

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ESTRUTURAL E FUNCIONAL

Trabalho de Conclusão de Curso

Efeitos do silenciamento gênico da enzima quinase MELK sobre a radiossensibilidade de células tumorais prostáticas DU145

Aluna: Luiza da Silva Corrêa

Graduanda em Física Médica – Instituto de Biociências - UNESP

Pesquisador Responsável (Supervisor): Sérgio Luis Felisbino

Docente do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional – Instituto de Biociências - UNESP

Botucatu

2021

Luiza da Silva Corrêa

EFEITOS DO SILENCIAMENTO GÊNICO DA ENZIMA QUINASE MELK
SOBRE A RADIOSSENSIBILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS
PROSTÁTICAS DU145

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
Unesp, Campus de Botucatu, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do grau
de Bacharel em Física Médica.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis Felisbino.

Botucatu

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Corrêa, Luiza da Silva.

Efeitos do silenciamento gênico da enzima quinase MELK sobre a radiosensibilidade de células tumorais prostáticas DU145 / Luiza da Silva Corrêa. - Botucatu, 2021

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Sérgio Luis Felisbino
Capes: 20601000

1. Próstata - Câncer. 2. Radioterapia. 3. Tolerância a radiação. 4. Inativação gênica.

Palavras-chave: Câncer de próstata; MELK; Radiosensibilidade; Radioterapia; Silenciamento gênico.

*“If you can dream it,
you can do it.”*

-Walt Disney

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, durante minha jornada, me lembraram do meu potencial. Dedico a cada um que por um minuto me trouxe amor e esperança quando eu já não tinha mais. Em especial minha família, meus pais, que acreditam em mim, e sempre estão comigo, meus avós, que são minha luz na Terra, os quais iluminam minha jornada. Ao Plínio e a Tati, por trazerem alegria junto à Helena e Francisco, porque todo adulto é uma criança crescida. À Giovana, por lembrar que cada um tem sua jornada, e que devemos buscá-la incansavelmente.

Aos amigos que a faculdade me trouxe, Letícia, uma irmã já criada, com quem dividi não só a casa, mas a vida nesses 4 anos. Ao Mateus, que se incumbiu de ser amigo e conselheiro nesses anos. Vocês me fizeram crescer.

Ao Bruno, que sempre trouxe um riso de alegria nas minhas lágrimas de desespero. Você me manteve firme, mesmo quando eu quis desistir.

Enfim, a todos vocês que participaram de uma forma ou de outra nos melhores e piores dias da minha vida! Não seria possível sem vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à instituição UNESP, que me acolheu esses anos todos. À Flávia Karina Delella, que me trouxe a paixão pela biologia celular. Ao meu orientador Sérgio Luis Felisbino, que apoiou a ideia de unir a radiação ionizante à biologia celular. Ao Caio Monção que foi meu braço direito, e minha fonte de conhecimento, junto à Caroline Barquilha, que são uma inspiração como cientistas e como pessoas! Também a Juliana Trindade Caleffi, que foi mais que uma companheira de laboratório.

Novamente, agradeço aos meus amigos e familiares que dediquei este trabalho.

Agradeço ainda a CNPq, cujo fomento foi imprescindível para que este trabalho acontecesse.

E agradeço a Deus por toda essa oportunidade.

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é o segundo que mais mata homens quando a causa é o câncer. Hoje, os tratamentos existentes para os mais diversos tipos de CaP incluem cirurgia, radioterapia, imunoterapia, quimioterapia e terapias antiandrogênicas, porém em grande parte dos casos de estágio avançado da doença, os tratamentos só prolongam a vida do paciente sem curá-lo. Desta forma, novas estratégias terapêuticas que possam conferir tratamentos eficientes para os CaPs primários e “*de novo*” são necessários. Em trabalho recente, altas expressões do gene Leucina Embrionária Materna Zipper Quinase (*MELK*) foram encontradas em tumores de camundongos e de pacientes com CaP. Além disso, este gene é descrito por ter importante papel na proliferação e regulação do ciclo celular, na apoptose, na iniciação e na propagação tumoral e na transformação maligna em vários tipos de cânceres. Assim, o envolvimento de *MELK* na biologia tumoral torna-o um interessante alvo terapêutico para estudo no CaP metastático resistente à castração. Com isso, o objetivo deste trabalho foi observar os efeitos do silenciamento de *MELK* na radioresistência de células tumorais prostáticas metastáticas DU145, especialmente sobre a viabilidade celular e clonogenicidade. Para isso, células DU145 foram cultivadas e tratadas com siRNA-*MELK*. Em seguida, as células foram re-plaqueadas e expostas à radiação ionizante (RI) (2, 4 e 6 Gy). O efeito da radioterapia sobre a viabilidade das células com *MELK* silenciada foram avaliados por marcação com MTT, enquanto a capacidade proliferativa foi avaliada por ensaio clonogênico - as colônias foram fixadas, coradas e contadas em estereomicroscópio. A viabilidade das células com *MELK* silenciada teve uma redução significativa em todas as doses de RI, quando comparadas às células não silenciadas. No ensaio clonogênico, o número de colônias formadas também foi reduzido, obtendo redução de até 95% no grupo silenciado irradiado com a dose de 6 Gy, comparado ao controle. Portanto, células tumorais prostáticas DU145, quando possuem a *MELK* silenciadas, tornam-se mais sensíveis à radioterapia e o grau de confluência celular interfere neste fenômeno.

Palavras-chave: Câncer de Próstata; Radioterapia; Silenciamento Gênico; *MELK*; Radiossensibilidade.

ABSTRACT

Prostate cancer (PC) is the second type that most kills men when the cause is cancer. Today, there are treatments for the most diverse types of PC, including surgery, radiotherapy, immunotherapy, chemotherapy, and antiandrogenic therapies. However, in most cases of the advanced stage of the disease, the treatments only prolong the patients' life, without curing them. In this way, new therapeutic strategies that can provide efficient treatments for primary and "*de novo*" PC are needed. In a recent work, a high gene expression of maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) was observed in tumors of mice and patients with PC. In addition, MELK has been described by having an important role in cell cycle proliferation and regulation, apoptosis, tumor initiation and spread and malignant transformation in various types of cancers. So, the involvement of MELK in tumor biology makes it an interesting therapeutic target for study in castration-resistant metastatic PC. Thus, the aim of this work was to observe the effects of MELK silencing on the radioresistance of DU145 metastatic prostate tumor cells, especially on cell viability and clonogenicity. For this, DU145 cells were cultured and treated with siRNA-MELK. Then, the cells were re-plated and exposed to ionizing radiation (IR) (2, 4 and 6Gy). The effect of radiotherapy on the viability of the cells with silenced MELK was analyzed by MTT assay, while the proliferative capacity was assessed by the clonogenic assay - the colonies were fixed, stained and counted in a stereomicroscope. The viability of the cells with silenced MELK had a significant reduction in all doses of IR, when compared to the non-silenced cells. In the clonogenic assay, the colony numbers were also decreased, with a reduction up to 95% in the silenced group irradiated with the dose of 6Gy, compared to the control. In conclusion, DU145 prostate tumor cells with MELK knockdown become more sensitive to radiotherapy and cell confluence status takes place in this phenomenon.

Keywords: Prostate Cancer; Radiotherapy; Gene Silence; MELK; Radiosensitivity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaP	Câncer de Próstata
MELK	Leucina Embrionária Materna Zipper Kinase
PSA	Antígeno Prostático Específico
AR	Receptor de Anrógeno
NCBI	National Center of Biotechnology Information
^{60}Co	60 Cobalto
RI	Radiação Ionizante
SFB	Soro Fetal Bovino
EP	Eficiência de Plaqueamento
FS	Fração de Sobrevida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
Câncer de Próstata	8
MELK e o Câncer de Próstata	9
Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante	10
OBJETIVOS	12
Objetivos Gerais	12
Objetivos Específicos	12
MATERIAIS E MÉTODOS	13
Cultura Celular	13
Extração de RNAs totais	13
RT-qPCR	14
Ensaio funcionais com Radiação Ionizante	14
Ensaio de viabilidade celular por MTT após irradiação ionizante	16
Ensaio de Sobrevivência Clonogênica após Irradiação Ionizante	17
Análise Estatística	17
RESULTADOS	18
Expressão gênica de MELK nas linhagens celulares de próstata	18
Padronização de silenciamento gênico de MELK na linhagem celular DU145	18
Efeitos do silenciamento de MELK na viabilidade celular após a exposição à radiação ionizante	19
Efeitos do silenciamento de MELK na capacidade clonogênica após exposição à radiação ionizante	21
DISCUSSÃO	24
CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

INTRODUÇÃO

Câncer de Próstata

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 9,9 milhões de mortes em 2020. Quando se trata de novos casos, as estimativas são de 18,1 milhões no ano de 2020 (HYUNA, S. *et al.*, 2021). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2020) estima 625 mil novos casos de câncer, para cada ano do triênio 2020-2022. O câncer de próstata (CaP) é o segundo tipo de câncer mais comum em homens, sendo a segunda causa de mortes por câncer em homens, com uma projeção de 1,7 milhão de novos diagnósticos até o ano de 2030. De acordo com o INCA, a estimativa para o mesmo triênio 2020 a 2022 é de 65.840 novos casos de CaP a cada ano (INCA, 2020).

Em parte, o aumento na incidência do CaP na população mundial pode ser reflexo do aumento da expectativa de vida e de diagnósticos precoces devido as melhorias no sistema de informação de saúde e das práticas de rastreamento. A técnica mais utilizada para o rastreamento e monitoramento do CaP é a medição da concentração sérica do Antígeno Prostático Específico (PSA – do inglês *prostate-specific antigen*), uma serina protease produzida pelas células epiteliais prostáticas. Apesar do avanço nos métodos de detecção não invasivos, o surgimento e progressão entre o CaP pré-clínico até a doença clínica é bastante lenta e silenciosa, os sinais clínicos geralmente não surgem antes dos 50 anos de idade, o que dificulta sua detecção precoce (LILJA *et al.*, 2008)

Andrógenos circulantes são essenciais no desenvolvimento normal da próstata e no desenvolvimento inicial do CaP através de suas interações com o receptor de andrógeno (AR, do inglês *androgen receptor*), expresso na grande maioria dos casos de CaPs (HSING *et al.*, 2002). Foi demonstrado por Huggins e colaboradores na década de 40 (1941), que a remoção dos andrógenos testiculares por castração cirúrgica ou química leva à regressão do CaP (HUGGINS & HODGES, 1941). Atualmente, a prostatectomia e a terapia de privação androgênica são extremamente utilizadas no tratamento do adenocarcinoma dependente de andrógeno. Entretanto, a privação androgênica está normalmente associada com a recidiva do CaP, monitorado pela elevação dos níveis de PSA. Essa doença recorrente é denominada CaP “independente de andrógeno”. Infelizmente, os tratamentos para o CaP metastático e resistente à castração não são curativos e prolongam a vida dos pacientes, por no máximo 24 meses (CORNFORD *et al.*, 2017; NUHN *et al.*, 2019). Além deste tratamento, contamos com quimioterapia, imunoterapia e radioterapia, principalmente para CaP com metástases ósseas.

Assim, persiste a dificuldade em encontrar tratamentos para os estágios avançados do CaP que não respondem mais efetivamente aos tratamentos existentes.

Apesar dos avanços na capacidade de detecção do CaP, por meio da dosagem de PSA, em conjunto do exame de toque retal e sistema de imagens, distinguir tumores agressivos dos indolentes em pacientes com CaP a tempo e encontrar tratamentos mais efetivos para os estágios mais avançados da doença metastática, que não respondem mais à privação androgênica (CHOUDHURY *et al.*, 2012), ainda são um desafio. O estabelecimento de marcadores específicos traria um panorama mais preciso e precoce com relação ao diagnóstico da doença, estágio, prognóstico e até respostas aos tratamentos disponíveis (FERREIRA & ROCHA, 2010). Com isso, a identificação de proteínas associadas à progressão do CaP, em seus diversos estágios, possibilitará um melhor planejamento das estratégias terapêuticas já existentes, ou até novos tratamentos.

MELK e o Câncer de Próstata

A Leucina Embrionária Materna Zipper Quinase (MELK – do inglês *maternal embryonic leucine zipper kinase*) é uma proteína serina/treonina quinase pertencente à família snf1/AMPK, altamente conservada entre diversas espécies. Apresenta importante papel na proliferação e na regulação do ciclo celular, na apoptose, na proliferação de células-tronco e na organogênese. Além disso, MELK atua na iniciação e na propagação tumoral de diversos tipos de cânceres (GANGULY *et al.*, 2014; 2015; CHLENSKI *et al.*, 2019).

Estudos das últimas décadas apontam a relação desta proteína com a progressão de células cancerosas, mostrando que o aumento de sua expressão está associado ao desenvolvimento tumoral e a pior prognóstico de pacientes com câncer de mama, cólon, pâncreas, ovário, cérebro, próstata, carcinoma endometrial, neuroblastoma, linfoma não-Hodgkin, mieloma e leucemia (GRAY *et al.*, 2005; NAKANO *et al.*, 2008; BOLOMSKY *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; CHLENSKI *et al.*, 2019; MAES *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2020). Kuner e colaboradores (2013) demonstraram que o gene MELK está entre os genes altamente expressos no câncer de próstata de alto risco, sendo co-expresso com outras quinases e enzimas envolvidas no ciclo celular. Outros achados também sugerem que o aumento da expressão de MELK esteja envolvida na transformação maligna de células-tronco normais em células-tronco tumorais (GANGULY *et al.*, 2015).

Em um projeto anterior desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (*Processo FAPESP 13/06802-1*), a partir de dados de transcriptomas de dois modelos de camundongos

transgênicos para câncer próstata, que estão disponíveis no NCBI Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) sob o número de acesso GSE94574, encontramos o gene *MELK* com alta expressão nos tumores de camundongos e de pacientes com CaP com menor sobrevida e pior prognóstico. Após extensos estudos funcionais, descrevemos recentemente que *MELK* tem potencial como alvo terapêutico para o tratamento do CaP resistente à castração (JURMEISTER *et al.*, 2018). Ainda, foi observado que o silenciamento gênico de *MELK* por RNAi aumenta a radiosensibilidade de câncer de mama e de células-tronco de gliomas em ensaios *in vivo* (KIM *et al.*, 2015; SPEERS *et al.*, 2016).

Efeitos Biológicos da Radiação Ionizante

A Radiação Eletromagnética constitui o modo de propagação de energia para fenômenos como ondas de luz, ondas de calor, de rádio, e inclusive, os raios X e raios Gama. Essas radiações são chamadas “eletromagnéticas” por possuírem um campo elétrico e um magnético oscilantes. No entanto, como o comprimento de onda se torna muito pequeno ou a frequência se torna muito grande, o comportamento dominante das radiações eletromagnéticas só pode ser explicado considerando sua partícula ou natureza quântica. (KHAN, F.M., 2014)

Para explicar, por tanto, a interação da radiação com a matéria, como o efeito fotoelétrico e o espalhamento Compton, é preciso considerar as radiações eletromagnéticas como partículas e não como ondas, e a energia transportada por tal fóton é (KHAN, F.M., 2014):

$$E = h \cdot \nu$$

As formas mais utilizadas na medicina para fins de tratamentos e diagnóstico, são os Raios X e Raios Gama, também consideradas radiações eletromagnéticas ionizantes. A ionização é o processo pelo qual um átomo neutro adquire carga positiva ou negativa. As radiações ionizantes (RI) podem retirar elétrons dos átomos enquanto eles viajam pelo meio. Um átomo do qual o elétron foi removido é um íon positivo. Em alguns casos o elétron separado pode subsequentemente se combinar com um átomo neutro para formar um íon negativo. A combinação de um íon carregado positivamente e um íon carregado negativamente (geralmente um elétron livre) é chamado de um par iônico. (KHAN, F.M., 2014)

Por tanto, quando a RI é absorvida por um tecido biológico, uma parte da energia irá produzir danos biológicos. A energia depositada por unidade de massa do meio, é conhecida como dose absorvida, que é extremamente importante para quantificar os efeitos biológicos

gerados. Primeiramente podemos ter a colisão de um fóton com um elétron no corpo, que resulta em espalhamento de alguma radiação, e um elétron em alta velocidade. Se o fóton viajar pelo tecido, ele pode ionizar uma molécula de água, por exemplo, ou excitar um átomo, e até quebrar a interação de alguma molécula, sem contar o aquecimento do meio. E todos esses efeitos acabam gerando um dano biológico. Um exemplo, é durante a quebra da molécula de DNA, que leva a apoptose da célula (JOHNS, H. E., 1983).

A RI pode ser proveniente de uma unidade de ^{60}Co Cobalto, elemento que emite raios Gama na faixa de 1,25 MeV, utilizado para técnicas de telecobaltoterapia que fraciona a dose, dependendo de cada planejamento, com o intuito de minimizar os efeitos que podem ser causados pela RI (SCAFF, L., 2010).

Esta energia do feixe, portanto, também pode ser expressa por meio de Joules (J), e sua relação com o elétron-volt, comentado anteriormente, é:

$$1\text{ eV} = 1,6 \times 10^{-19}\text{ J}$$

Quando esta energia de 1 Joule é absorvida por 1 kg de material, temos a dose absorvida de 1 Gray (Gy).

Os efeitos causados, então, pela RI podem ser considerados determinísticos ou estocásticos. Para doses maiores que 0,5 Gy, em geral, o efeito da radiação é chamado determinístico, uma vez que resulta na morte celular (DIMENSTEIN AND HORNOS, 2001), variando de acordo com a radiosensibilidade de cada tecido. Por outro lado, os efeitos estocásticos são aqueles para baixas taxas ou tempo de exposição, resultando em um efeito somático ou hereditário, que tem uma probabilidade de ocorrer conforme o aumento da dose (OKUNO, E. 2013).

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Este trabalho tem por objetivo analisar a expressão gênica de *MELK* nas linhagens celulares prostáticas, PNT-2, LNCaP, PC-3 e DU145, bem como descrever os efeitos do silenciamento da enzima MELK com potencial terapêutico na radioresistência de células tumorais prostáticas metastáticas DU145.

Objetivos Específicos

- ✓ Analisar a expressão gênica de *MELK* nas linhagem prostática normal PNT-2 e em diversas linhagens do CaP (LNCaP, PC-3 e DU145).
- ✓ Analisar o efeito do silenciamento de *MELK* na viabilidade celular da linhagem DU145 quando exposta a radioterapia.
- ✓ Analisar o efeito do silenciamento de *MELK* na capacidade clonogênica da linhagem DU145 quando exposta a radioterapia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura Celular

As células PNT-2, LNCaP, PC-3 e DU145 utilizadas neste trabalho foram adquiridas da empresa American Type Cell Culture. As linhagens PNT-2, LNCaP e PC-3 foram mantidas em meio RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen™) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen™) a 10% e 1% de antibiótico/antimicótico (AA) (Gibco/Invitrogen™). A linhagem DU145 foi mantida em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco/Invitrogen™) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco/Invitrogen™) e 1% de antibiótico/antimicótico (AA) (Gibco/Invitrogen™). O meio foi trocado a cada 2 dias e foram realizados acompanhamentos diários das células por meio do microscópio invertido (Zeiss Axiovert®).

As células foram mantidas em garrafas (Corning™) de cultura celular de poliestireno de 25 cm² e 75cm² em uma estufa com 5% de CO₂ em atmosfera úmida a 37 °C. Ao atingir a confluência de 80% de células, ou seja, 80% da superfície da garrafa está coberta por células, elas foram submetidas à tripsina (Gibco/Invitrogen™) 0,05% e transferidas para novas garrafas de cultura ou para placas de 6 poços, para os seguintes tratamentos.

Extração de RNAs totais

Os RNAs totais de todas as células foram extraídos utilizando o kit de extração *RNeasy mini kit* (QIAGEN), que contém soluções de extração e eluição por colunas de afinidade para RNAs, permitindo extraí-los com alta qualidade e integridade e sem o uso de solventes orgânicos, tais como fenol. Seguindo as orientações do fabricante do kit para a extração de RNA total, o meio de cultura foi aspirado, as células foram lavadas com PBS 1X e então foi adicionado 600 µl de tampão de lise celular RTL *plus* (QIAGEN). As células foram raspadas da placa com o auxílio de uma espátula (*cell scraper*) e a solução de tampão de lise contendo as células em suspensão foi transferida para tubo de 1,5 ml. Essa solução foi agitada em vortex e incubada durante 10 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-protéicos.

Para a quantificação do RNA total extraído, foi utilizado o espectrofotômetro Nanovue (GE) com base na densidade óptica (OD) com a leitura em absorbância a 260 nm (específica para ácidos nucleicos). Além disso, foi determinada a razão entre as medidas espectrofotométricas à 260 e 280 nm (razão entre a quantidade de RNA e proteínas), o que nos forneceu uma estimativa da qualidade da extração.

RT-qPCR

Após quantificação, o RNA total foi reversamente transcrito utilizando 2 µg de RNAs utilizando-se o Kit High-Capacity (Life Technologies) em 20 µl de reação de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi então diluído em 1:100 com água ultra-pura e estocado a -20 °C até ser utilizado nas análises de qPCR.

Alíquotas de cDNA da amostra foram adicionadas a uma mistura de reação, contendo primers “sense” (TCCTGAGCCAAAGACTCCAG) e “anti-sense” (TCAGGCACTGGTTT CTAGCTTT) específicos para MELK, e o volume completado para 25 µl com água ultrapura. As reações foram realizadas em triplicatas no Sistema Real Time QuantStudio 12K flex (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação relativa do gene foi realizada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de acordo com o Livak & Schmittgen, (2001). Os valores obtidos para todas as amostras foram normalizados pela razão obtida entre o gene informativo e o gene de referência da proteína beta-actina.

Silenciamento da expressão gênica de MELK por siRNA

As células DU145, após estarem plaqueadas em placas de 6 poços em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de AA, passaram pelo processo de silenciamento de expressão gênica. Para isso, os próximos passos foram utilizando o Opti-MEM™ | *Reduced Serum Medium*, sem SFB, e seguindo o protocolo de transfecção das células conforme o kit *Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent* e *Silencer® Select Pre-designed siRNA* contra *MELK*, seguindo as orientações do fabricante. Controles negativos foram feitos utilizando-se *Silencer® Select Negative Control* da Invitrogen® (siRNA scramble).

Após dividir as células entre os grupos controle, lipofectamina e siRNA contra MELK, as soluções do Kit foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a solução de meio e lipofectamina foi acrescentada nas soluções de siRNA (30 pmol) e essas novas misturas ficaram mais 15 minutos em incubação. Após esse período foram distribuídas nas placas de forma a haver uma duplicata para cada grupo. As células foram incubadas em estufa durante 48 h para a transfecção e, após esse período, foram submetidas a diferentes experimentos.

Ensaio funcionais com Radiação Ionizante

As células DU145 plaqueadas foram tratadas com radiação ionizante. Os tratamentos com radiação ionizante foram realizados nas dependências do setor de Radioterapia do HCFMB/UNESP – Botucatu que possui uma unidade de telecobaltoterapia da marca

GE-CGR-MEV modelo ALCYON-II (Figura 1), usado nos procedimentos de radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HC-FMB) da UNESP. Cujas fonte de ^{60}Co do aparelho possui energia clínica de 1,25 MeV, e meia vida de 5,25 anos.

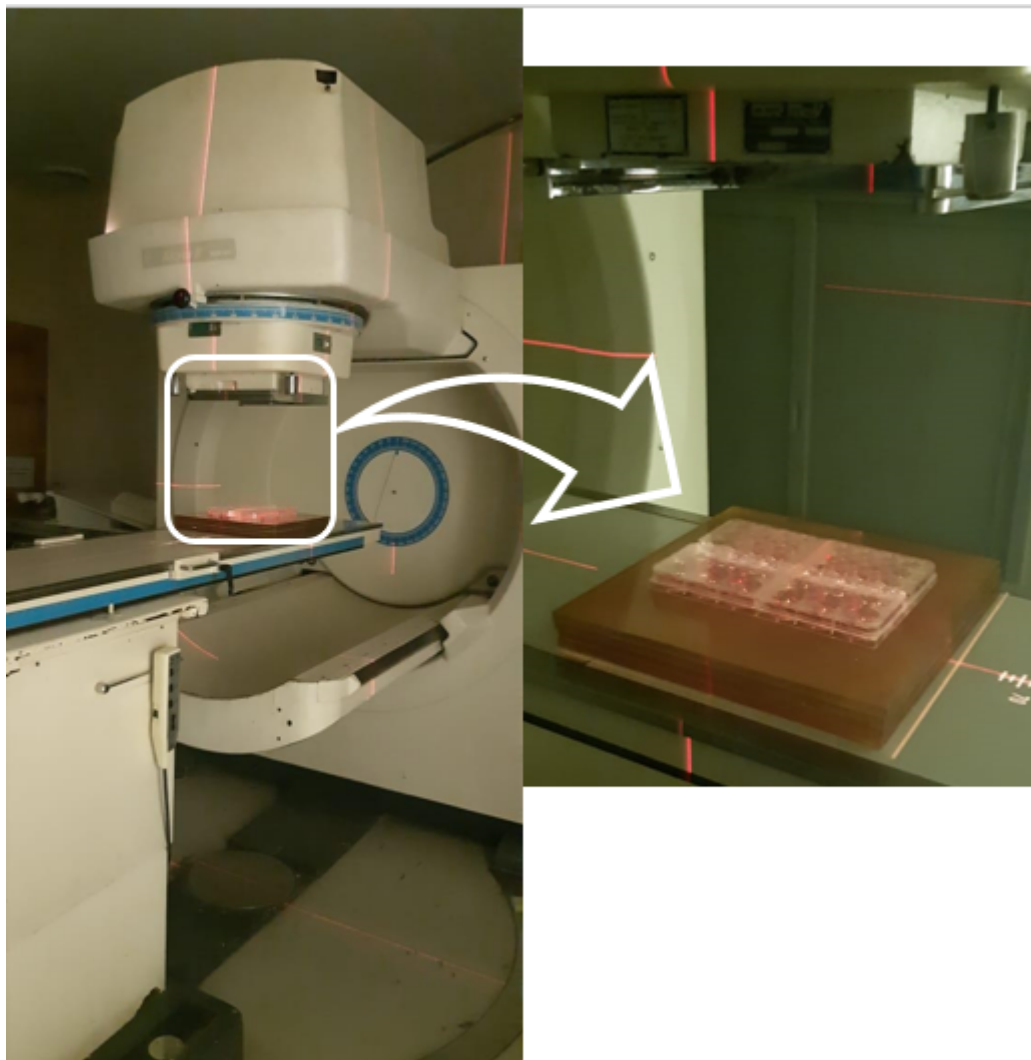


Figura 1: Imagem da distribuição das placas contendo as células DU145 posicionado no campo de radiação do aparelho de Telecobaltoterapia.

A taxa de dose do aparelho durante as irradiações era de 41,80 cGy/min. O campo de radiação aberto foi de 30,0 cm X 30,0 cm, cobrindo toda a extensão do porta amostras com margem mínima de 5,0 cm nas laterais das amostras, o que fornece um fator campo de 1,109.

O centro do porta amostras foi alinhamento com o raio central do campo de radiação. O cálculo da dose de radiação foi determinado para uma profundidade de 1,0cm, correspondente à metade da espessura da amostra (média de 2,0cm), com uma PDP (porcentagem de dose profunda) de 98,5%. A expressão usada para cálculo do tempo de exposição foi:

$$\text{Tempo de exposição (min)} = \frac{\text{Dose}}{(\text{PDP} \times \text{Rendimento} \times \text{Fator Campo})}$$

Onde a dose é a radiação liberada expressa em cGy, e Fator Campo é o fator de abertura do campo de radiação.

As exposições foram realizadas em 4 doses distintas (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy e 6 Gy) no mesmo aparelho e a escolha das doses foi baseada em artigos de radiação em células distintas. Os tempos determinados de irradiação foram 3,30 minutos, 7,97 minutos e 11,27 minutos, respectivamente.

Os parâmetros radiométricos dos feixes de radiação foram fornecidos pelo Prof. Dr. Marco Antônio Rodrigues Fernandes, docente responsável pelo serviço de radioterapia.

Ainda, as amostras foram colocadas sobre placas de 5,0 cm de acrílico, para garantir o retroespalhamento da radiação no campo de saída do feixe. Sobre as amostras foi colocada uma placa de *build'up*, de espessura de 0,5cm de acrílico, para produzir a dose máxima de radiação na região de equilíbrio eletrônico do feixe de ^{60}Co , a que ocorre à na profundidade de 0,5cm. A distância da fonte radioativa até a superfície da placa de *build'up* foi de 80,0 cm, a qual corresponde à distância de tratamento do equipamento de telecobaltoterapia utilizado para irradiação das amostras.

Para confirmação do cálculo e verificação dosimétrica, foram realizadas medidas da radiação absorvida empregando uma câmara de ionização modelo PTW – TN 30013 série 006901 e um eletrômetro marca *Sun Nuclear* modelo *PC Eletrometer*, cedidos pela empresa Nucleata Radiometria de Araçatuba.

Ensaio de viabilidade celular por MTT após irradiação ionizante

Células DU145 foram plaqueadas a uma densidade de 4×10^5 células/poço em placas de 6 poços. Após 48 h, os poços foram divididos em três grupos de tratamento: um grupo de células foi tratado com siRNA contra MELK, outro grupo foi exposto somente a lipofectamina e o terceiro grupo recebeu apenas meio de cultura, sendo que o tratamento seguiu protocolo de silenciamento, assim como o descrito no item 3.1.1 da metodologia. Após 48 h, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas, sendo replaqueadas em placa de 24 poços em densidade de 5×10^4 células/poço e mantidas em cultura por 30 h para garantir total adesão das células. Neste momento, as células foram tratadas com radiação ionizante.

Após 24 h do tratamento, o meio foi retirado e 600 µl de DMSO foi adicionado aos poços, os quais, após homogeneização, foram transferidos (3 x 200 µl) para placas de 96

poços para leitura. A microplaca foi lida com absorbância em 550 nm para determinação dos índices de viabilidade celular, que são diretamente proporcionais à intensidade colorimétrica. Este experimento foi repetido 3 vezes.

Ensaio de Sobrevivência Clonogênica após Irradiação Ionizante

O ensaio clonogênico baseia-se na capacidade de uma célula formar colônias, ou seja, grupos de mais de 50 células. Este teste serve para avaliar a capacidade reprodutiva das células após tratamentos (FRANKEN et al., 2006). Então, foram cultivadas 500 células em triplicata nas placas de 6 poços. Após o tempo de aderência, as células já submetidas as doses de radiação ionizante e incubadas em estufa a 37 °C por 10 dias, fez com que as colônias estivessem visíveis, mas não confluentes. Para a visualização das colônias, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS, fixadas com metanol por 10 minutos e coradas com solução de Giemsa 3% por 10 minutos. As colônias foram contadas com o auxílio de lupa, sendo consideradas somente aquelas com no mínimo 50 células.

A eficiência de plaqueamento (EP) dada pela razão entre o número de colônias obtidas, dividido pelo número de células plaqueadas em cada poço, multiplicado por 100.

$$EP = \frac{\text{número de colônias formadas} \times 100}{\text{número de células plaqueadas}}$$

Com o resultado da EP foi calculada a fração de sobrevivência (FS), cuja fórmula é:

$$FS = \frac{\text{número de colônias formadas após a irradiação}}{\text{número de células plaqueadas} \times EP}$$

A EP é própria para cada condição de cultura e representa a percentagem de células que têm capacidade de formar colônias. A FS é específica de cada tratamento e representa a percentagem de células que após o tratamento ainda têm a capacidade de formar colônias.

Análise Estatística

O teste realizado para o experimento foi o teste de homocedasticidade e normalidade (Kolmogorov-Smirnov) para averiguar como os dados se comportam em relação a sua distribuição, classificando-os como paramétricos ou não-paramétricos. Em seguida, para os dados com resultado paramétrico foi realizado o teste para análise de variância – ANOVA, com teste “a posteriori” de Tuckey-Kramer e com os dados não-paramétricos, o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste “a posteriori” de Dunn. As diferenças consideradas estatisticamente significativas foram de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa Prism (versão 8.4.3; Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Expressão gênica de *MELK* nas linhagens celulares de próstata

A fim de estabelecer o nível de expressão gênica de *MELK* nas três linhagens de CaP (LNCaP, PC-3 e DU145) e na linhagem de próstata normal (PNT-2), foi feita a análise a partir de qRT-PCR (Fig. 2). A referência foi a expressão de *MELK* nas células PNT-2 em comparação ao padrão de expressão das linhagens tumorais.

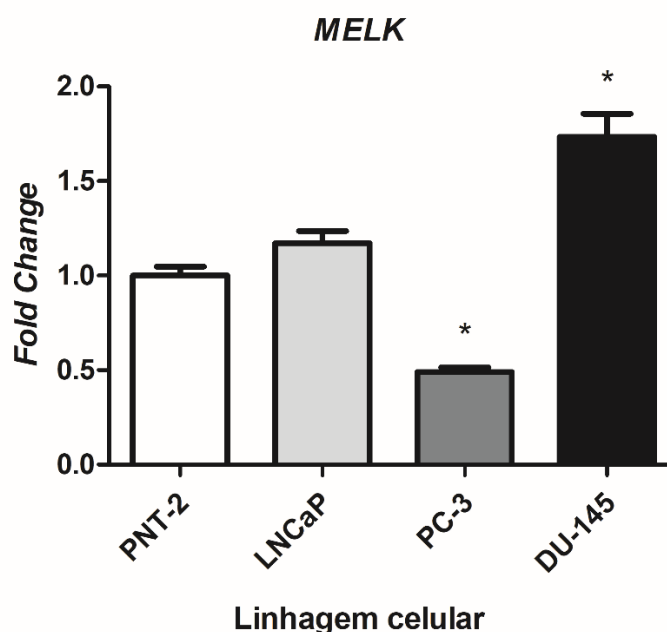


Figura 2: Perfil de expressão gênica de *MELK* em linhagens de próstata normal e CaP. Os níveis de expressão de *MELK* em condições normais de cultura celular foram avaliados por qRT-PCR, nas linhagens PNT-2 (normal), LNCaP, PC-3 e DU145 (tumorais). Valores de expressão dado em escala decimal de *fold change*. * $p < 0,05$, comparado a linhagem PNT-2.

As linhagens tumorais LNCaP e DU145 apresentaram expressão de *MELK* maior em relação a linhagem normal PNT-2, com valores de *fold change* em 1,17 e 1,73, respectivamente. Porém, esse aumento é estatisticamente significativo ($p < 0.05$) apenas nas células DU145. Já a linhagem PC-3 tem expressão gênica de *MELK* reduzida em comparação a PNT-2, com *fold change* em 0,49 ($p < 0,05$).

Padronização de silenciamento gênico de *MELK* na linhagem celular DU145

Para avaliar o papel de *MELK* na radiosensibilidade de células tumorais prostáticas, através dos ensaios funcionais descritos na metodologia, primeiro foi necessário estabelecer a concentração de iRNA-*MELK*, e o tempo de tratamento para o silenciamento de *MELK*. As

doses testadas foram de 15, 30 e 45 pmol de iRNA-*MELK*, com tempos de incubação de 24 e 48 h, conforme recomendação do *datasheet* do produto.

A redução do nível de expressão gênica de *MELK* foi mais efetivo na dose de 30 pmol, durante 48 h de tratamento (Tratamento 48 h), com 65 a 75% de silenciamento em relação ao controle lipofectamina (Lipo) na linhagem DU145 (Fig. 3). Além disso, avaliou-se a expressão de *MELK* após transcorridos 30 h do término do tratamento (Após 30h tratamento), sendo observado a manutenção do silenciamento por 78 h.

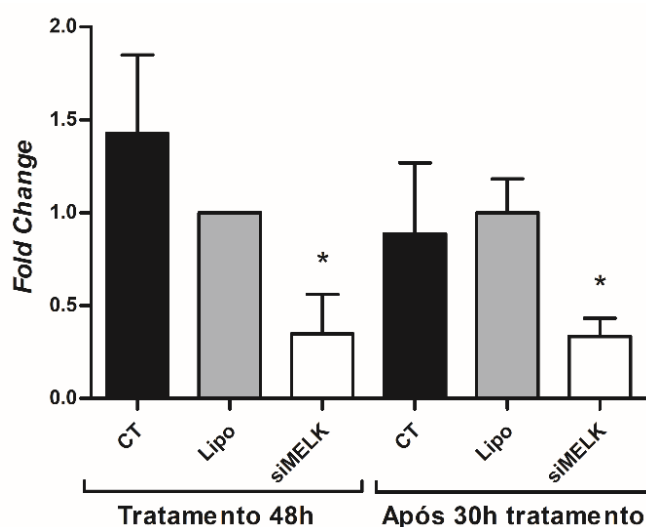


Figura 3: Expressão gênica de *MELK* após tratamento com iRNA-*MELK* nas células DU145. Os níveis de expressão de *MELK* foram quantificados, por qRT-PCR, após tratamento de 48h com siRNA-*MELK* (Tratamento 48h) e após 30h do término do tratamento (Após 30h tratamento), na linhagem tumoral DU145. Subgrupo CT: controle experimental; Subgrupo Lipo: controle tratamento; Subgrupo siMELK: tratado com siRNA-*MELK*. Valores de expressão dado em escala decimal de *fold change*. * $p < 0,05$, em relação ao controle lipofectamia (Lipo).

A permanência do silenciamento de *MELK* por pelo menos 30h após o término do tratamento (78h após o início do tratamento) foi fundamental para os ensaios funcionais, pois garantiu que as células estivessem nessa condição quando submetidas ao tratamento radioterápico. Desta forma, foi selecionado a dose de 30 pmol de iRNA-*MELK* com 48 h de tratamento para os demais testes moleculares e ensaios funcionais.

Efeitos do silenciamento de *MELK* na viabilidade celular após a exposição à radiação ionizante

O ensaio de MTT tem a capacidade de avaliar a viabilidade celular. Neste caso foi utilizado para analisar a viabilidade da linhagem DU145 após o silenciamento de *MELK*, em conjunto ao tratamento com diferentes doses de radiação ionizante. A irradiação ocorreu 30 h

após o silenciamento de *MELK* nas doses de 2, 4 e 6 Gy. Os resultados indicam que o silenciamento de *MELK* reduz a viabilidade celular e que a exposição à radiação *per si* só tem efeito significativo após 24 h na dose de 6 Gy. Entretanto, quando combinado radiação com o silenciamento de *MELK*, a viabilidade das células diminui em todas as doses de irradiação ($p < 0.05$) (Fig. 4).

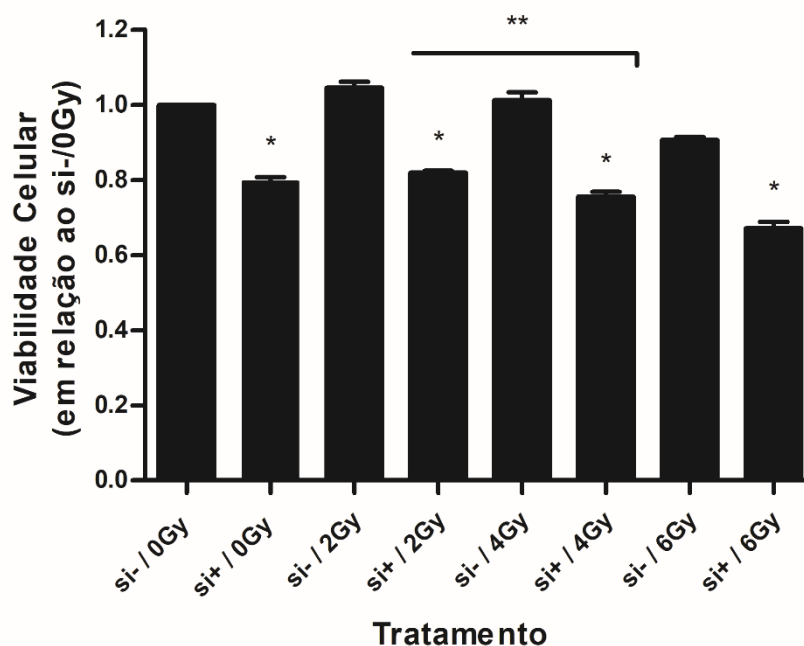


Figura 4: Viabilidade celular após exposição à radiação ionizante das células DU145 com e sem expressão gênica de *MELK*. Células DU145 foram cultivadas, tratadas com siRNA-*MELK* por 48 h, replaqueadas em alta densidade celular, expostas a radiação ionizante (0, 2, 4 e 6 Gy) e mantidas em cultura por 24 h para visualização dos efeitos terapêuticos. Células apenas com lipofectamina (si-) serviram como controle. Subgrupos com células silenciadas estão identificadas com a sigla si+. A viabilidade foi mensurada pelo método de MTT, os valores obtidos foram convertidos em escala decimal e comparados em relação ao grupo si-/0Gy. Um asterisco (*) indica diferença significativa entre cada subgrupo e o subgrupo si-/0Gy. Dois asterisco (**) indica diferença significativa entre o subgrupo si+/2 Gy e o subgrupo si+/4 Gy. * $p < 0.05$; ** $p < 0.05$

Mais detalhadamente, quando comparado os subgrupos MELK expresso/2 Gy (si-/2 Gy) e MELK expresso/4 Gy (si-/4 Gy), não há diferença significativa do aumento da dose de radiação sobre a viabilidade das células DU145, ao passo que comparando os subgrupos MELK silenciado/2 Gy (si+/2 Gy) e MELK silenciado/4 Gy (si+/4 Gy), é observado redução da viabilidade celular dessa linhagem, sendo essa redução mais acentuada ($p < 0.05$) no subgrupo MELK si+/4 Gy (0.82 e 0.75, respectivamente, em relação ao controle si-/0 Gy). Além disso, no subgrupo MELK silenciado/6 Gy (si+/6 Gy), a viabilidade celular diminuiu a 0.67, enquanto no subgrupo MELK expresso/6 Gy foi de 0.91. Desta forma, o silenciamento de MELK combinado com radiação ionizante potencializa a diminuição da viabilidade de

células DU145, sendo essa diminuição um indicativo de uma modesta, porém estaticamente significativo, radiosensibilização dessas células.

Efeitos do silenciamento de MELK na capacidade clonogênica após exposição à radiação ionizante

A partir do ensaio clonogênico, foi possível avaliar a capacidade proliferativa das células DU145 com *MELK* silenciado após exposição à radiação ionizante. A irradiação ocorreu 30 h após o silenciamento de *MELK* nas doses de 2, 4 e 6 Gy. Assim, estes testes permitiram observar o efeito da diminuição dos níveis de *MELK* em combinação com radioterapia sobre a formação de colônias celulares, como representado na figura 5.

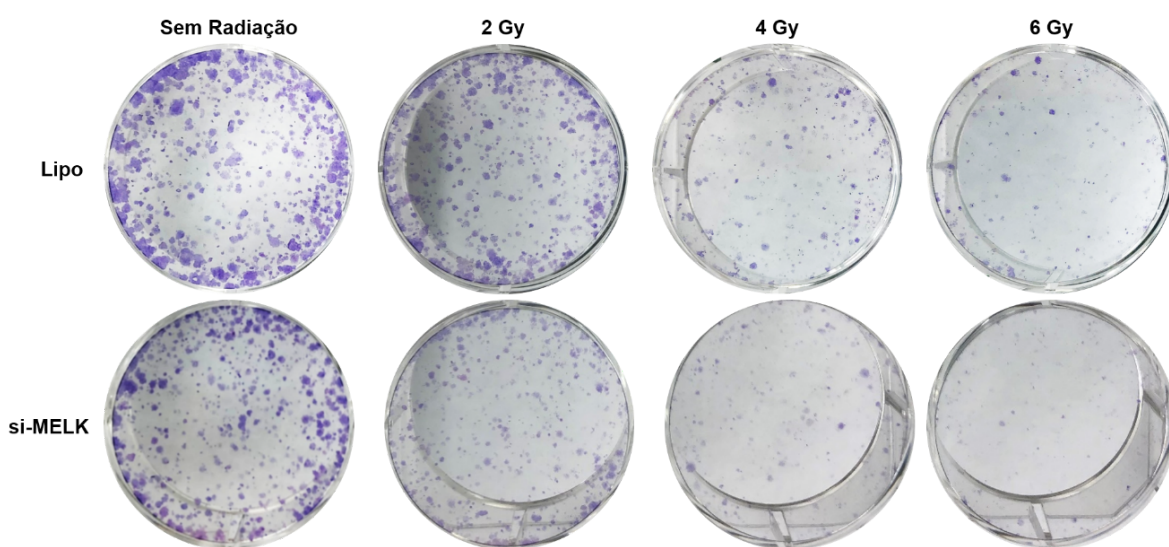


Figura 5: Imagens representativas dos poços fixados e corados, após silenciamento da MELK e exposição à radiação ionizante. Células DU145 foram cultivadas, tratadas com siRNA-*MELK* por 48 h, replaqueadas em baixa densidade celular e mantidas em cultura por 10 dias para a formação de colônias. Após esse período, as colônias foram fixadas, coradas com Giemsa e contadas. Os pontos em roxo na figura indicam as colônias formadas. Lipo: controle (não silenciado); si-MELK: tratamento com siRNA-*MELK* (silenciado). As condições de irradiação ionizante estão identificadas conforme a dose (sem irradiação, 2 Gy, 4 Gy e 6 Gy).

O número de colônias formadas foi utilizado para calcular a fração de sobrevivência (FS) específica de cada tratamento, expressa no gráfico da figura 6.

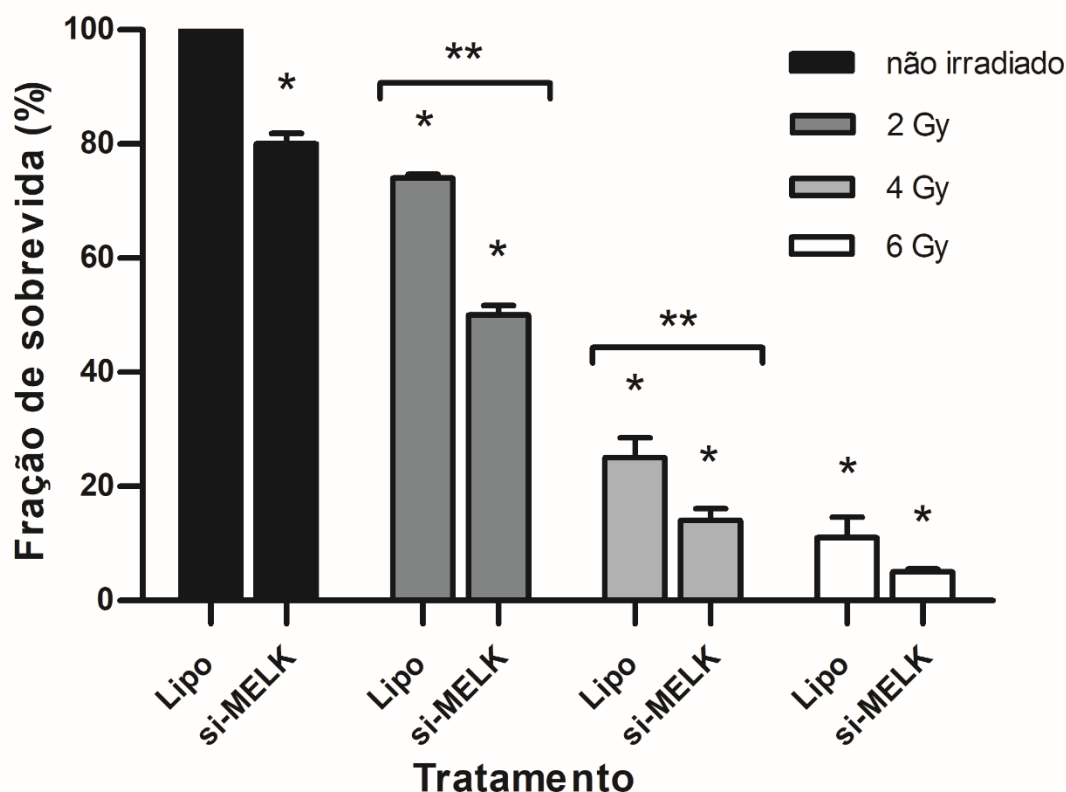


Figura 6: Relação entre a fração de sobrevivência e exposição à radiação das células DU145 controle e com silenciamento de MELK. Células DU145 foram cultivadas, tratadas com siRNA-*MELK* por 48 h, replaqueadas em baixa densidade celular e mantidas em cultura por 10 dias para a formação de colônias. Células apenas com lipofectamina (Lipo) serviram como controle. As colônias formadas foram normalizadas à eficiência de plaqueamento (FP) e a fração de sobrevivência (FS) obtida foi comparada ao controle Lipo/siMELK. Um asterisco (*) indica diferença significativa entre cada subgrupo e o subgrupo Lipo/siMELK. Dois asteriscos (**) indica diferença significativa entre controle (Lipo) e tratamento (siMELK) dentro de cada grupo irradiado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Ao comparar a FS das células silenciadas com a FS das células controle (Lipo), dentro de cada grupo de tratamento radioterápico, foi observado, em todas as doses de irradiação, menor número de colônias formadas a partir das células DU145 com *MELK* silenciada. Na dose de 2 Gy, o número de colônias no grupo siMELK foi 24% menor do que no subgrupo controle ($p < 0.05$), enquanto na dose de 4 Gy a redução foi de 11% ($p < 0.05$) e na de 6 Gy, 6%.

Ainda, avaliando cada subgrupo em comparação ao controle experimental Lipo/não irradiado, houve redução significativa ($p < 0.05$) na FS de todos os grupos irradiados, com destaque para o subgrupo siMELK/2 Gy que apresentou FS 50% menor. Já no subgrupo siMELK/6 Gy, a diminuição observada chegou a 95%, em relação ao subgrupo Lipo/não irradiado.

Os resultados obtidos até aqui, foram por meio de experimentos realizados no Instituto de Biociências de Botucatu, até março de 2020, o qual teve suas atividades suspensas devido a pandemia do COVID-19. Infelizmente, por mais que os resultados tenham sido animadores, as condições sanitárias do ambiente não foram propícias para concluir o que foi proposto no projeto. Ainda, houveram alterações com a linhagem celular utilizada, pois esta, DU145, tem maior nível de *MELK* em relação às outras que existem no laboratório, além de ser uma linhagem mais facilmente cultivada. Ainda, com todas as controvérsias, os resultados obtidos foram esperados, e serão discutidos a seguir.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram apresentados achados relevantes em relação a expressão/quantificação de *MELK* e de suas ações nas células tumorais prostáticas, como a diferente expressão gênica de *MELK* em linhagens tumorais de próstata e o fato de que as células de CaP resistente a castração e metastático ficam radiosensíveis após a inibição de *MELK*, diminuindo a capacidade tumorigênica, mas não a proliferação celular.

Inicialmente, os estudos dirigidos deste projeto tiveram como modelo quatro linhagens, uma prostática normal (PNT-2) e três tumorais prostáticas (LNCaP, PC-3, DU145), que possuem perfis moleculares distintos e são as mais utilizadas em pesquisas relacionadas ao CaP com cultura celular. As células LNCaP foram isoladas de um adenocarcinoma de próstata metastático linfonodal, e são andrógeno responsivas devido à expressão de AR. A linhagem PC-3 foi originada de um tumor prostático com metástase vertebral, cujas células não respondem a andrógeno e não expressam AR. DU145 foi isolado de tumor prostático com metástase cerebral, não possui expressão e atividade de AR, não respondendo a estímulo hormonal (SOBEL & SADAR, 2005; CUNNINGHAM & YOU, 2015). Além disso, PC-3 e DU145 expressam marcadores de diferenciação neuroendócrina, como a Cromogranina A, podendo essas linhagens serem semelhantes a tumores prostáticos neuroendócrinos, diferente de LNCaP, que mantém um perfil mais próximo de adenocarcinoma (LEIBLICH *et al.*, 2007; TAI *et al.*, 2011; CUNNINGHAM & YOU, 2015). Desta forma, LNCaP assemelha-se a CaP sensível a castração e não-metastático, enquanto PC-3 e DU145 apresentam um perfil mais próximo a CaP resistente a castração e metastático, com algumas características neuroendócrinas.

O padrão de expressão gênica de *MELK* foi avaliado nas quatro linhagens, onde DU145 apresentou o maior nível de mRNA, seguido da LNCaP, com expressão semelhante a PNT-2. Por outro lado, na PC-3 a expressão de *MELK* foi menor em relação inclusive à linhagem não tumoral, PNT-2. Porém, não existem trabalhos anteriores que avaliaram a expressão de *MELK* nas diferentes linhagens celulares de CaP. Foi realizado, portanto, uma busca na plataforma *GEO Profiles* e observamos que o perfil GDS1699/8220 apresenta expressão de *MELK* analisado por *microrray* nas três linhagens tumorais, e, diferentemente dos resultados deste trabalho, a PC-3 mostra-se com maior expressão em relação a linhagem LNCaP. Considerando tal divergência, a linhagem DU145 foi selecionada para a continuidade dos testes moleculares e funcionais com silenciamento de *MELK*, permitindo assim a observação

mais ampla dos efeitos da inibição de *MELK* e representando respostas de CaP avançado resistente a castração.

Um ponto importante para ressaltar é a relação entre o AR e a radioresistência do câncer de próstata, que foi descrita por Polkinghorn, W.R., *et al.* (2013), se dá, principalmente, por meio de uma rede de genes de reparo de DNA que interage com as vias reguladas pelo AR. Ainda, alguns dados estabelecem que a sinalização de AR aumenta a expressão de genes de reparo de DNA e, portanto, acaba promovendo a radiorresistência do câncer de próstata ao acelerar o reparo de danos ao DNA induzidos por IR.

Por meio do ensaio de viabilidade celular e ensaio clonogênico, foi observado que a inibição da expressão gênica de *MELK* tem efeito radiosensibilizante nas células DU145. Resultados similares foram encontrados em células-tronco de gliomas (KIM *et al.*, 2015), em células de câncer de mama triplo negativo *in vitro* e *in vivo* (SPEERS *et al.*, 2016) e em glioblastoma (GOUAZÉ-ANDERSSON *et al.*, 2018).

Gouazé-Andersson *et al.* (2018) também mostraram que *MELK* participa do eixo de sinalização FGFR1/FOXM1, contribuindo no mecanismo de radioresistência de células tumorais. Outro estudo que relaciona MELK e radioresistência em glioblastoma através da via MELK/FOXM1/EZH2, sendo EZH2 fator fundamental na proteção das células tumorais contra radioterapia, o que foi evidenciado pela redução da expressão de EZH2 e pela radiosensibilização tumoral após inibição de *MELK* (KIM *et al.*, 2015).

Outro ponto interessante é que, embora a viabilidade celular tenha sido reduzida com o silenciamento de *MELK*, sugere-se que a proliferação celular não é afetada e não é dependente de *MELK* na linhagem DU145, indo ao encontro de trabalhos anteriores, onde células de câncer de mama triplo-negativo *knockout* para MELK continuaram crescendo de forma semelhante às controle (LIN *et al.*, 2017; GIULIANO *et al.*, 2018). Embora a proliferação não seja afetada pela inibição de *MELK*, a capacidade das células com *MELK* silenciado se multiplicarem e formarem colônias foi reduzida, o que coincide com os achados de Wang e colaboradores (2018), que relatam a existência de uma dependência condicional das células por *MELK* na proliferação, sendo mais evidente em condições de cultura com baixa densidade de células, como ocorre no ensaio clonogênico com DU145. Desta forma, MELK tem, possivelmente, maior relevância na capacidade tumorigênica das células de CaP resistente à castração e no estabelecimento de sítios de metástase, do que na manutenção do processo proliferativo do tumor já estabelecido.

Por tanto, no âmbito da medicina de precisão, estudar os efeitos da inibição de *MELK* pode gerar um melhor embasamento para se desenvolver terapias mais efetivas para cada estágio de desenvolvimento do CaP, sendo necessário mais esforços e análises na elucidação do papel de *MELK* na biologia do câncer.

CONCLUSÃO

Os principais resultado obtido neste estudo, ou seja, a radiosensibilização das células tumorais após silenciamento de *MELK*, associados ao fato de que diversos trabalhos descreveram a relação de *MELK* com a radioresistência celular, dão suporte para a condição promissora de *MELK* como potencial alvo terapêutico, individualmente ou em combinação com inibidores para outros alvos. E, ainda, enunciam a importância de estudar os efeitos da inibição de *MELK* a fim de terapias mais efetivos para cada estágio do CaP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERRUTI, A. *et al.* Chromogranin A expression in patients with hormone naïve prostate cancer predicts the development of hormone refractory disease. *Journal of Urology*, v. 178, p. 838-843, 2007.
- BITEAU, Benoît; LABARRE, Jean; TOLEDANO, Michel B. ATP-dependent reduction of cysteine–sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, v. 425, n. 6961, p. 980-984, 2003.
- BOLOMSKY, A. *et al.* Maternal embryonic leucine zipper kinase is a novel target for proliferation-associated high-risk myeloma. *Haematologica*, v. 103, n. 2, p. 325-335, 2018.
- BUSSEMAKERS, M. J. *et al.* DD3: A new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research*, v. 59, p. 5975–5979, 1999.
- CALABRO, F.; STERNBERG, C. N. Current indications for chemotherapy in prostate cancer patients.
- CHEN, X., LAN, K., LIU, Q., YANG, X. & WANG, H. Sulfiredoxin may promote metastasis and invasion of cervical squamous cell carcinoma by epithelial–mesenchymal transition. *Tumor Biol.* 39, 101042831769594 (2017).
- CHLENSKI, A. *et al.* Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK), a Potential Therapeutic Target for Neuroblastoma. *American Association for Cancer Research*, v. 18, n. 3, p. 495, 2019.
- CHOUDHURY, A. D. *et al.* The role of genetic markers in the management of prostate cancer. *European Urology*, v. 62, p. 577-587, 2012.
- CHUNG, S.; NAKAMURA, Y. MELK inhibitor, novel molecular targeted therapeutics for human cancer stem cells. *Cell Cycle*, v. 12, p. 1655-1656, 2013.
- DAVIES, A.; ZOUBEIDI, A.; SELTH, L. A. The Epigenetic and Transcriptional Landscape of Neuroendocrine Prostate Cancer. *Endocrine-Related Cancer*, v. 27, n. 2, p. R35-R50, 2020.
- DHIR, R. *et al.* Early identification of individuals with prostate cancer in negative biopsies. *Journal of Urology*, v. 171, p. 1419–1423, 2004.
- EPSTEIN, J. I. An update of the Gleason grading system. *Journal of Urology*, v. 183, p. 433–440, 2010.

European Urology, v. 51, p. 17-26, 2007.

FERREIRA, C. G., ROCHA, J. C. *Oncologia Molecular*. 2.ed. São Paulo, Editora Atheneu. 2010.

FINDLAY, V. J., TAPIERO, H. & TOWNSEND, D. M. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Biomed Pharmacother* 59, 374–379 (2005).

GANGULY, R. *et al.* Maternal Embryonic Leucine Kinase: Key Kinase for Stem Cell Phenotype in Glioma and Other Cancers. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 13, p. 1393-1398, 2014.

GANGULY, R. *et al.* MELK- a conserved kinase: functions, signaling, cancer, and controversy. *Clinical and Translation Medicine*, v. 4, p. 11-19, 2015.

GIULIANO, C. J. *et al.* MELK expression correlates with tumor mitotic activity but is not required for cancer growth. *eLIFE*, v. 7, p. e32838, 2018.

GOUAZÉ-ANDERSSON, Valérie *et al.* FGFR1/FOXM1 pathway: a key regulator of glioblastoma stem cells radioresistance and a prognosis biomarker. *Oncotarget*, v. 9, n. 60, p. 31637, 2018.

GREENE, K. L. *et al.* Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *Journal of Urology*, v. 189, p. S2-S11, 2013.

GRIGNON, D. J. Unusual subtypes of prostate cancer. *Modern Pathology*, v. 17, p. 316–327, 2004.

HARTIKAINEN, J. M. *et al.* Genetic polymorphisms and protein expression of NRF2 and sulfiredoxin predict survival outcomes in breast cancer. *Cancer Res.* 72, 5537–5546 (2012).

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

HSING, A. W.; REICHARDT, J. K.; STANCZYK, F. Z. Hormones and prostate cancer: Current perspectives and future directions. *Prostate*, v. 52, p. 213-235, 2002.

HUGGINS, C.; HODGES, C. V. The effect of castration, of estrogens, and of androgen injection on serum phosphatase in metastatic carcinoma of prostate. *Cancer Research*, v. 1, p. 293–297, 1941.

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2020. Available at: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>. (Accessed: 10th November 2020)

JIANG, H. *et al.* Sulfiredoxin Promotes Colorectal Cancer Cell Invasion and Metastasis through a Novel Mechanism of Enhancing EGFR Signaling. *Mol. Cancer Res.* 13, 1554–1566 (2015).

JOHNS, H. E., CUNNINGHAM, J. R., *The Physics of Radiology*. 4^a Edition. Charles C. Tomas. 01 de fevereiro de 1983.

JURMEISTER, S. *et al.* Identification of potential therapeutic targets in prostate cancer through a cross-species approach. *EMBO Molecular Medicine*, v. 10, n. 3, p. e8274, 1 mar. 2018

KANSANEN, Emilia; JYRKÄNEN, Henna-Kaisa; LEVONEN, Anna-Liisa. Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 52, n. 6, p. 973-982, 2012.

KHAM, F. M., GIBBONS, J. P., *The Physics of Radiation Therapy*. 5^a Edition. Lippincott Williams & Wilkins. 01 de Janeiro de 2014.

KIM, H. *et al.* Sulfiredoxin inhibitor induces preferential death of cancer cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial damage. *Free Radic. Biol. Med.* 91, 264–274 (2016).

KIM, S. H. *et al.* EZH2 protects glioma stem cells from radiation-induced cell death in a MELK/FOXO1-dependent manner. *Stem Cell Reports*, v. 4, n. 2, p. p. 226-238, 2015

KOKUBO, H. *et al.* Immunohistochemical study of chromogranin A in Stage D2 prostate cancer. *Urology*, v. 66, p. 135-140, 2005.

KOMIYA, A. *et al.* Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *International Journal of Urology*, v. 16, p. 37–44, 2009.

LAN, K. *et al.* Sulfiredoxin May Promote Cervical Cancer Metastasis via Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 917 (2017).

LEI, K., TOWNSEND, D. M. & TEW, K. D. Protein cysteine sulfinic acid reductase (sulfiredoxin) as a regulator of cell proliferation and drug response. *Oncogene* 27, 4877–4887 (2008).

- LEMAN, E. S. *et al.*. Analysis of a serum test for prostate cancer that detects a second epitope of EPCA-2. *Prostate*, v. 69, p. 1188-1194, 2009.
- LILJA H, ULMERT D, VICKERS AJ. Prostate-specific antigen and prostate cancer: Prediction, detection and monitoring. *Nat Rev Cancer* 2008, 8: 268–278.
- MAES A, MAES K, VLIMMENS P *et al.* Maternal embryonic leucine zipper kinase is a novel target for diffuse large B cell lymphoma and mantle cell lymphoma. *Blood Cancer Journal*, 9: 87, 2019.
- MAKAROV DV, LOEB S, GETZENBERG RH, PARTIN AW. Biomarkers for Prostate Cancer. *Annu Rev Med* 2009, 60: 139–151.
- MATSUDA T, KATO T, KIYOTANI K *et al.* p53-independent p21 induction by MELK inhibition. *Oncotarget* 2017, 8(35): 57938-57947.
- MELLINGER GT, GLEASON D, BAILAR J III. The histology and prognosis of prostatic cancer. *J Urol* 1967, 97: 331–337.
- MISHRA, Murli *et al.* The sulfiredoxin–peroxiredoxin (Srx–Prx) axis in cell signal transduction and cancer development. *Cancer letters*, v. 366, n. 2, p. 150-159, 2015.
- NELSON WG, De MARZO AM, ISAACS WB. Prostate cancer. *N Engl J Med* 2003, 349: 366-381.
- OKUNO, E., YOSHIMURA, E.. Física das Radiações. 1ª Edição. Editora Oficina de Textos. 1 de Janeiro de 2010.
- POLKINGHORN W.R., PARKER J.S., LEE M.X., *et al.* Androgen receptor signaling regulates DNA repair in prostate cancers. *Cancer Discov.* 2013;3(11):1245-1253. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0172
- PRENSNER JR, RUBIN MA, WEI JT, CHINNAIYAN AM. Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med.* 2012, 28: 127rv3.
- RITTMASER RS, FLESHNER NE, THOMPSON IM. Pharmacological approaches to reducing the risk of prostate cancer. *Eur Urol* 2009, 55:1064-1073.
- SAKR WA, GRIGNON DJ, CRISSMAN JD, *et al.* High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20–69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 1994, 8: 439–443.

SCAFF, L. A. M., Física na Radioterapia. 1ª Edição. São Paulo. Editora Projeto Saber. 1 de Janeiro de 1997.

SOINI, Y. *et al.* Nuclear Nrf2 expression is related to a poor survival in pancreatic adenocarcinoma. *Pathol. Res. Pract.* 210, 35–39 (2014).

SORIANO, Francesc X. *et al.* Transcriptional regulation of the AP-1 and Nrf2 target gene sulfiredoxin. *Molecules and cells*, v. 27, n. 3, p. 279-282, 2009.

SPEERS C, ZHAO SG, KOTHARI V *et al.* Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase (MELK) as a Novel Mediator and Biomarker of Radioresistance in Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(23):5864-5875, 2016.

WEI, Q. *et al.* Loss of sulfiredoxin renders mice resistant to azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 34, 1403–1410 (2013).

WEI, Qiou *et al.* Sulfiredoxin–peroxiredoxin IV axis promotes human lung cancer progression through modulation of specific phosphokinase signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 17, p. 7004-7009, 2011.

WEI, Qiou *et al.* Sulfiredoxin is an AP-1 target gene that is required for transformation and shows elevated expression in human skin malignancies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 50, p. 19738-19743, 2008.

WU, Lisha *et al.* Tumor promoter-induced sulfiredoxin is required for mouse skin tumorigenesis. *Carcinogenesis*, v. 35, n. 5, p. 1177-1184, 2014.

XU Q, GEB Q, ZHOUA Y *et al.* MELK promotes Endometrial carcinoma progression via activating mTOR signaling pathway. *EBioMedicine*, 51: 102609, 2020.

YUAN, TC, LIN FF, VEERAMANI S, CHEN SJ, EARP HS 3rd, Lin MF. ErbB-2 via PYK2 upregulates the adhesive ability of androgen receptor-positive human prostate cancer cells. *Oncogene*. 2007, 26(54):7552-9.

ZHANG, Y., ZHOU, X., LI, Y. *et al.* Inhibition of maternal embryonic leucine zipper kinase with OTSSP167 displays potent anti-leukemic effects in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*, 37:5520–5533, 2018.