e epigenéticas que favorecem a existência da heterogeneidade tumoral. Uma das formas de manutenção destes múltiplos comportamentos celulares e desta heterogeneidade no câncer se dá através da expressão gênica diferencial (FELTS *et al.*, 2019; JOHANSSON *et al.*, 2019; THAKUR *et al.*, 2021).

De maneira geral, os genes no câncer podem ser encontrados com atividade aumentada, inativada ou reduzida a depender do microambiente tecidual, podendo diferenciar-se do perfil de expressão gênica de células fenotipicamente normais ou até mesmo entre mesmos tecidos cancerígenos, mas com determinadas especificidades, como, por exemplo, a infecção pelo HPV. O presente estudo trabalha com a hipótese de que a presença do HPV altera a expressão de genes envolvidos na agressividade clínica do câncer de próstata, que foi avaliada pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real de cDNA retrotranscrito (RT-qPCR) com o uso do método comparativo de ΔCt , em cinco alvos de RNA em biópsias de próstata com e sem câncer diagnosticado, na presença e na ausência do HPV.

Um dos princípios para uma boa execução de experimentos de expressão gênica é a padronização da técnica e dos alvos, necessária para avaliar a eficiência da amplificação, da extração do RNA extraído e especificada dos primers. Esta etapa pode ser executada pela amplificação de diferentes concentrações de cDNA, método denominado de curva padrão (BUSTIN *et al.*, 2009); no presente estudo, esta etapa foi realizada para todos os alvos incluindo o gene normalizador/controle endógeno (*GAPDH*), como resultado todos os primers foram padronizados alcançando os valores de eficiência de amplificação e R^2 aceitáveis para a execução do método.

Os resultados das análises moleculares de expressão gênica dos alvos do estudo demonstraram que o gene *HOXC6* é um potencial biomarcador de prognóstico para o câncer de próstata. Na literatura, este gene foi descrito com expressão aumentada em diversos tipos de câncer, dentre eles: câncer gástrico (JUNG *et al.*, 2020; LIN *et al.*, 2020), câncer do colo do útero (WANG *et al.*, 2019), câncer de esôfago (SHEN *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2019), câncer na glia (YAN *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2019) e no carcinoma nasofaríngeo (CHANG *et al.*, 2017).

Em próstata, nossas análises encontraram este gene 4,07 vezes mais

expresso em tecidos cancerígenos comparados a tecidos normais. Resultado semelhante foi relatado em outros estudos no câncer de próstata avaliando-se a expressão de mRNA deste gene em biópsias (MENGUAL *et al.*, 2014; VAN NESTE *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2019); porém, métodos diferentes também alcançaram resultados similares, como um estudo utilizando linhagens celulares (MILLER *et al.*, 2003) e outro executado pela técnica de *microarray* (RIZZARDI *et al.*, 2014).

Nosso estudo também encontrou o *HOXC6* com expressão significativamente aumentada nos maiores valores de score de Gleason. Isto é, em biópsias histologicamente classificadas com maior comprometimento tecidual o gene tem sua expressão elevada, o que chama atenção ao fato deste alvo estar relacionado a múltiplos mecanismos cancerígenos, tais como o aumento da capacidade proliferativa, invasiva, metastática e relacionado às menores taxas de sobrevida e à resistência quimioterápica (CHEN *et al.*, 2016; JUNG *et al.*, 2020; SHEN *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2019).

Quando este gene foi avaliado em conjunto com a prevalência do HPV, não encontramos expressão diferencial entre o grupo amostral com câncer positivo e negativo para a infecção viral, contudo, a análise de variância (ANOVA) demonstrou que a diferença encontrada entre a presença e ausência do câncer sem o HPV só é estatisticamente significativa na ausência do vírus. Nossos dados levantam a hipótese de que a presença da infecção pelo HPV poderia alterar o potencial do *HOXC6* como biomarcador de câncer, sobretudo em tecidos mais suscetíveis ao papilomavirus humano.

Para o alvo *CREB3L4*, a avaliação do potencial biomarcador para o câncer de próstata não foi significativa, o mesmo ocorreu quando relacionamos os níveis de expressão ao score de agressividade. Na literatura este gene foi descrito com expressão aumentada e associado aos piores prognósticos do câncer de mama (JING *et al.*, 2019; PU *et al.*, 2020), além de participar do mecanismo de angiogênese no câncer de estômago (WANG *et al.*, 2021); assim, de acordo com nossos resultados o *CREB3L4* não teve expressão diferencial na ausência e presença do câncer de próstata, apesar das evidências de seu envolvimento nos mecanismos carcinogênicos.

Diante de achados recentes que relacionam o *CREB3L4*, mediado pelo VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), na formação de vasos sanguíneos (WANG *et al.*, 2021), avaliou-se a expressão deste alvo na presença do HPV, visto

que, na literatura, alguns estudos apontam que amostras de câncer de colo do útero positivas para o HPV têm a expressão de fatores de crescimento aumentada, dentre eles o VEGF (TROY *et al.*, 2013; YUAN *et al.*, 2018). No entanto, não encontramos associação que evidencie a presença da infecção com alteração da expressão do *CREB3L4*, mas não descartamos a necessidade de avaliação deste gene para outros tipos de câncer em tecidos com maior tropismo pelo HPV.

Em relação ao RNA longo não codificante 01082 apresentamos evidências consistentes de que este alvo possa estar relacionado ao diagnóstico do câncer de próstata. Trabalhos anteriores apontaram que esta molécula possui expressão reduzida na presença do câncer de bexiga (OUSATI-ASHTIANI *et al.*, 2017) e no câncer colorretal (HUANG *et al.*, 2019a) comparados a tecidos adjacentes não cancerígenos. Em nossos resultados encontramos este alvo sete vezes menos expresso em biópsias com câncer de próstata diagnosticado em relação a biópsias de pacientes sem câncer.

Na literatura, um estudo recentemente publicado a partir de análises exploratórias de dados de transcriptômicos disponíveis no *Cancer Genome Atlas* (TCGA) encontrou a expressão aumentada do *LINC01082* relacionado à melhor sobrevida (ZHANG *et al.*, 2022); o que pode ser justificado por um estudo realizado com câncer colorretal que descreveu esta molécula com atividade supressora de tumor (XIONG *et al.*, 2019). Neste cenário, nosso estudo seria o segundo a avaliar a expressão do *LINC01082* no câncer de próstata e o primeiro a avaliar através da técnica de RTqPCR.

Em relação ao HPV, a expressão reduzida do alvo na presença do câncer comparado à ausência do câncer foi mantida, porém, este mesmo comportamento não foi observado na variável câncer com presença do HPV. Apesar das médias serem bastante divergentes, o n amostral reduzido somado ao elevado desvio padrão do grupo com câncer positivo para o HPV e o grupo sem câncer negativo para o HPV a análise do teste foi fragilizada e a significância estatística não encontrada. Ainda assim, não se descarta a possibilidade da presença do HPV alterar o padrão de expressão descrito na literatura para este alvo, uma vez que novamente foi encontrada expressão reduzida desta molécula em tecidos suscetíveis ao HPV, como colorretal e bexiga (HUANG *et al.*, 2019a; OUSATI-ASHTIANI *et al.*, 2017).

O gene *TRIP13*, assim como o *HOXC6* tem sido amplamente estudado como biomarcador de uma grande diversidade de cânceres, dentre eles: câncer renal

(KOWALEWSKI *et al.*, 2020), glioblastoma (ZHANG *et al.*, 2019), bexiga (LU *et al.*, 2019), esôfago (DI *et al.*, 2019), ovário (ZHOU; SHU, 2019) e no câncer de pulmão (LI *et al.*, 2018). Em nossas análises moleculares este gene foi 2,14 vezes mais expresso em biópsias prostáticas com câncer; encontramos também diferenças representativas na expressão deste gene nos maiores scores de agressividade, apesar do valor de p encontrado não ter sido inferior à 0,05 (0,057) não é possível desconsiderar a diferença existente na expressão aumentada do alvo para os grupos classificados com maior score.

Acerca deste gene, para o câncer de próstata, a literatura aponta evidências da expressão elevada deste alvo em linhagens celulares cancerígenas e estudos ainda atribuem ao *TRIP13* atuação na regulação positiva da proliferação, migração e invasão do câncer (DONG *et al.*, 2019). Em nossos achados, a presença da infecção pelo HPV não foi determinante para a expressão do *TRIP13*; neste sentido, os achados desta pesquisa para este gene se aproximam dos achados por outros pesquisadores que não avaliaram o envolvimento do HPV, pois este gene se confirmou como um potencial biomarcador de prognóstico do câncer de próstata na população estudada.

O *MCPIP3*, ao contrário do *HOXC6*, *CREB3L4* e *TRIP13*, não é a expressão aumentada deste gene que provoca os mecanismos clínicos e moleculares desfavoráveis, mas sim a redução de seus transcritos. No geral, este alvo tem sido implicado na regulação negativa das respostas inflamatórias celulares, pois o *MCPIP3* atua na degradação de citocinas inflamatórias, sendo assim, um gene que age favorecendo a evolução clínica, contra a progressão tumoral (LIU *et al.*, 2021). No presente estudo, o gene *MCPIP3* não foi diferentemente expresso na presença e na ausência do câncer, tampouco nos scores de agressividade, porém, ao avaliarmos o fator HPV, encontramos expressão diferencial entre os grupos com câncer positivos para o HPV (5,5 vezes menos expresso) em relação ao grupo com câncer sem HPV, havendo resultados significantes tanto no teste T quanto na análise de variância.

Estes achados sugerem que o *MCPIP3* não pode ser utilizado como potencial biomarcador de câncer de próstata de maneira isolada, pois a expressão reduzida deste alvo pode ser indicativa de infecção pelo HPV. Curiosamente o único estudo encontrado que avaliou a expressão reduzida do *MCPIP3* em tecido cancerígeno e apresentou-o como potencial biomarcador de câncer fez suas análises a partir de tecidos cancerígenos colorretais (SUK *et al.*, 2018) e este trabalho não avaliou a

presença da infecção viral pelo HPV, tendo desconsiderado um fator essencial que influencia o nível de expressão deste gene, como foi demonstrado nesta pesquisa, considerando ainda que a prevalência do HPV no câncer colorretal é maior comparado aos tecidos sem este tipo de câncer (CHAO *et al.*, 2020).

Outra característica que, de maneira incipiente, pode estar associada a estes achados, relaciona-se ao próprio ciclo de vida do HPV, uma vez que o mecanismo de infecção deste vírus “engana” o sistema imunológico humano evitando a sinalização da cascata imunológica que comprometeria o ciclo viral, mantendo o microambiente com inflamação exacerbada. Assim, o HPV favorece uma infecção crônica, onde as células do sistema imune não detectem a presença do patógeno (HUSSAIN *et al.*, 2021).

Portanto, os resultados encontrados a partir desta pesquisa auxiliam a compreensão dos impactos dos mecanismos moleculares e infecciosos nos aspectos clínico-patológicos do câncer de próstata, subsidiando ainda futuras pesquisas em torno desta doença com o intuito de melhorar a assistência aos pacientes oncológicos no que condiz o aumento da expectativa de vida, métodos terapêuticos mais eficientes e menos danosos e, sobretudo no rastreamento precoce da doença.

8 CONCLUSÃO

- Os genes *HOXC6* e o *TRIP13* foram encontrados com expressão aumentada na presença do câncer de próstata;
- O *RNA longo não codificante 01082* tem expressão reduzida na presença do câncer prostático;
- O alvo *HOXC6* é mais expresso em amostras com maior score de Gleason, podendo ser um potencial biomarcador de agressividade na neoplasia maligna da próstata;
- O alvo *TRIP13*, com o valor de p próximo a 0,05 foi encontrado com expressão aumentada nos scores classificados como mais agressivos;
- A presença do HPV pode mascarar a atuação do gene *HOXC6* como biomarcador do câncer de próstata;
- O gene *MCPIP3* é significativamente menos expresso na presença do HPV e pode alterar a utilização deste alvo como biomarcador de câncer em tecidos mais suscetíveis à infecção viral.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, Sumit *et al.* TRIP13 promotes metastasis of colorectal cancer regardless of p53 and microsatellite instability status. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 3007–3029, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12821>. Acesso em: 25 set 2021.
- AKSOY, Pinar; GOTTSCHALK, Elinor Y.; MENESES, Patricio I. HPV entry into cells. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, [s. l.], v. 772, p. 13–22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.09.004>. Acesso em: 28 set 2021.
- ARALDI, Rodrigo Pinheiro *et al.* Papillomaviruses: a systematic review. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1–21, 2017. Acesso em: 12 out 2021.
- ARALDI, Rodrigo Pinheiro *et al.* The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, France, v. 106, p. 1537–1556, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.149>. Acesso em: 14 jul 2021.
- ARAUJO-NETO, Ari P. *et al.* Lack of detection of human papillomavirus DNA in prostate carcinomas in patients from northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 24–29, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0122>. Acesso em: 10 nov 2021.
- ARONSON, Jeffrey K.; FERNER, Robin E. Biomarkers—a general review. **Current Protocols in Pharmacology**, [s. l.], v. 2017, n. March, p. 9.23.1-9.23.17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpph.19>. Acesso em: 04 jul 2021.
- ATASHAFROOZ, Fatemeh; ROKHBAKHSH-ZAMIN, Farokh. Frequency and type distribution of human papilloma virus in patients with prostate cancer, Kerman, southeast of Iran. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 3951–3956, 2016.
- BALASUBRAMANIAM, Shandra Devi *et al.* Key molecular events in cervical cancer development. **Medicina (Lithuania)**, [s. l.], v. 55, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/medicina55070384>. Acesso em: 13 set 2021.
- BANERJEE, Rajat *et al.* TRIP13 promotes error-prone nonhomologous end joining and induces chemoresistance in head and neck cancer. **Nature Communications**, [s. l.], v. 5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms5527>. Acesso em: 09 mai 2021.
- BARBIERI, Isaia; KOUZARIDES, Tony. Role of RNA modifications in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 303–322, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-020-0253-2>. Acesso em: 09 mai 2021.
- BARRY, Michael J.; SIMMONS, Leigh H. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality: Primary Prevention and Early Detection. **Medical Clinics of North America**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 787–806, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2017.03.009>. Acesso em: 09 mai 2021.

BUSTIN, Stephen A. *et al.* The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>. Acesso em: 03 mai 2021.

CHANG, Shih-Lun *et al.* HOXC6 Overexpression Is Associated With Ki-67 Expression and Poor Survival in NPC Patients. **Journal of Cancer**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1647–1654, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/jca.18893>. Acesso em: 09 nov 2021.

CHAO, Guanqun *et al.* The prevalence of human papillomavirus in colorectal cancer and adenoma: A meta-analysis. **Journal of cancer research and therapeutics**, India, v. 16, n. 7, p. 1656–1663, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_636_20. Acesso em: 18 mai 2021.

CHEN, Ni; ZHOU, Qiao. The evolving Gleason grading system. **Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 58–64, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.04>. Acesso em: 15 set 2021.

CHEN, Shi Wei *et al.* HOXC6 promotes gastric cancer cell invasion by upregulating the expression of MMP9. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 3261–3268, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5640>. Acesso em: 25 mai 2021.

COSPER, Pippa F. *et al.* Biology of HPV Mediated Carcinogenesis and Tumor Progression. **Seminars in Radiation Oncology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 265–273, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semradonc.2021.02.006>. Acesso em: 09 jan 2022.

DE MARTEL, Catherine *et al.* Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **International journal of cancer**, [s. l.], v. 141, n. 4, p. 664–670, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.30716>. Acesso em: 09 mai 2021.

DESTERRO, Joana; BAK-GORDON, Pedro; CARMO-FONSECA, Maria. Targeting mRNA processing as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 112–129, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0042-3>. Acesso em: 10 mai 2021.

DI, Shouyin *et al.* TRIP13 upregulation is correlated with poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. **Pathology Research and Practice**, [s. l.], v. 215, n. 6, p. 152415, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.04.007>. Acesso em: 15 mai 2021.

DONG, Liming *et al.* TRIP13 is a predictor for poor prognosis and regulates cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 121, p. 200–206, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.168>. Acesso em: 12 ago 2021.

EGAWA, Nagayasu; DOORBAR, John. The low-risk papillomaviruses. **Virus Research**, [s. l.], v. 231, p. 119–127, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.017>. Acesso em: 09 mai 2021.

ENSEMBL. Disponível em: <https://www.ensembl.org/index.html>. Acesso em: 14 fev 2022

FELTS, Sara J. *et al.* Stochastic changes in gene expression promote chaotic dysregulation of homeostasis in clonal breast tumors. **Communications Biology**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0460-0>. Acesso em: 18 jun 2021.

FRANCIS, Jeffrey C.; SWAIN, Amanda. Prostate organogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030353>. Acesso em: 13 set 2021.

FRANIEL, T; RÖTHKE, M. [PI-RADS 2.0 for Prostate MRI]. **Der Radiologe**, Germany, v. 57, n. 8, p. 665–678, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00117-017-0269-0>. Acesso em: 22 mai 2021.

FUJIKI, Kotoyo *et al.* Hoxc6 Is Overexpressed in Gastrointestinal Carcinoids and Interacts With JunD to Regulate Tumor Growth. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 135, n. 3, p. 907–916, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.034>. Acesso em: 09 mai 2021.

GAO, Yanjun *et al.* Increased expression of TRIP13 drives the tumorigenesis of bladder cancer in association with the EGFR signaling pathway. **International Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1488–1499, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.32718>. Acesso em: 25 jun 2021.

GLENN, Wendy K. *et al.* High risk human papilloma viruses (HPVs) are present in benign prostate tissues before development of HPV associated prostate cancer. **Infectious Agents and Cancer**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0157-2>. Acesso em: 09 mai 2021.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN). Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/>. Acesso em: 14 fev 2022

GOODALL, Gregory J.; WICKRAMASINGHE, Vihandha O. RNA in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 22–36, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00306-0>. Acesso em: 28 dez 2021.

GROSSE, Andreas; BARTSCH, Sophie; BANIAHMAD, Aria. Androgen receptor-mediated gene repression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 352, n. 1–2, p. 46–56, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.032>. Acesso em: 13 out 2020.

HANAHAN, D; WEINBERG, R A. The hallmarks of cancer. **Cell**, United States, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9). Acesso em: 09 abr 2021.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>. Acesso em: 09 nov 2021.

HENG, Julie; HENG, Henry H. Genome chaos: Creating new genomic information essential for cancer macroevolution. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.11.003>. Acesso em: 10 abr 2021.

HUANG, Wei *et al.* Identification of long noncoding RNAs biomarkers for diagnosis and prognosis in patients with colon adenocarcinoma. **Journal of cellular biochemistry**, United States, v. 120, n. 3, p. 4121–4131, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.27697>. Acesso em: 22 jun 2021.

HUANG, Wei *et al.* Identification of long noncoding RNAs biomarkers for diagnosis and prognosis in patients with colon adenocarcinoma. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 4121–4131, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.27697>. Acesso em: 23 jul 2020.

HUSSAIN, Suleman S. *et al.* Genomic signatures in hpv-associated tumors. **Viruses**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v13101998>. Acesso em: 22 abr 2021.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/papillomaviridae. Acesso em: 14 fev 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 14 fev 2022.

JING, Xuan *et al.* Overexpression of MUC1 predicts poor prognosis in patients with breast cancer. **Oncology Reports**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 801–810, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/or.2018.6887>. Acesso em: 18 nov 2021.

JOHANSSON, Bertil *et al.* Most gene fusions in cancer are stochastic events. **Genes, chromosomes & cancer**, United States, v. 58, n. 9, p. 607–611, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/gcc.22745>. Acesso em: 21 mar 2021.

JUNG, Jiyeon *et al.* Increased HOXC6 mRNA expression is a novel biomarker of gastric cancer. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 8 August, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236811>. Acesso em: 09 abr 2021.

KARCZEWSKI, Konrad J.; SNYDER, Michael P. Integrative omics for health and disease. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 299–310, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg.2018.4>. Acesso em: 09 abr 2021.

KIM, Tae Hyun *et al.* The role of CREB3L4 in the proliferation of prostate cancer cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. March, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep45300>. Acesso em: 12 jul 2021.

KOTLER, Burt P.; BROWN, Joel S. Cancer Community Ecology. **Cancer Control**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1073274820951776>. Acesso em: 06 dez 2021.

KOWALEWSKI, Adam *et al.* TRIP13 predicts poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. **American journal of cancer research**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 2909–2918,

2020. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33042625><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7539765>. Acesso em: 09 dez 2021.

KURITA, Kenji *et al.* TRIP13 is expressed in colorectal cancer and promotes cancer cell invasion. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 5240–5246, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5332>. Acesso em: 28 fev 2021.

LI, Wei *et al.* Thyroid hormone receptor interactor 13 (TRIP13) overexpression associated with tumor progression and poor prognosis in lung adenocarcinoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 499, n. 3, p. 416–424, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.129>. Acesso em: 03 abr 2021.

LIN, Jinping *et al.* HoxC6 Functions as an Oncogene and Isoform HoxC6-2 May Play the Primary Role in Gastric Carcinogenesis. **Digestive Diseases and Sciences**, [s. l.], v. 65, n. 10, p. 2896–2906, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10620-019-06013-7>. Acesso em: 09 abr 2021.

LIU, Bo *et al.* The RNase MCPIP3 promotes skin inflammation by orchestrating myeloid cytokine response. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24352-w>. Acesso em: 09 abr 2021.

LU, S. *et al.* Insights into a Crucial Role of TRIP13 in Human Cancer. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 17, p. 854–861, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.06.005>. Acesso em: 09 abr 2021.

LU, Sicheng *et al.* Elevated TRIP13 drives cell proliferation and drug resistance in bladder cancer. **American Journal of Translational Research**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 4397–4410, 2019.

LU, Yongqu *et al.* Long non-coding RNA profile study identifies a metabolism-related signature for colorectal cancer. **Molecular Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00343-x>. Acesso em: 26 jun 2021.

MAC, Michelle; MOODY, Cary A. Epigenetic regulation of the human papillomavirus life cycle. **Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 1–18, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens9060483>. Acesso em: 26 jun 2021.

MACCARTHY-MORROGH, Lucy; MARTIN, Paul. The hallmarks of cancer are also the hallmarks of wound healing. **Science signaling**, United States, v. 13, n. 648, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scisignal.aay8690>. Acesso em: 26 jun 2021.

MARTINCORENA, Iñigo; CAMPBELL, Peter J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 349, n. 6255, p. 1483–1489, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aab4082>. Acesso em: 26 jun 2021.

MEDEL-FLORES, Olivia *et al.* Association between HPV infection and prostate

cancer in a Mexican population. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 781–789, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0331>. Acesso em: 27 jun 2021.

MENGUAL, L *et al.* Gene expression profiles in prostate cancer: identification of candidate non-invasive diagnostic markers. **Actas urológicas españolas**, Spain, v. 38, n. 3, p. 143–149, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2013.07.012>. Acesso em: 29 jul 2021.

MILLER, Gary J *et al.* Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate. **Cancer research**, United States, v. 63, n. 18, p. 5879–5888, 2003. Acesso em: 30 jun 2021.

NEDELCO, Aurora M. The evolution of multicellularity and cancer: views and paradigms. **Biochemical Society transactions**, England, v. 48, n. 4, p. 1505–1518, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST20190992>. Acesso em: 26 jun 2021.

NIJMAN, Sebastian M.B. Perturbation-Driven Entropy as a Source of Cancer Cell Heterogeneity. **Trends in Cancer**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 454–461, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.02.016>. Acesso em: 9 nov 2021

OUSATI-ASHTIANI, Zahra *et al.* Dysregulated Expression of Long Intergenic Non-coding RNAs (LincRNAs) in Urothelial Bladder Carcinoma. **International journal of molecular and cellular medicine**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 212–221, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.22088/BUMS.6.4.212>. Acesso em: 01 jun 2021.

PANNI, Simona *et al.* Non-coding RNA regulatory networks. **Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms**, Netherlands, v. 1863, n. 6, p. 194417, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194417>. Acesso em: 26 jun 2021.

PU, Qian *et al.* The Novel Transcription Factor CREB3L4 Contributes to the Progression of Human Breast Carcinoma. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 37–50, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10911-020-09443-6>. Acesso em: 05 set 2021.

QMICHOU, Zineb *et al.* Analysis of mutations in the E6 oncogene of human papillomavirus 16 in cervical cancer isolates from Moroccan women. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-378>. Acesso em: 08 mai 2021.

REBELLO, Richard J. *et al.* Prostate cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>. Acesso em: 03 jan 2022.

RIZZARDI, Anthony E. *et al.* Evaluation of protein biomarkers of prostate cancer aggressiveness. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–14, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-244>. Acesso em: 07 ago 2021.

RYBAK, Adrian P.; BRISTOW, Robert G.; KAPOOR, Anil. Prostate cancer stem cells: Deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and

aggression. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 1900–1919, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2953>. Acesso em: 17 nov 2021.

SAUER, Ann Katrin *et al.* Zinc Deficiency in Men Over 50 and Its Implications in Prostate Disorders. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 10, n. August, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01293>. Acesso em: 08 jun 2021.

SCOTT, Jacob; MARUSYK, Andriy. Somatic clonal evolution: A selection-centric perspective. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1867, n. 2, p. 139–150, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.01.006>. Acesso em: 15 jan 2021.

SEGUNDO-VAL, Ignacio San; SANZ-LOZANO, Catalina S. Introduction to the gene expression analysis. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 1434, p. 29–43, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3652-6_3. Acesso em: 22 out 2021.

SHEN, Lu Yan *et al.* Increased HOXC6 expression predicts chemotherapy sensitivity in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 4835–4880, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6772>. Acesso em: 29 jun 2021.

SHENG, Nengquan *et al.* TRIP13 promotes tumor growth and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. **Cell death & disease**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 402, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0434-z>. Acesso em: 14 jun 2021.

SOMARELLI, Jason A. The Hallmarks of Cancer as Ecologically Driven Phenotypes. **Frontiers in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 9, n. April, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.661583> Acesso em: 02 abr 2021.

SPRIGGS, Chelsey C; LAIMINS, Laimonis A. Human Papillomavirus and the DNA Damage Response: Exploiting Host Repair Pathways for Viral Replication. **Viruses**, [s. l.], v. 9, n. 8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v9080232>. Acesso em: 13 mai 2021.

SUK, Fat Moon *et al.* MCPIP3 as a potential metastasis suppressor gene in human colorectal cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19051350>. Acesso em: 19 mar 2021.

SZYMONOWICZ, Klaudia Anna; CHEN, Junjie. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. **Cancer biology & medicine**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 864–878, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370>. Acesso em: 26 jun 2021.

TAN, Mh Eileen *et al.* Androgen receptor: Structure, role in prostate cancer and drug discovery. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 3–23, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/aps.2014.18>. Acesso em: 26 jun 2021.

TANG, Li *et al.* HOXC6 promotes migration, invasion and proliferation of esophageal squamous cell carcinoma cells via modulating expression of genes involved in malignant phenotypes. **PeerJ**, [s. l.], v. 2019, n. 3, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.7717/peerj.6607>. Acesso em: 26 jun 2021.

TAO, Yi *et al.* TRIP13 impairs mitotic checkpoint surveillance and is associated with poor prognosis in multiple myeloma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 16, p. 26718–26731, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14957>. Acesso em: 18 mai 2021.

THAKUR, Tanima *et al.* Gene Expression-Assisted Cancer Prediction Techniques. **Journal of Healthcare Engineering**, [s. l.], v. 2021, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/4242646>. Acesso em: 18 dez 2021.

TOMASETTI, Cristian; VOGELSTEIN, Bert. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 347, n. 6217, p. 78–81, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1260825>. Acesso em: 18 mai 2021.

TRIGOS, Anna S. *et al.* How the evolution of multicellularity set the stage for cancer. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 118, n. 2, p. 145–152, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.398>. Acesso em: 18 mai 2021.

TROY, Jesse D. *et al.* Expression of EGFR, VEGF, and NOTCH1 Suggest Differences in Tumor Angiogenesis in HPV-Positive and HPV-Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Head and Neck Pathology**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 344–355, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12105-013-0447-y>. Acesso em: 13 mai 2021.

TSUTSUI, Mai *et al.* Comprehensive screening of genes resistant to an anticancer drug in esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 867–874, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3085>. Acesso em: 14 mai 2021.

TURAJLIC, Samra *et al.* Resolving genetic heterogeneity in cancer. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 404–416, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0114-6>. Acesso em: 18 jun 2021.

VAN NESTE, Leander *et al.* Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker-Based Risk Score. **European urology**, Switzerland, v. 70, n. 5, p. 740–748, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.04.012>. Acesso em: 19 set 2021.

VASIOUKHIN, Valeri. Hepsin paradox reveals unexpected complexity of metastatic process. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, United States, v. 3, n. 11, p. 1394–1397, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.3.11.1273>. Acesso em: 16 mai 2021.

VISVADER, Jane E. Cells of origin in cancer. **Nature**, [s. l.], v. 469, n. 7330, p. 314–322, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature09781>. Acesso em: 18 mar 2021.

WANG, Guocan *et al.* Genetics and biology of prostate cancer. **Genes and Development**, [s. l.], v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>. Acesso em: 18 mai 2021.

- WANG, Nannan *et al.* CREB3L4 promotes angiogenesis and tumor progression in gastric cancer through regulating VEGFA expression. **Cancer Gene Therapy**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00305-9>. Acesso em: 13 dez 2021.
- WANG, Yingcong *et al.* **A small-molecule inhibitor targeting TRIP13 suppresses multiple myeloma progression**. [S. l.: s. n.], 2020a. ISSN 15387445.v. 80 Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3987>. Acesso em: 24 mai 2021.
- WANG, Yingcong *et al.* A small-molecule inhibitor targeting TRIP13 suppresses multiple myeloma progression. **Cancer Research**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 536–548, 2020b. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3987>. Acesso em: 15 jan 2022.
- WANG, Yongsheng *et al.* HOXC6 promotes cervical cancer progression via regulation of Bcl-2. **FASEB Journal**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 3901–3911, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.201801099RR>. Acesso em: 18 mai 2021.
- WILLIAMS, Marc J.; SOTTORIVA, Andrea; GRAHAM, Trevor A. Measuring Clonal Evolution in Cancer with Genomics. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, [s. l.], v. 20, p. 309–329, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021712>. Acesso em: 18 mai 2021.
- XIONG, Wei *et al.* Overexpression LINC01082 suppresses the proliferation, migration and invasion of colon cancer. *In: MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY*. [S. l.]: Springer US, 2019. v. 462, p. 33–40. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03607-7>. Acesso em: 02 jan 2021.
- XU, Jun *et al.* LncRNA BBOX1-AS1 upregulates HOXC6 expression through miR-361-3p and HuR to drive cervical cancer progression. **Cell Proliferation**, [s. l.], v. 53, n. 7, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cpr.12823>. Acesso em: 24 nov 2021.
- YAN, Teng feng *et al.* Knockdown of HOXC6 inhibits glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest by targeting WIF-1 in vitro and vivo. **Pathology Research and Practice**, [s. l.], v. 214, n. 11, p. 1818–1824, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.09.001>. Acesso em: 24 nov 2021.
- YANG, Peng Yu *et al.* Overexpression of HOXC6 promotes cell proliferation and migration via MAPK signaling and predicts a poor prognosis in glioblastoma. **Cancer Management and Research**, [s. l.], v. 11, p. 8167–8179, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CMAR.S209904>. Acesso em: 24 nov 2021.
- YAO, Jianning *et al.* Silencing TRIP13 inhibits cell growth and metastasis of hepatocellular carcinoma by activating of TGF- β 1/smad3. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0704-y>. Acesso em: 24 nov 2021.
- YUAN, Y *et al.* Expressions of VEGF and miR-21 in tumor tissues of cervical cancer patients with HPV infection and their relationships with prognosis. **European review for medical and pharmacological sciences**, Italy, v. 22, n. 19, p. 6274–6279, 2018.

Disponível em: https://doi.org/10.26355/eurrev_201810_16035 Acesso em: 24 nov 2021.

ZHANG, Guanghui *et al.* TRIP13 promotes the cell proliferation, migration and invasion of glioblastoma through the FBXW7/c-MYC axis. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 121, n. 12, p. 1069–1078, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0633-0>. Acesso em: 26 jun 2021.

ZHANG, Tengfei *et al.* Identification of Novel Diagnostic Biomarkers in Prostate Adenocarcinoma Based on the Stromal-Immune Score and Analysis of the WGCNA and ceRNA Network. **Disease markers**, [s. l.], v. 2022, p. 1909196, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2022/1909196>. Acesso em: 01 mar 2022.

ZHANG, Xiyang *et al.* MiR-515-5p acts as a tumor suppressor via targeting TRIP13 in prostate cancer. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 129, p. 227–232, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.127>. Acesso em: 27 jun 2021.

ZHOU, Junyu *et al.* HOXC6 in the prognosis of prostate cancer. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 2715–2720, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1635136>. Acesso em: 13 mai 2021.

ZHOU, X. Y.; SHU, X. M. TRIP13 promotes proliferation and invasion of epithelial ovarian cancer cells through Notch signaling pathway. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 522–529, 2019. Disponível em: https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16864. Acesso em: 24 nov 2021.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amapá.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAPÁ - UNIFAP



Continuação do Parecer: 2.351.804

possivelmente causados pelo vírus do HPV.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa extremamente relevante e exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE e Termos de coparticipação institucional de acordo com a resolução 466/12 CNS.

Recomendações:

Recomendo a aprovação do projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_916079.pdf	30/08/2017 17:18:32		Aceito
Outros	CartaIOM.pdf	30/08/2017 17:18:10	NALISSON MARQUES	Aceito
Outros	Carta1.pdf	30/08/2017 17:17:54	NALISSON MARQUES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TLCEUnifap.doc	30/08/2017 17:17:38	NALISSON MARQUES PEREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCEP.docx	30/08/2017 17:15:43	NALISSON MARQUES PEREIRA	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	30/08/2017 17:14:31	NALISSON MARQUES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rodovia Juscelino Kubistcheck de Oliveira - Km.02
 Bairro: Bairro Universidade CEP: 68.902-280
 UF: AP Município: MACAPA
 Telefone: (96)4009-2805 Fax: (96)4009-2804 E-mail: cep@unifap.br