

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”



Análise *in silico* de potenciais biomarcadores de eficácia radioterápica nos diferentes estágios do câncer de próstata

Samara Cristina da Silva Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella
Docente do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Setor de Morfologia

**Botucatu
2023**

Samara Cristina da Silva Pereira

**Análise *in silico* de potenciais biomarcadores de
eficácia radioterápica nos diferentes estágios do
câncer de próstata**

*Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Bacharel
em Física Médica.*

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Botucatu
2023

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

Pereira, Samara Cristina da Silva.

Análise in silico de potenciais biomarcadores de
eficácia radioterápica nos diferentes estágios do câncer
de próstata / Samara Cristina da Silva Pereira. -
Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física
Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Flávia Karina Delella
Capes: 10303030

1. Próstata - Câncer. 2. Radioterapia. 3. Biologia
computacional. 4. Bioinformática. 5. Marcadores
bioquímicos.

Palavras-chave: Bioinformática ; Biomarcador; Câncer de
próstata; Radioterapia.

Samara Cristina da Silva Pereira

Análise *in silico* de potenciais biomarcadores de eficácia radioterápica nos diferentes estágios do câncer de próstata

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Física Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Comissão examinadora



_ Profa. Dra. Flávia Karina Delella

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Profa. Dra. Letícia Diniz Vieira

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”



Profa. Dra. Patrícia Villela e Silva

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, 16 de Janeiro de 2023

Agradecimentos

Agradeço à orientadora Profa. Dra. Flávia Karina Delella pela oportunidade de concluir este trabalho, me apoiar antes mesmo da graduação e agora no final deste ciclo tão importante em minha vida acadêmica.

Ao mestrando Gabriel Henrique Caxali por toda paciência e dedicação ao meu trabalho, mesmo em momentos difíceis em que achamos que nada iria dar certo, ele se dedicou e conseguiu encontrar uma saída.

Sou imensamente grata a minha família, por todo apoio emocional e financeiro até chegar aqui, meus pais Fernando e Cleonice que sempre estiveram ao meu lado me ajudando com amor, incentivo e apoio incondicional.

A minha irmã Jéssica e meu cunhado Alexandro que sempre me desafiaram a ser uma boa profissional e me deram o maior presente, minha sobrinha Sophia.

Ao meu namorado Thiago que esteve ao meu lado me apoiando e compartilhando os inúmeros momentos de ansiedade e estresse, sem me deixar desistir e sempre acreditando em meu potencial. Agradeço também a todas as pessoas do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional - Setor de Morfologia que de maneira direta ou indireta contribuíram para que fosse possível finalizar este estudo.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os professores por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Resumo

O câncer de próstata (CaP) é o tipo mais comum de câncer entre a população masculina, refletindo as taxas de incidência em todo o mundo, representando 29% dos diagnósticos da doença no Brasil, ficando atrás apenas do câncer de pulmão. O CaP é considerado um câncer de terceira idade com 75% dos casos ocorrendo a partir dos 65 anos, mas a literatura mostra que nenhum limite de idade se aplica ao tratamento do tumor primário sendo essencial junto ao diagnóstico. Seguindo um processo de várias etapas, iniciando como neoplasia intraepitelial prostática (PIN), seguido pelo CaP localizado e em seguida adenocarcinoma de próstata avançado com lesão local, culminando em CaP metastático. O aumento da incidência pode ser justificado pela evolução diagnóstica, melhoria na qualidade das informações e tratamentos disponíveis como a radioterapia, embora o tratamento atual e preventivo para esta doença seja um tabu para a população masculina, fazendo com que se torne um câncer de diagnóstico tardio. Por este motivo, destaca-se a importância de estudos como este, que visam a detecção de genes possíveis biomarcadores desse tipo tumoral, principalmente em relação ao avanço da doença, analisando processos e vias responsáveis pela progressão tumoral, resistência a terapias e outros fatores importantes para a contenção da doença. Plataformas, banco de dados e ferramentas online vêm sendo cada vez mais utilizados para a descoberta e ampliação de biomarcadores tumorais, se tornando uma forma de explorar e aperfeiçoar tratamentos e prognósticos da doença. Assim, este estudo identificou 3 potenciais genes que se repetiam em estágios distintos dos estudos apresentados, como potenciais biomarcadores, utilizando comparativos a amostras normal, tumor e aos estudos que utilizaram a radioterapia, onde tais potenciais biomarcadores obtiveram variações significativas durante tratamentos de radioterapia realizados em CaP, verificando possíveis progressões tumorais e biológicas que possam contribuir para o desenvolvimento da doença visando a metodologia adaptada ao estudo.

Palavras-chave: Câncer de próstata, bioinformática, radioterapia, diagnóstico, resistência, biomarcadores.

Abstract

Prostate cancer (PCa) is the most common type of cancer among the male population, reflecting incidence rates worldwide, representing 29% of diagnoses of the disease in Brazil, second only to lung cancer. PCa is considered a cancer of the elderly, with 75% of cases occurring after the age of 65, but the literature shows that no age limit applies to the treatment of the primary tumor, being essential for the diagnosis. Following a multi-step process, starting as prostatic intraepithelial neoplasia (PIN), followed by localized PCa and then advanced prostate adenocarcinoma with local lesion, culminating in metastatic PCa. The increase in incidence can be justified by the diagnostic evolution, improvement in the quality of information and available treatments such as radiotherapy, although the current and preventive treatment for this disease is a taboo for the male population, making it a late diagnosis cancer. . For this reason, we highlight the importance of studies like this one, which aim to detect possible biomarker genes for this tumor type, especially in relation to the progression of the disease, analyzing processes and pathways responsible for tumor progression, resistance to therapies and other important factors. for the containment of the disease. Platforms, databases and online tools have been increasingly used for the discovery and expansion of tumor biomarkers, becoming a way to explore and improve treatments and prognosis of the disease. Thus, this study identified 3 potential genes that were repeated at different stages of the studies presented, as potential biomarkers, using comparisons with normal samples, tumor and studies that used radiotherapy, where such potential biomarkers obtained significant variations during radiotherapy treatments performed in CaP, verifying possible tumor and biological progressions that may contribute to the development of the disease, aiming at the methodology adapted to the study.

Keywords: Prostate cancer, bioinformatics, radiotherapy, diagnosis, resistance, biomarkers.

Sumário

1. Introdução.....	9
1.1. Câncer de Próstata.	9
1.2. Pontuação Gleason.	9
1.3. Tratamentos indicados para o câncer de próstata.	11
1.4. Radioterapia.	12
1.5. Bioinformática.	13
1.6. Bioinformática: Diferenciações Ômicas.	14
1.7. Bioinformática: Câncer.	14
2. Justificativa e Hipótese.....	15
3. Objetivos.....	15
3.1. Objetivo Geral.	15
3.2. Objetivos Específicos.	15
4. Materiais e Métodos.....	16
4.1. Levantamento de Expressão Normal x Tumor.	16
4.2. Separação de Genes Diferencialmente Expressos relacionados a eficácia da radioterapia.	16
4.3. Construção do Volcano plot.	17
4.4. Construção do Diagrama de Venn GSE200879.	17
4.5. Construção Heatmap GSE200879.	17
4.6. Determinação de Biomarcadores.	17
4.7. Validação imunohistoquímica.	17
5. Resultados.....	18
5.1. Genes Diferencialmente Expressos nos estudos GSE200879 e GSE30521.	18
5.2. Genes Diferencialmente Expressos nos estudos GSE136975 e GSE205026.	22
5.3. Identificação dos Genes Exclusivos ou Compartilhados pelos Grupos.	24
5.4. Caracterização da Expressão de Genes Comuns a Todos os Grupos.	26
5.5. Genes Identificados.	26
5.6. Imunohistoquímica.	27
6. Discussão.....	28
7. Conclusão.....	29
8. Referências Bibliográficas.....	30

1. Introdução

1.1. Câncer de Próstata

Os tipos de câncer mais frequentes em homens são o câncer de pulmão (14,5%), próstata (13,5%), cólon e reto (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%) (SCHILITZ et al., 2019). No Brasil o câncer de próstata (CaP) é o tipo mais comum de câncer entre a população masculina, representando 29% dos diagnósticos da doença. Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) apontam para 65.840 novos casos de câncer de próstata a cada ano, entre 2020 e 2022, onde homens com mais de 55 anos, com excesso de peso e obesidade, estão mais propensos a desenvolverem a doença (INCA, 2022).

As diferenças nas taxas de incidência em todo o mundo refletem diferenças no uso de testes diagnósticos. A taxa de incidência é maior nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento. Mais do que qualquer outro tipo, o CaP é considerado um câncer da terceira idade, já que cerca de 75% dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos (INCA, 2020). Homens afro-americanos têm as maiores taxas de incidência e tipo mais agressivo de CaP em comparação a homens brancos (PRAWLA et al., 2019). A literatura mostra que nenhum limite de idade se aplica ao princípio que afirma que o tratamento do tumor primário é essencial. Um estudo recente demonstrou que homens idosos são mais propensos a ter doença de alto risco e são menos propensos a receber terapia definitiva (CHANG AJ et al., 2014).

A transformação maligna da próstata segue um processo de várias etapas, iniciando como neoplasia intraepitelial prostática (PIN), seguida pelo CaP localizado e, em seguida, adenocarcinoma de próstata avançado com invasão local, culminando em CaP metastático (SHEN; ABATE SHEN, 2010).

Os tumores da próstata são heterogêneos em termos de grau e se comportam de acordo com a composição e diferenciação celular dentro do tumor. O aumento observado nas taxas de incidência no Brasil pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos (exames), pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida (INCA, 2020).

1.2. Pontuação Gleason

Os tumores de próstata são classificados pela soma dos dois graus mais importantes presentes como um escore de Gleason (GS), que varia de 6 a 10. Os tumores de GS 6 (3 + 3) são considerados de baixo grau, enquanto GS ≥ 7 com Gleason graus 4 e 5 são de alto grau (ALDEN et al., 2018). O sistema de pontuação de Gleason foi introduzido em 1966 para a avaliação histológica da agressividade do CaP e é baseado em uma avaliação dos padrões glandulares de câncer presentes na

amostra. A pontuação é apresentada como uma soma do padrão dominante e do maior padrão minoritário presente na amostra. Gleason descreveu inicialmente 5 padrões variando de 1 a 5, sendo o padrão 5 o menos diferenciado. Em 2005, a Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) recomendou contra o uso dos padrões 1 e 2, deixando uma escala de pontuação reduzida de 6 a 10 (EPSTEINS, 2010).

O sistema de classificação de Gleason, projetado pelo Dr. Donald Gleason, é o sistema de classificação predominante para o carcinoma de próstata, que baseia-se na arquitetura glandular. O sistema de classificação define cinco padrões histológicos com diferenciação glandular decrescente. A distinção entre as pontuações de GS 6 e 7 é crítica. O carcinoma de próstata GS 7 se comporta significativamente pior do que o câncer de Gleason 6, mas melhor do que o câncer de pontuação de GS 8 a 10 (LIANG CHENG et al., 2010).

Muitos relatórios confirmam a importância do escore de Gleason na previsão do resultado com nenhum tratamento, tratamento com prostatectomia radical e radioterapia. Para pacientes que recebem terapia hormonal neoadjuvante ou adjuvante, o grau de GS é um preditor independente de falha bioquímica. Dos muitos sistemas propostos ao longo do tempo para a classificação do câncer de próstata, atualmente o mais amplamente aceito e utilizado é o sistema de GS (RAJAL, 2009).

Na graduação histológica, as células do câncer são comparadas às células prostáticas normais. Quanto mais diferentes das células normais forem as células do câncer (figura 1), mais agressivo será o tumor e mais rápida será sua disseminação. A escala de graduação do CaP (tabela 1) varia de 1 a 5, com o grau 1 sendo a forma menos agressiva (INCA, 2002).

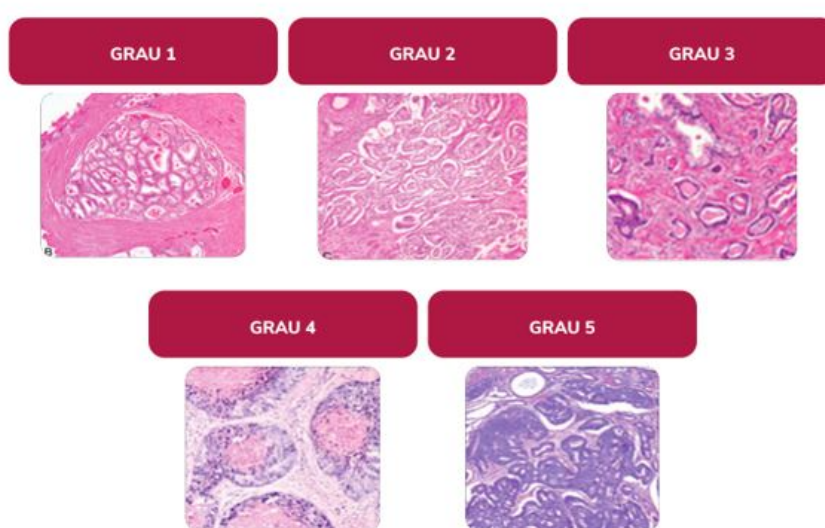


Figura 1: Bases Patológicas de Identificação: Câncer de Próstata (SANARFLIX, 2021).

Tabela 1: Resumo dos diferentes graus de Gleason e suas características.

Grau 1	Células uniformes e pequenas, formação de glândulas regulares, pouca variação de tamanho e forma, com bordas bem definidos, densamente agrupadas, distribuídas homoganeamente e com pouco estroma
Grau 2	Células variam mais em tamanho e forma, glândulas uniformes frouxamente agrupadas e com bordas irregulares
Grau 3	Células variam ainda mais em tamanho e forma, glândulas muito pequenas, uniformes, anguladas ou alongadas, individualizadas e anarquicamente espalhadas pelo estroma. Podem formar massas fusiformes ou papilíferas, com bordas lisas
Grau 4	Muitas células fusionadas em grandes massas amorfas ou formando glândulas irregulares, distribuídas anarquicamente, com infiltração irregular e invasão de tecidos adjacentes. As glândulas podem apresentar células pálidas e grandes, com padrão hipernefroide
Grau 5	Tumor anaplásico. Células agrupadas em grandes massas com invasão dos órgãos e tecidos vizinhos, podendo exibir necrose central. A diferenciação glandular pode não existir, exibindo um padrão de crescimento infiltrativo do tipo células soltas

Tabela 1: Bases Patológicas (ROBBINS; COTRAN, 2010).

A importância do grau de Gleason é evidenciada pelo uso de vários nomogramas para prever o estágio patológico e a progressão da doença após cirurgia e radioterapia. Esses nomogramas, incluindo tabelas de Partin e nomogramas de Kattan, usam o escore de Gleason da biópsia pré-operatória, extensão do tumor, estágio clínico e PSA sérico para prever o risco de extensão extraprostática, invasão da glândula seminal e metástase linfonodal e a probabilidade de recorrência da doença após o tratamento (LIANG CHENG et al., 2010).

1.3. Tratamentos indicados para o câncer de próstata

A remoção cirúrgica é considerada por muitos como o melhor tratamento, principalmente quando se observam resultados de ausência de doença e sobrevida em longo prazo. Entretanto este tratamento não é isento de complicações e algumas possíveis sequelas (SCHNEIDER, 2014).

A prostatectomia radical está associada a melhorias na qualidade de vida após CaP, sobrevida livre de metástase e necessidade de tratamentos paliativos quando comparada com a observação em vários ensaios clínicos. Além disso, a prostatectomia radical pode ter algum benefício oncológico em relação à radioterapia (SEBESTA; ANDERSON, 2018). Mesmo sendo considerada como melhor tratamento a prostatectomia radical apresenta efeitos colaterais extremamente significativos para a vida do homem.

As complicações mais frequentes pós-tratamento de CaP são a incontinência urinária variando entre 0,8 a 87% e a disfunção erétil por volta de 14 a 90%. A incontinência urinária é definida como qualquer perda de urina involuntária, sendo classificada como: incontinência urinária de esforço, incontinência urinária de urgência e incontinência urinária mista (ABRAMS et al., 2003).

O cenário terapêutico do CaP foi atualizado na última década após o surgimento de novas terapêuticas, imagem funcional avançada, sequenciamento de última geração e melhor uso das terapias existentes na doença (YUEN TEO; RATHKOPF; KANTOKK, 2019). Os tratamentos não cirúrgicos para o CaP incluem terapia de privação de andrógenos (ADT), radioterapia (RT), terapias ablativas, quimioterapia e imunoterapias emergentes. Essas abordagens podem ser usadas isoladamente ou em combinação, dependendo do cenário clínico (EVANS, 2018).

A ADT é normalmente reservada para a doença avançada e de alto risco, não passível de cirurgia curativa. A RT pode ser usada ao invés da cirurgia como terapia primária com intenção curativa para doença de baixo risco intermediário, bem como para controle de doença localmente avançada não adequada para cirurgia. As terapias ablativas podem ser usadas como terapia primária para doença de baixo risco intermediário ou como terapia de resgate para doença clinicamente localizada em que a RT falhou. A quimioterapia e as terapias imunológicas são atualmente usadas para CaP independente de andrógeno, embora as indicações para essas abordagens possam mudar à medida que novos dados de ensaios clínicos se acumulam (EVANS, 2018).

Com todos os cenários disponíveis para o tratamento do CaP podemos concluir que cada abordagem indicada apresenta vantagens e desvantagens diante do tratamento, sendo cada uma adaptada especialmente a cada caso e paciente, visando sempre o cenário clínico mais adequado.

1.4. Radioterapia

A radioterapia (RT) tem sido impulsionada pelos constantes avanços tecnológicos desde a descoberta dos raios X em 1895. A RT visa esculpir a isodose ideal no volume tumoral, poupando os tecidos normais. Os benefícios são três: cura do paciente, preservação do órgão e custo-benefício. A eficácia e a tolerância da radioterapia foram demonstradas por ensaios randomizados em diversos tipos de câncer (incluindo mama, próstata e reto) com alto nível de evidência científica (THARIAT et al., 2013).

As principais categorias de RT para tratamento do CaP são: (1) RT de intensidade modulada (IMRT) e (2) braquiterapia (BT) (TARUN et al., 2018).

A IMRT é uma evolução da RT conformada por ser capaz de modular o feixe de tratamento, oferecendo maior intensidade de dose na área de interesse e poupando áreas onde esta intensidade não é desejada. Com isto, consegue-se irradiar tumores irregulares, com faces côncavas, de morfologia complexa, que “abraçam” estruturas normais, sem causar excessiva exposição à radiação dos tecidos circunvizinhos. O objetivo é conformar a radiação ao formato mais próximo possível do volume alvo, na tentativa de proteger melhor as estruturas adjacentes (SBRT, 2013).

A IMRT permite a geração de distribuições de dose mais conformes com gradientes de dose de radiação nítidos que potencialmente facilitam a preservação de órgãos em risco aprimorados em comparação com 3D-CRT. Uma maneira conveniente de fornecer esses feixes com intensidade não

uniforme envolve o ajuste dinâmico dos colimadores multifolhas durante o tratamento (BAUMAN et al., 2012).

A braquiterapia (BT), usando implantação de semente permanente de baixa taxa de dose (LDR) ou implantação de fonte temporária de alta taxa de dose (HDR), é uma opção de tratamento aceitável para pacientes selecionados com câncer de próstata de qualquer grupo de risco (ZAORSKY et al., 2017). A BT é aplicada com a introdução de agulhas ou sementes, em um número menor de dias (de 1 a 5 dias) e pode ser empregada como tratamento único ou como reforço da radioterapia externa, em situações que também dependem do estágio da doença, da experiência do hospital e da saúde do paciente antes do diagnóstico do câncer, pois o procedimento é invasivo e exige anestesia (SBU, 2020).

Relatórios prospectivos comparando HDR-BT e LDR-BT entre si ou com outras opções de tratamento como radioterapia de feixe externo (EBRT) ou cirurgia sugerem resultados semelhantes ao mesclar os tratamentos possíveis a CaP (ZAORSKY et al., 2017).

O fornecimento de radioterapia mudou consideravelmente desde a década de 1980. Por exemplo, a integração de várias formas de radioterapia guiada por imagem (IGRT) para EBRT e braquiterapia, e entrega com IMRT para planejamento de EBRT, permitiram o escalonamento preciso da dose para melhorar resultados e reduzir a toxicidade. Além disso, modelos radiobiológicos sugeriram que as células do câncer de próstata são mais sensíveis a doses administradas em frações maiores do que em doses menores e mais frequentes; tecidos normais sofrem menos toxicidade com tais doses (FOWLER; CHAPPELL; RITTER, 2001).

Esse reconhecimento anunciou um interesse considerável e crescente no desenvolvimento clínico de abordagens de EBRT e braquiterapia de alta dose e curta duração para homens com câncer de próstata. Esses desenvolvimentos também ocorreram ao lado dos avanços tecnológicos de outras modalidades de tratamento (ZAORSKY et al., 2013).

1.5. Bioinformática

A bioinformática é a ciência que utiliza a informática, a estatística e a matemática na biologia molecular. O termo “Bioinformática” foi primeiramente usado por Pauline Hogeweg em 1979 para análises de informática em estudos de sistemas biológicos, desde então o seu principal uso tem sido nos ramos da genética e da genômica, em especial para auxiliar na organização da grande quantidade de dados gerados no sequenciamento de DNA, RNA e aminoácidos (SANTOS, 2010).

A bioinformática é a utilização de métodos computacionais, matemáticos e estatísticos para analisar dados biológicos, bioquímicos e biofísicos. Este é um campo de estudo relativamente recente, que evolui rapidamente e além disso, possui uma ampla definição devido ao vasto campo de estudo e interdisciplinaridade, dependendo da área do conhecimento ou objetivos a que se destina sua utilização (THAMPI, 2009).

Em consequência da grande quantidade de informações de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos que são produzidas atualmente, principalmente em projetos Genoma, Transcriptoma e Proteoma, o uso dos bancos de dados vem assumindo uma importância crescente na bioinformática (PEREIRA et al., 2013).

Além disso, muitas descobertas estão sendo feitas simplesmente pela análise sistematizada dessas fontes de dados, que não param de crescer tanto em volume como em complexidade e variabilidade. Um projeto típico de pesquisa pode começar com a coleção de sequências genômicas conhecidas ou não conhecidas. Para sequências não conhecidas, pode-se conduzir uma busca em bancos de dados por sequências similares ou usar algoritmos computacionais procurando prever as suas possíveis identidades e funções (BINNECK, 2004).

1.6. Bioinformática: Diferenciações Ômicas

O termo "ômicas" se aplica às áreas das ciências biológicas e das engenharias que se dedicam a analisar as interações de dados biológicos derivados de análises de genômicas, transcriptoma, proteoma, interatômica, metabolômica, epigenética comparativamente a dados do genoma, entre outras (HALL et al., 2017).

O foco principal da bioinformática visa identificar e associar os dados das diversas abordagens citadas (tais como genes, proteínas e ligantes) através de ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas, encontrando relações de interação entre os mesmos, em geral associando dados depositados em banco de dados a outros gerados em experimentos laboratoriais e de campo, proporcionando um melhor entendimento das redes e interações entre diferentes fontes de dados (BEKESIOVA et al., 2007).

As Ômicas correspondem à análise global dos sistemas biológicos, na qual, os esforços são para identificar, quantificar e caracterizar os componentes em sistemas celulares, com resolução de tempo e no espaço, a fim de dissecar as redes e consequentemente as vias intracelulares (LAGARRA; CHRISTENSEN, 2022).

No entanto, há vários desafios para a real aplicação das Ômicas, um dos problemas-chave baseia-se em desenvolver maneiras de administrar os enormes e heterogêneos conjuntos de dados. Para auxiliar neste processo de integração, a bioinformática tornou-se fundamental para analisar e compreender os dados trazidos das diferentes áreas das Ômicas (SOUZA et al., 2014).

1.7. Bioinformática: Câncer

A descoberta de biomarcadores para a detecção não invasiva de diferentes tipos de câncer contribuem para obtenção de maior eficácia terapêutica, evitando a progressão da doença para alguns pacientes. Tais moléculas atualmente podem ser detectadas com a ajuda da bioinformática clínica, área de pesquisa que ganhou bastante evidência na última década (YOUNG LU et al.,

2018). A bioinformática clínica é uma nova ciência emergente que combina informática clínica, bioinformática, informática médica, tecnologia da informação, matemática e ciência ômica. No início do século XX, os médicos clínicos precisavam estar informados e abertos aos avanços da tecnologia ômica, apesar das barreiras que existiam para aplicarem testes genéticos, como a baixa tolerância à incerteza, atitudes negativas sobre sua responsabilidade pelo aconselhamento genético e testes e falta de familiaridade com questões éticas levantadas por testes (WU; RICE; WANG, 2012).

Desde meados do século 20, a bioinformática foi sugerida para ser aplicada em toxicologia clínica e câncer sendo uma abordagem de apoio à genômica que fornece uma variedade de recursos técnicos, pode analisar DNA, RNA, proteínas, glicoligantes e metabólitos em pacientes com câncer (WANG et al., 2011). Antigamente, a avaliação de biomarcadores ou bioinformática era para atender aos requisitos de prognósticos dos pacientes ou classificar as origens do tumor na clínica. Mais recentemente, a utilidade avançada de biomarcadores de câncer ou bioinformática na previsão de respostas a drogas antitumorais foi validada e vem sendo utilizada cada vez mais dessa forma (YOUNG LU et al., 2018).

Ao longo da última década, o rápido crescimento da informação e da tecnologia nas eras "genômica" e "ômica" foi essencial para os cientistas de laboratório processarem resultados experimentais (TAO et al., 2017).

2. Justificativa e Hipótese

O CaP é o tumor mais comum entre os homens segundo estudos e, considerando a detecção tardia, onde o tumor muitas vezes se encontra em estágio avançado, a utilização de análise *in silico* para identificar possíveis biomarcadores representa uma abordagem promissora.

Diante deste cenário, a hipótese do nosso estudo foi que o tratamento com radioterapia para o CaP selecione biomarcador(es) específico(s), facilitando analisar a efetividade do tratamento.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral encontrar e identificar genes que possam servir como biomarcadores de identificação para a eficácia do tratamento utilizando a radioterapia (tratamento radioterápico) para o câncer de próstata (CaP).

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar genes diferencialmente expressos em tecido prostático tumoral com

Gleason score 6, 7, 8 +;

- Observar e relacionar os processos fundamentais de progressão tumoral com a eficácia ao tratamento radioterápico;
- Caracterizar biomarcadores de predição da eficácia do tratamento radioterápico;

4. Material e Métodos

4.1. Levantamento de Expressão Gênica Normal x Tumor

Para os dados de expressão gênica foram selecionados os estudos de Firlej et al., 2022 que contém dados de microarranjo de 137 amostras de tecido primário congelado de prostatectomia (GSE200879). Já o Agell L et al., 2012 (GSE30521), apresentou 23 amostras, sendo 18 amostras de CaP com pontuação de Gleason igual ou superiores a 6, 7, 8 ou mais e 5 amostras de próstata não neoplásica (normal), ambos coletados na plataforma GEO (*Gene Expression Omnibus*). Estes dados foram analisados através da plataforma GEO2R, utilizando a ferramenta *Limma*, onde foram considerados significativos genes com *log2 fold change* maior ou igual 1.5 e *p-value* menor que 0.05. Os dados foram normalizados através da ferramenta *vooma* também disponível na plataforma GEO2R.

Para realizar as análises separamos as amostras de acordo com o grau da agressividade tumoral seguindo a pontuação de Gleason:

Tabela 2: Quantidade de amostras por grupo analisadas no GSE200879

Tipo de Amostra	Quantidade
Normal	9 amostras
Gleason 6	20 amostras
Gleason 7	65 amostras
Gleason 8	25 amostras
Gleason 9	5 amostras
Hormônio Resistente	13 amostras

4.2. Separação de Genes Diferencialmente Expressos relacionados a eficácia da radioterapia

Para realizar a análise de comparação aos genes das amostras entradas nos bancos de dados utilizamos a ferramenta GEO (*Gene Expression Omnibus*), onde foi possível analisar dados de dois estudos disponíveis na plataforma.

O primeiro estudo Amoroso; Mills, 2021 contém dados de amostras RNA-Seq de CaP (GSE136975) que foram submetidas a uma irradiação nos intervalos de tempo em 24 horas e 72

horas, tendo dosagens distintas em cada período determinado de 2Gy, 4Gy e 8Gy (dose gradual escolhida pelos autores do estudo), com aumento gradual a esta dosagem, tendo análise de pré e pós irradiação, assim verificando o aumento das dosagens de radiação proporcionalmente ao tempo.

Já no segundo estudo Piotrowski et al., 2022 foram utilizadas amostras de microarranjo de CaP (GSE205026) distinguindo tais amostras a receber irradiação distintas com doses mínimas de 10Gy, com crescente de dose a 2Gy fracionadamente até alcançar a dose máxima estabelecida no estudo de 70Gy assim para garantir a eficácia do plano de tratamento fracionado de forma segura as doses seguindo parada crescente em 10Gy até atingir o máximo determinado com estes pequenos aumentos.

4.3. Construção do Volcano plot

Para a análise das amostras encontradas utilizou-se a plataforma *VolcanoR* (<https://huygens.science.uva.nl/VolcanoR/>) para identificar e visualizar de forma abrangente os dados de ambas as amostras encontradas em todos os estudos. Através da plataforma foram atribuídos parâmetros para *log2 fold change* e *p-value*, com filtro de dados atribuído a -1.5 e 1.5 aos dados de cada amostra inserida na plataforma de análise.

4.4. Construção do Diagrama de Venn GSE200879

Para definir os genes exclusivos de estágios do estudo Firlej et al., 2022 (GSE200879) utilizamos a ferramenta *Venn Graph* (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Foram utilizadas as listas dos genes *up* regulados em cada estágio.

4.5. Construção Heatmap GSE200879

O *Heatmap* foi construído utilizando a plataforma Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>), Starrb et al., 2014. Foram utilizados os genes *up* regulados comuns presentes em todos os estágios da doença.

4.6. Determinação de Biomarcadores

As listas dos genes *up* regulados dos estudos GSE200879 e GSE30521 foram comparadas com as listas dos genes *down* regulados dos estudos GSE136975 e GSE205026. Foram selecionados os genes que apareciam em mais de um estudo como candidatos a biomarcadores.

4.7. Validação imunohistoquímica

Os genes que representam alterações significativas foram submetidos à plataforma *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) Uhlén et al., 2015. Nesta utilizamos os bancos de dados

tissue e pathology para comparar o comportamento morfológico dos genes encontrados em imagens de imunohistoquímica online de tecidos normais e tumorais de próstata.

5. Resultados

5.1. Genes Diferencialmente Expressos nos estudos GSE200879 e GSE30521

Através da plataforma *VolcanoR*, foi possível analisar quais genes são diferencialmente expressos nas amostras dos estudos. No estudo de Firlej et al., 2022 (GSE200879), após análise foi possível identificar 16657 genes significativos nas amostras onde identificado os genes SNAI2 e EGR1 como potenciais biomarcadores:

Tabela 3: Quantidade de amostras por grupo analisadas no GSE200879

Tipo de Amostra	Quantidade
Gleason 6	3589 genes
Gleason 7	3797 genes
Gleason 8	3313 genes
Gleason 9	2123 genes
Hormônio Resistente	3835 genes

Quando confrontamos as amostras obtidas de Gleason 6, temos 66 genes significativos, sendo esses 35 expressos como *up* regulados e 31 *down* regulados.

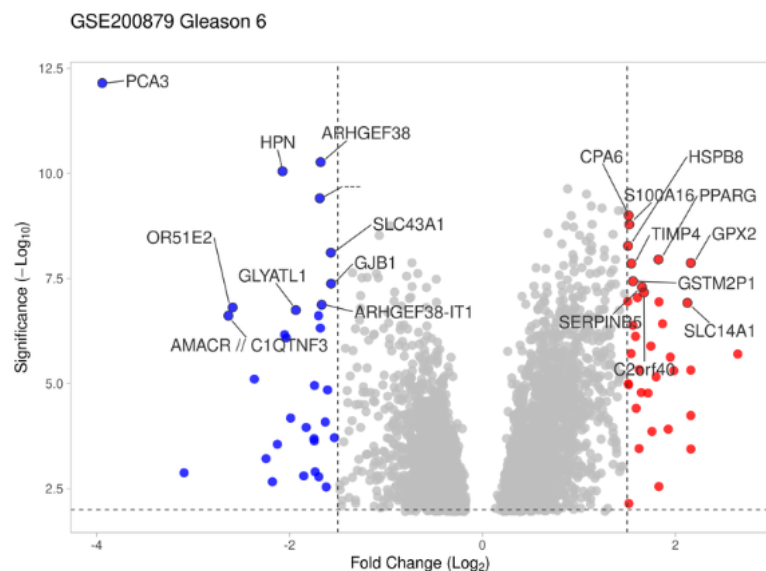


Figura 2: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras em Gleason 6 presentes no estudo

GSE200879. Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul).

Amostras obtidas de Gleason 7, temos 81 genes significativos, sendo esses 57 expressos como *up* regulados e 24 *down* regulados.

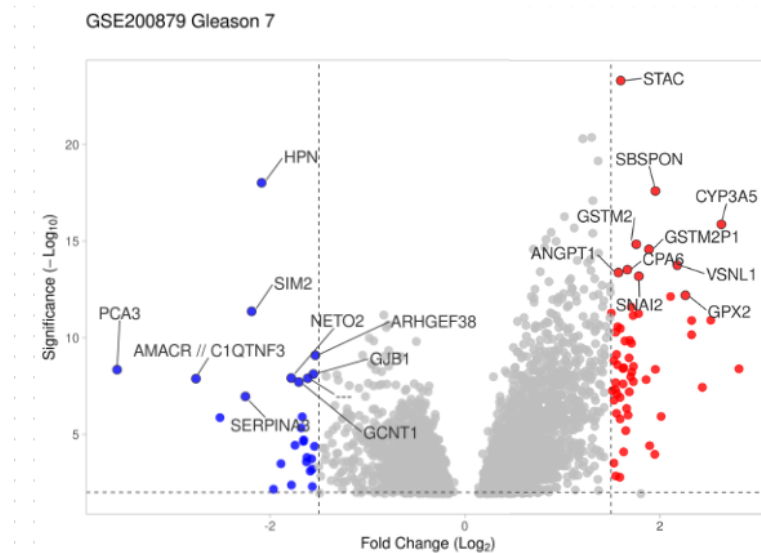


Figura 3: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras em Gleason 7 presentes no estudo GSE200879. Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul).

Amostras obtidas de Gleason 8, temos 176 genes significativos, sendo esses 137 expressos como *up* regulados e 39 *down* regulados.

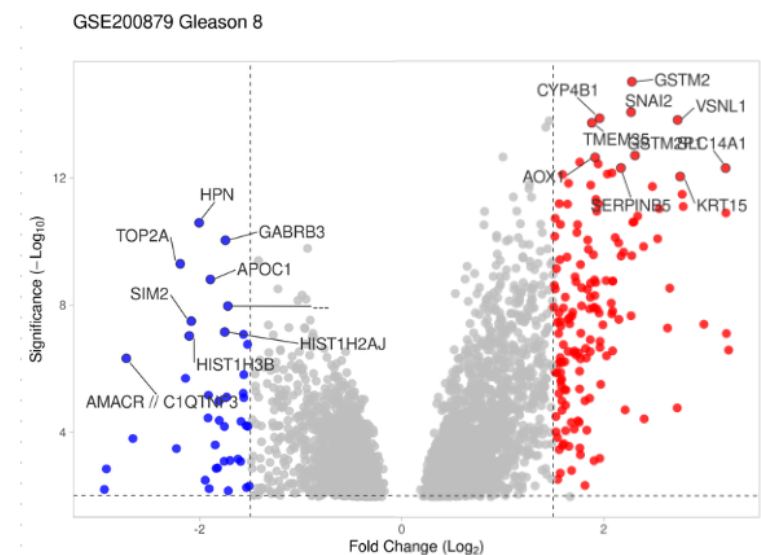


Figura 4: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras em Gleason 8 presentes no estudo

GSE200879 . Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul).

Amostras obtidas de Gleason 9, temos 254 genes significativos, sendo esses 165 expressos como *up* regulados e 89 *down* regulados.

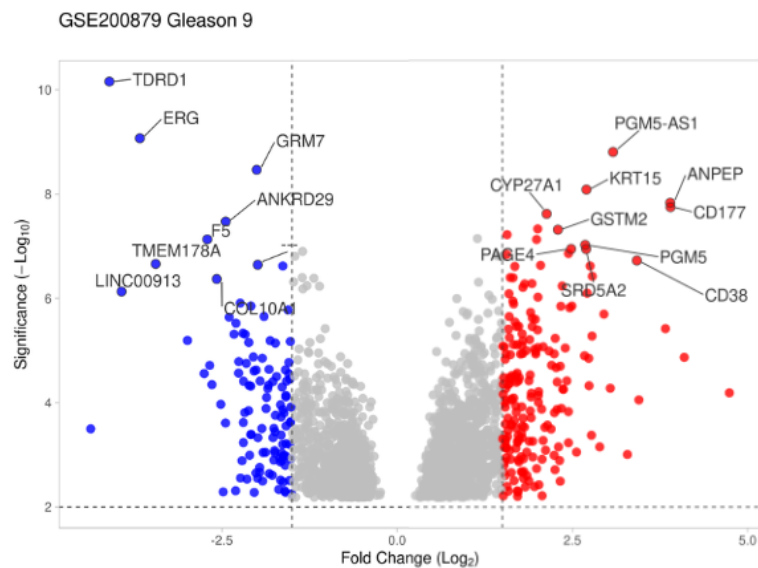


Figura 5: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras em Gleason 9 presentes no estudo GSE200879 . Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul).

Nas amostras obtidas de Hormônio Resistentes, temos 359 genes significativos, sendo esses 236 expressos como *up* regulados e 123 *down* regulados.

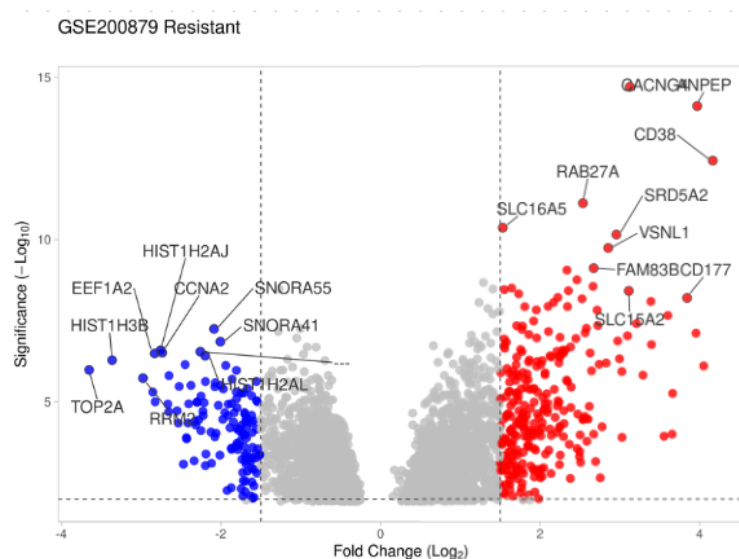


Figura 6: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras em Hormônio Resistentes presentes

no estudo GSE200879 . Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul).

No estudo Agell L et al., 2012 (GSE30521) após análise obteve-se uma lista com 3 amostras, onde em Gleason 6 obteve 6 genes significativos, sendo esses 4 expressos como *up* regulados e 2 *down* regulados.

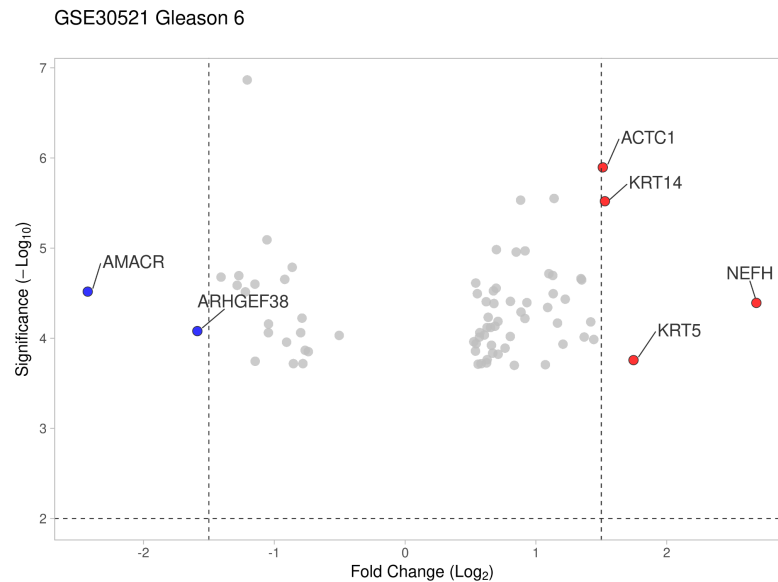


Figura 7: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras em Gleason 6 presentes no estudo GSE30521. Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul).

Amostras obtidas de Gleason 7, temos 47 genes significativos, sendo esses 34 expressos como *up* regulados e 13 *down* regulados. Neste estágio foi possível identificar os genes SNAI2 e TAGLN como potenciais biomarcadores.

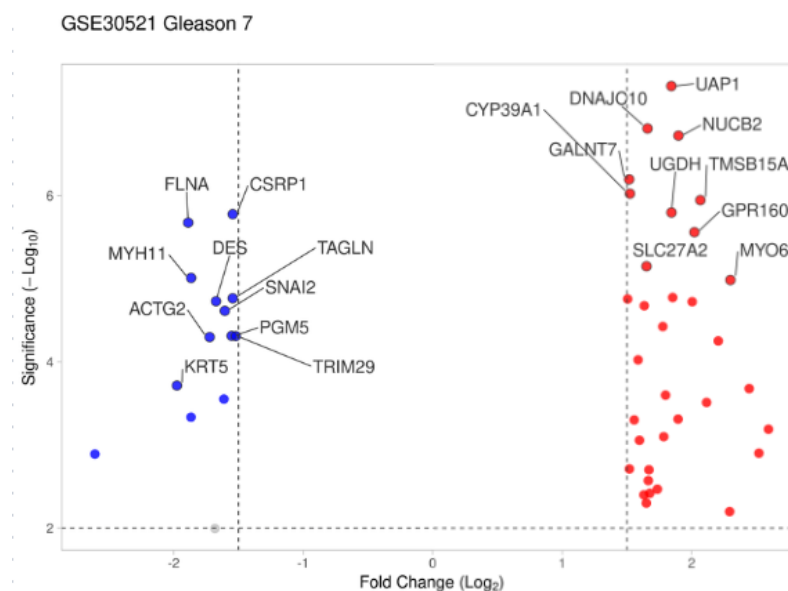


Figura 8: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras em Gleason 7 presentes no estudo GSE30521. Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul).

Amostras obtidas de Gleason 8+, temos 110 genes significativos, sendo esses 68 expressos como *up* regulados e 42 *down* regulados.

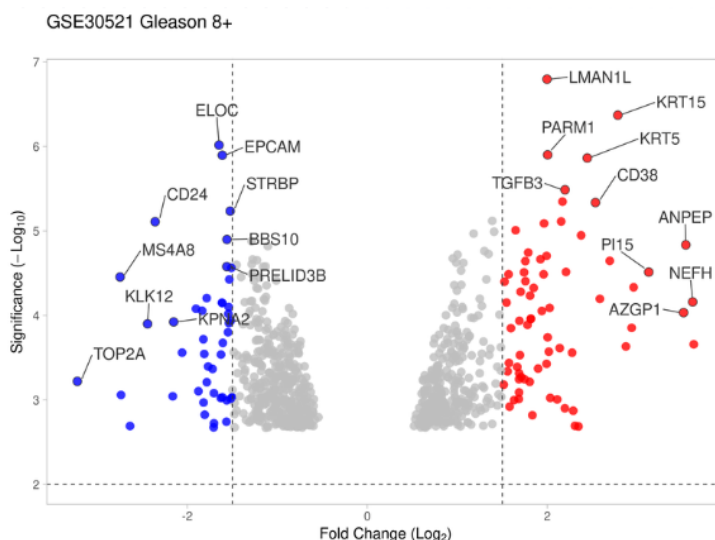


Figura 9: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras em Gleason 8+ presentes no estudo GSE30521. Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul).

5.2. Genes Diferencialmente Expressos nos estudos GSE136975 e GSE205026

Através da plataforma *VolcanoR*, foi possível analisar quais genes são diferencialmente expressos nas amostras do estudo de Amoroso; Mills, 2021 (GSE136975), foi possível identificar os genes TAGLN e EGR1 como potenciais biomarcadores. após análise foi possível identificar genes significativos nas amostras de 24 e 72 horas:

Tabela 4: Quantidade de amostras do estudo GSE136975

Estudo GSE136975		
Amostras:	<i>Up</i>	<i>Down</i>
24 horas	20	03
72 horas	1101	735

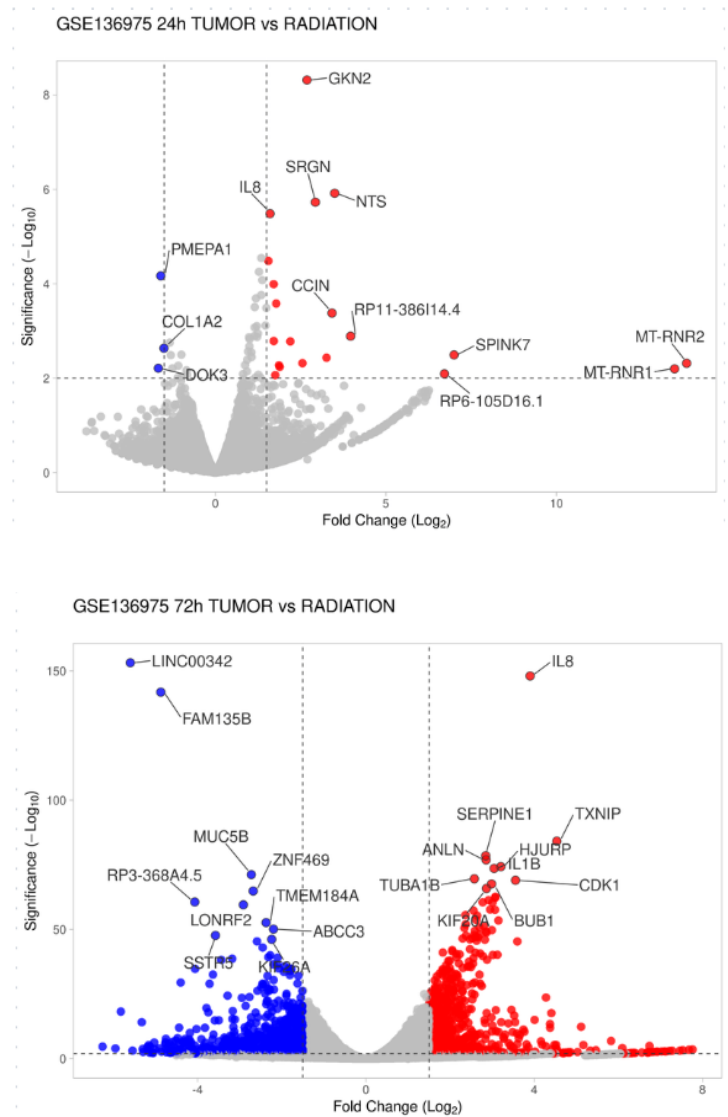


Figura 10 e 11: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras em 24 e 72 horas presentes no estudo GSE136975. Nota-se o maior número de genes *up* regulados (em vermelho) em relação ao genes *down* regulados (em azul) em ambos os gráficos.

No estudo Piotrowski et al., 2022 (GSE205026) após análise obteve-se 193 genes significativos, sendo esses 63 expressos como *up* regulados e 130 *down* regulados. Neste estudo foi possível identificar os genes SNAI2 e EGR1 como potenciais biomarcadores.

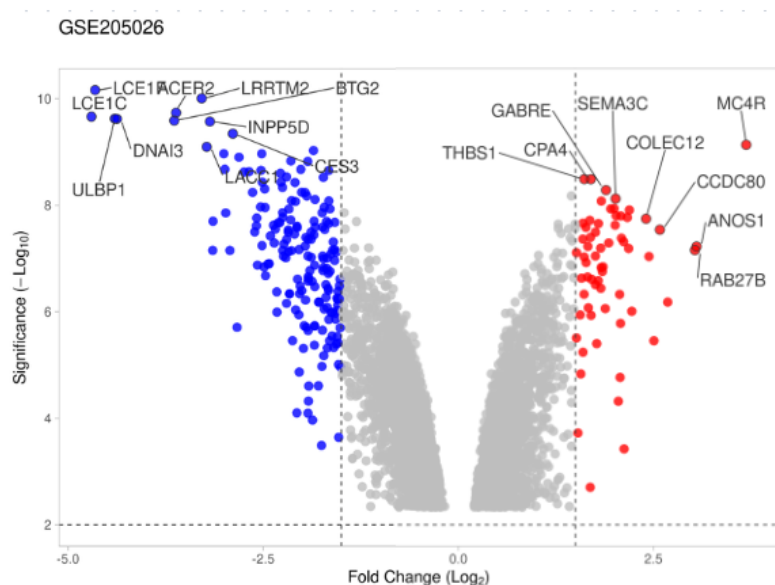


Figura 12: Gráfico volcano plot da expressão de genes significativos das amostras no estudo GSE205026. Nota-se o maior número de genes *down* regulados (em azul) em relação ao genes *up* regulados (em vermelho).

5.3. Identificação dos Genes Exclusivos ou Compartilhados pelos Grupos.

Para a identificação dos genes que são exclusivos de cada grupo ou compartilhados por mais de um grupo utilizamos a ferramenta *Venn Graph*, para obter o Diagrama de Venn. No estudo Firlej et al., 2022 (GSE200879) foi identificado relação em 22 genes comuns em todos os estágios.

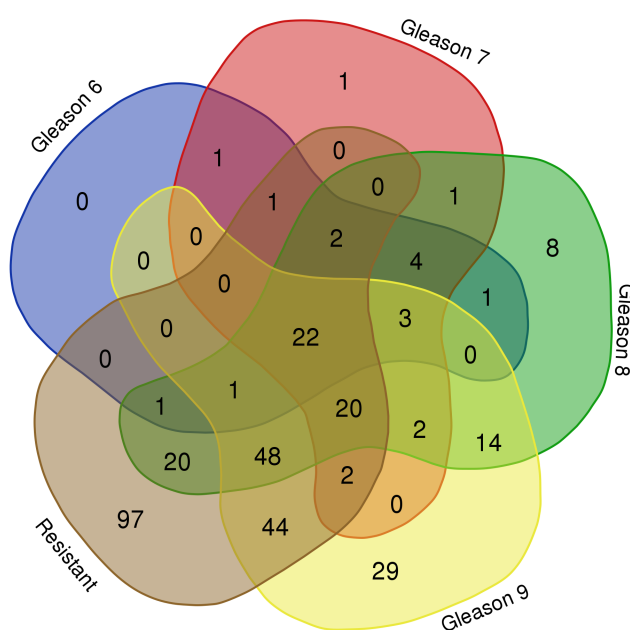


Figura 13: Diagrama de *Venn* presente com 22 genes comuns encontrados no estudo GSE200879.

Tabela 5: 22 genes comuns encontrados no estudo GSE200879.

Plataforma <i>Venn Graph</i> : 22 Genes comuns encontrados no estudo GSE200879	
C2orf40	KRT5
CXCL17	LEPREL1
CYP3A5	MASP1
DMKN	OLFM4
FAM83B	SCGB1A1
GPX2	SERPINB5
GSTM1	SLC14A1
GSTM2P1	SNAI2
HSPB8	TRIM29
KRT13	UPK1A
KRT15	VSNL1

No estudo Agell L et al., 2012 (GSE30521) foi identificado relação em 1 gene comum em todos os estágios.

**Figura 14:** Diagrama de *Venn* presente com 1 gene comum encontrado no estudo GSE30521.

5.4. Caracterização da Expressão de Genes Comuns a Todos os Grupos.

Foi utilizada a plataforma *Morpheus* (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) para obter o *Heatmap* do estudo GSE200879 onde é possível mensurar a expressão e caracterizar o comportamento dos genes.

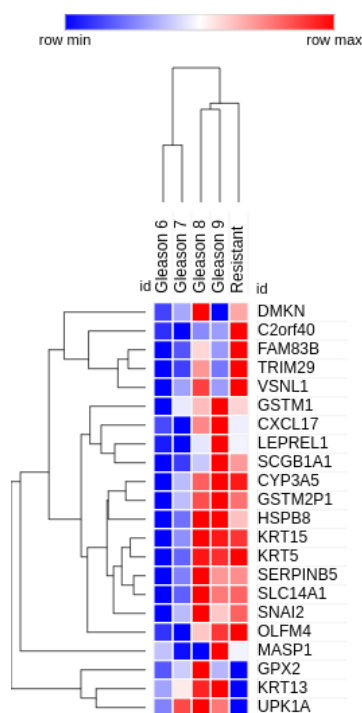


Figura 15: *Heatmap* (GSE200879).

Através do *Heatmap* foi possível perceber que os estágios de Gleason 6 e 7 são estágios com maior diferença quando comparados aos estágios de Gleason 8, 9 e Resistente. Podendo observar as proximidades que existem entre os genes e a semelhança existente entre Gleason 8, 9 e Resistente quando comparado a Gleason 6 e 7 que apresentou maior proximidade entre si.

5.5. Genes Identificados

Durante as análises realizadas em todos os estudos foram identificados seguindo o *Heatmap* e Diagrama de Venn, 3 potenciais genes que se repetiam em estágios distintos dos estudos apresentados, com comparativo a normal, tumor e aos estudos que utilizaram a radioterapia.

Tabela 6: Genes encontrados como potenciais marcadores.

SNAI2	TAGLN	EGR1
GSE200879	*	GSE200879

GSE30521	GSE30521	*
GSE136975	GSE136975	GSE136975
GSE205026	*	GSE205026

5.6. Imunohistoquímica

Realizando a análise imunohistoquímica conseguimos identificar variação morfológica presente na expressão dos genes encontrados com o *Heatmap*, tal variação morfológica pode ser vista na alteração da densidade e alteração presente no tecido tumoral.

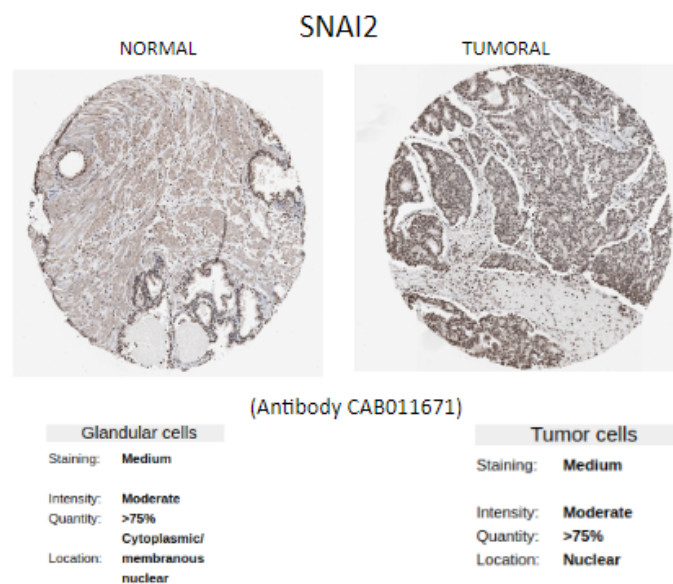


Figura 16: Imagem imunohistoquímica do gene SNAI2.

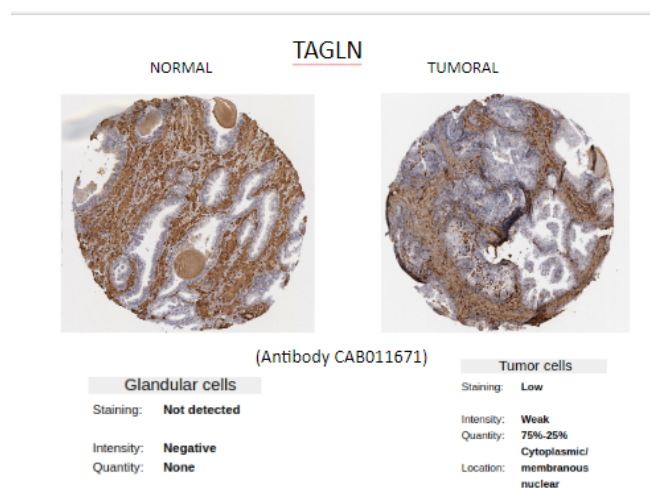


Figura 17: Imagem imunohistoquímica do gene TAGLN.

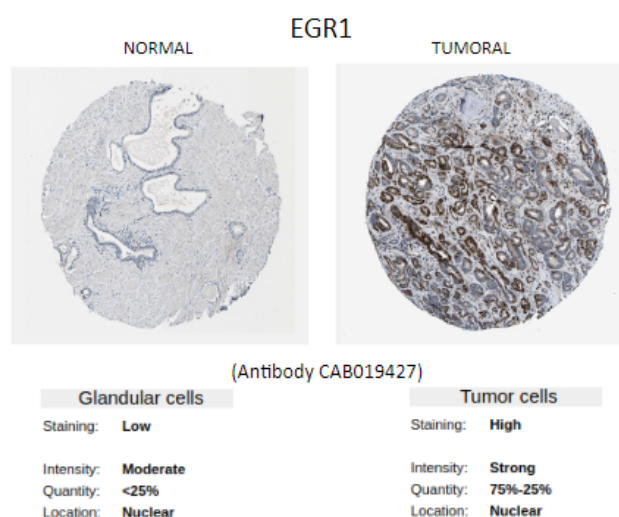


Figura 18: Imagem imunohistoquímica do gene EGR1.

6. Discussão

Durante a abordagem foi possível analisar diferentes estágios da progressão tumoral, até o tratamento radioterápico, através da integração de estudos, mostrando todas as progressões do tumor até o estágio de remissão com o tratamento da radioterapia, podendo ser visto graças a integração dos estudos. Sabe-se que a radioterapia é tão eficaz quanto o tratamento cirúrgico, onde tem se mostrado uma aliada no combate ao CaP, que se descoberto ainda na fase inicial, tem até 90% de chances de cura (FCECON, 2017). Embora as abordagens atuais de estratificação de risco usem fatores clínicos e patológicos, fica evidente que os biomarcadores podem ser usados para melhorar essas abordagens e, por conta disso, a detecção de biomarcadores vem sendo muito estudada no meio científico através de ferramentas e estudos *in silico*, pois além de serem acessíveis e de baixo custo, dispensam a realização de exames invasivos nos pacientes (HALL et al., 2017; ZHENG et al., 2020).

Através da integração de plataformas, o presente estudo identificou 3 possíveis marcadores sensíveis ao tratamento radioterápico : SNAI2, TAGLN e ERG1 .

SNAI2 promove migração e invasão celular no CaP e é um mediador crítico da atividade oncogênica, envolvido na determinação do estado das células, onde esta propriedade, por sua vez, pode condicionar a diferenciação do câncer e correlacionar-se com sua agressividade (ESPOSITO et al., 2015). A partir da nossa análise verificamos que SNAI2 está presente em todos os estudos em diferentes condições em cada estágio tumoral, tendo maior expressão em condições patológicas mais agressivas. Podemos ver na Figura 15 em escala de Gleason 8 e 9, a relação de SNAI2 com a progressão e agressividade tumoral. Após o processo de tratamento com radioterapia foi possível detectar diminuição na sua resistência e uma remissão aparente após um período de radiação e

concentração de dose presente em todos os estágios de CaP detectados nos estudos GSE136975 e GSE205026, sendo marcador para todos os estados patológicos do CaP.

O gene TAGLN sintetiza uma proteína que atua como regulador do citoesqueleto de actina que afeta a sobrevivência, migração e apoptose de várias células tumorais presentes em tumores de endométrio, esôfago, urinário, próstata de forma que está diretamente ligado ao estágio de progressão avançado no CaP, como podemos identificar no estudo GSE30521 (TSUI et al., 2019). É possível verificar a TAGLN presente em escala de Gleason 7, onde começa a ocorrer maior variação das células tumorais com irregularidades, deformidades e plasticidade celular (NCBI, 2022), além de uma maior alteração da intensidade celular podendo ser vista na imagem imunohistoquímica do gene. Logo, durante o processo de tratamento com radioterapia presente no estudo GSE136975 em amostras com intervalo de radiação a 72 horas foi possível identificar uma redução na sua expressão do gene, mostrando não ser mais presente em estágios seguintes ao processo de tratamento com a radiação.

Por fim, analisando EGR1 no CaP identificamos presente nos estágios mais avançados, sendo identificado em escala de Gleason 9+ e Hormônio resistente com maior intensidade nos estágios finais da progressão do CaP. A resposta de crescimento EGR1 é um fator de transcrição relacionado com a progressão do CaP em uma variedade de contextos, como exemplo, os níveis de EGR1 aumentam em resposta à supressão da sinalização do receptor de andrógeno sendo um gene que influencia a proliferação de células imunes a degradação (LECHEN et al., 2019). A relação do EGR1 apresentou variação em ambos os estudos que utilizaram tratamentos com radioterapia podendo ser visto nos estudos GSE136975 nas amostras que passaram por radiação com um intervalo de 72 horas e GSE205026 que passou pelo processo de radiação progressiva com aumento gradual até alcançar a dose determinada de 70Gy, podendo determinar sua redução mesmo estando presente em estágios mais avançados do CaP sendo ainda considerado uma condição de tratamento efetiva.

7. Conclusão

Concluimos assim que os genes SNAI2, TAGLN e ERG1 como candidatos a biomarcadores para atestar a efetividade exclusiva do tratamento radioterápico para CaP. O tratamento com a radioterapia, apresentou efeitos significativos e é eficiente para pacientes com CaP, dado que o mesmo diminuiu a expressão de genes relacionados com processos fundamentais da patogênese, proliferação, invasão celular, agressividade, sobrevivência e até mesmo apoptose celular. Entretanto novos estudos devem ser realizados para a validação funcional e complementação dos dados aqui fornecidos, visto que ainda é escassa a realização de pesquisas que buscam biomarcadores na área da radioterapia e genética com foco em CaP.

8. Referências Bibliográficas

FIRLEJ V; SOYEUX P; NOURIEH M; HUET E et al. Overexpression of Nucleolin and Associated Genes in Prostate Cancer. **Int J Mol Sci**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 1–15, 2022.

AGELL L; HERNÁNDEZ S; NONELL L; LORENZO M et al. A 12-gene expression signature is associated with aggressive histological in prostate cancer: SEC14L1 and TCEB1 genes are potential markers of progression. **Am J Pathol**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–10, 2012.

AMOROSO F; MILLS IG. Modulating the unfolded protein response: Impacts of radiation on the response of prostate cancer cells to ONC201. **JCI Insight**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–13, 2021.

PIOTROWSKI I; KULCENTY K; SUCHORSKA W; RUCINSKI M et al. Cellular Damage in the Target and Out-Of-Field Peripheral Organs during VMAT SBRT Prostate Radiotherapy: An In Vitro Phantom-Based Study. **Cancers (Basel)**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 1–23, 2022.

STARRUSS J; DE BACK W; BRUSCH L; DEUTSCH A. Morpheus: a user-friendly modeling environment for multiscale and multicellular systems biology. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1–2, 2014.

UHLÉN M; FAGERBERG L; HALLSTRÖM BM; LINDSKOG C; OKSVOLD P; MARDINOGLU A; SIVERTSSON Å; KAMPF C; SJÖSTEDT E; ASPLUND A; OLSSON I; EDLUND K; LUNDBERG E; NAVANI S; SZIGYARTO CA; ODEBERG J; DJUREINOVIC D; TAKANEN JO; HOBER S; ALM T; EDQVIST PH; BERLING H; TEGEL H; MULDER J; ROCKBERG J; NILSSON P; SCHWENK JM; HAMSTEN M; VON FEILITZEN K; FORSBERG M; PERSSON L; JOHANSSON F; ZWAHLEN M; VON HEIJNE G; NIELSEN J; PONTÉN F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, [s. l.], v. 23, n. 347, p. 1–26, 2015.

CÂNCER DE PRÓSTATA. *In*: **Instituto Nacional de Câncer - INCA**. , [s.l: s.n.].

RAWLA P. Epidemiology Of Prostate Cancer. **World J Oncol**, [s. l.], v. 2, n. 10, 2019. PMID: 31068988; PMCID: PMC6497009.

SHEN MM; ABATE-SHEN C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. **Genes Dev**. Sep 15;24(18):1967-2000. PMID: 20844012.

RODRIGO PESSOA; PRIYA N. WERAHERA; FERNANDO J. KIM, Prostate Cancer, *Abernathy's Surgical Secrets*, **Elsevier**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 450–451, 2018.

JONATHAN I. EPSTEIN, An Update of the Gleason Grading System, **The Journal of Urology**, [s. l.], v. 183, n. 1, p. 433-440, 2010.

LIANG CHENG; THARIAT, J; HANNOUN-LEVI JM; SUN MYINT, A. et al. PAST, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients. **Nat Rev Clin Oncol**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 52–60, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.203>>

PODDER TK; FREDMAN ET; ELLIS RJ, Advances in Radiotherapy for Prostate Cancer Treatment. **Adv Exp Med Biol**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 31-47, 2018.

PETER GORAYSKI; MARK B PINKHAM; MARGOT LEHMAN. Advances in radiotherapy technology for prostate cancer: What every GP should know. **Clinical Advances in Radiotherapy Technology**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 663–665, 2015. Disponível em:<https://www.targetingcancer.com.au/wp-content/uploads/2015/10/201509-Advances-in-radiotherapy-technology-for-prostate-cancer_-Gorayski1.pdf>

G. BAUMAN; R.B. RUMBLE; J. CHEN; A. LOBLAW; P. WARDE, Intensity-modulated Radiotherapy in the Treatment of Prostate Cancer, **Clinical Oncology**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 461-473, 2012.

ZAORSKY, N; DAVIS, B; NGUYEN. P, The evolution of brachytherapy for prostate cancer. **Nat Rev Urol**, [s. l.], v. 14, p. 415–439, 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.76>>

LAUREN ANDRING, ALISON YODER, TODD PEZZI, CHAD TANG, RACHIT KUMAR, USAMA MAHMOOD, GARY V. WALKER, PSA: Declining utilization of prostate brachytherapy, **Brachytherapy**, [s. l.], v. 21, p. 6-11, 2022.

GRAHAM D. SMITH; TOM PICKLES; JUANITA CROOK; ANDRE-GUY MARTIN; ERIC VIGNEAULT; FABIO L. CURY; JIM MORRIS; CHARLES CATTON; HIMU LUKKA; ANDREW WARNER; YING YANG; GEORGE RODRIGUES; Brachytherapy Improves Biochemical Failure–Free Survival in Low- and Intermediate-Risk Prostate Cancer Compared With Conventionally Fractionated External Beam Radiation Therapy: A Propensity Score Matched Analysis, **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, [s. l.], v. 91, p. 505-516, 2015.

ZAORSKY, N; HARRISON, A; TRABULSI, E, Evolution of advanced technologies in prostate cancer radiotherapy. **Nat Rev Urol**, [s. l.], v. 10, p. 565–579, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrurol.2013.185>>

SANTOS, LUCIANE AMORIM. Uso De Ferramentas De Bioinformática Para Estudos De Epidemiologia Molecular, Filogeografia E Filodinâmica VIRAL. **Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**: [s. n.], 2010. Disponível em:

<<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/iciet/4237/Luciane%20Amorim%20Santos%20jsessionid=node019k4l8oy37rpx1rlzf5qsewse632974.node0?sequence=1>>. Acesso em: 8 jan. 2023.

PROSDOCIMI; FRANCISCO & CERQUEIRA; GUSTAVO & BINNECK; ELISEU & SILVA; ACÁCIA & NEVES; ADRIANA & REIS; DOS & CAROLINA; ANA & JUNQUEIRA; MARTINS & CECÍLIA; ANA & FEIO DOS SANTOS; ANA & NHANI; ANTONIO & WUST; CHARLES & C. FILHO; FERNANDO & KESSEDJIAN; JAYME & PETRETSKI; JORGE & DE; RICARDO & FERREIRA; GODOI & LIMA; ROCELI & PEREIRA; RODRIGO & FOLGUERAS-FLATSCHART, **Bioinformática: manual do usuário. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 29, p. 12 - 25, 2012.

BINNECK, E, O papel da bioinformática em expansão, **As ômicas: Integrando a bioinformação**, [s. l.], p. 29-37, 2004. Disponível em:

<https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4975490/mod_resource/content/1/Estudos%20das%20%C3%B4micas.pdf>

LUCIANI DE LIZ SOUZA; SANDRO AUGUSTO RHODEN; JOÃO ALENCAR PAMPHILE. A importância das ômicas como ferramentas para o estudo da prospecção de microrganismos: Perspectivas e Desafios, **Revista UNINGÁ Review**, [s. 2.], v. 18, p. 16-21, 2014.

BÉKÉSIOVÁ B; HRASKA S; LIBANTOVÁ J; MORAVČÍKOVÁ J; MATUSÍKOVÁ I, Heavy-metal stress induced accumulation of chitinase isoforms in plants. **Mol Biol Rep**, [s. 4.], v. 35, p. 1-21, 2008. PMID: 17701287

WANG X; LIOTTA L. Clinical bioinformatics: a new emerging science. **J Clin Bioinforma**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–15, 2011. PMID: 21884620

SCHILITZ, A. O. C.; LIMA, F. C. da S. De; OLIVEIRA, J. F. P.; SANTOS, M. de O.; REBELO, M. S. **Estimativa/2020 – Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].

CHANG AJ; AUTIO KA; ROACH M; SCHER HI, High-risk prostate cancer-classification and therapy. **Nat Rev Clin Oncol**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 2-23, 2014.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (ed.). Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da próstata). **Estimativa | 2020 Incidência de Câncer no Brasil**, [s. l.], v. 11, n. 36, p. 93, 20. Disponível em:<<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidenc>

ia-de-cancer-no-brasil.pdf> Acesso em: 21 nov. 2023.

TAO Z; SHI A; LI R; WANG Y; WANG X; ZHAO J, Microarray bioinformatics in cancer- a review. **J BUON**. 2017 Jul-Aug;22(4):838-843. PMID: 29155508.

KUMAR; VINAY; ROBBINS & COTRAN, Bases Patológicas das Doenças. In: **Robbins & Cotran bases patológicas das doenças**. [s. l.], n. 1, p. 1455-1458, 2010.

LU DY; DING J; LU TR; YARLA NS; WU HY, Cancer Bioinformatics in Cancer Therapy. Adv **Proteomics Bioin-form**: [s. l.], v. 1, p.1-22, 2018.

TEO MY; RATHKOPF DE; KANTOFF P, Treatment of Advanced Prostate Cancer. **Annu Rev Med**, [s. l.], v. 1, n. 27, p. 479-499, 2019.

EVANS AJ. Treatment effects in prostate cancer. **Mod Pathol**, [s. l.], v. 31, p. 110-121, 2018.

E.SCHNEIDER, **Prostatectomia radical e suas técnicas**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://schneiderurologia.com.br/artigos/prostatectomia-radical-e-suas-tecnicas/>. Acesso em: 18 out. 2022.

SEBESTA EM; ANDERSON CB. The Surgical Management of Prostate Cancer. **Semin Oncol**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 347-357, 2017. PMID: 29580436

RAJAL B; SHAH, MD, Current Perspectives on the Gleason Grading of Prostate Cancer, **Arch Pathol Lab Med**, [s. l.], v. 11, p. .1810–1816, 2009.

ABRAMS P; CARDOZO L; FALL M; GRIFFITHS D; ROSIER P; ULMSTEN U; VAN KERREBROECK P; VICTOR A; WEIN A, Standardisation Sub-Committee of the International Continence Society. The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the **International Continence Society**. **Urology**, [s. l.], v. 61, p. 37-49, 2003. PMID: 12559262.

NOVAES PERS; MOTTA RT; LUNDGREN MSFS, Tratamento de câncer da próstata com radioterapia de intensidade modulada, **Sociedade Brasileira de Radioterapia – SBRT**, [s. l.], p. 3-21, 2013.

SABU M; THAMPI, Bioinformatics, **LBS College of Engineering**, [s. l.], p. 9-55, 2012, 2009.

WU D, RICE CM, WANG X. Cancer bioinformatics: a new approach to systems clinical medicine. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 13, n. 71, p. 1-13, 2012. PMID: 22549015

FUNDAÇÃO CENTRO DE CONTROLE DE ONCOLOGIA DO ESTADO DO AMAZONAS (FCECON), Radioterapia é considerada tão eficaz quanto cirurgia no combate ao câncer de próstata, **Governo do Estado do Amazonas**, [s.l: s.n.] 2017.

ZHENG H; ZHANG G; ZHANG L; WANG Q; LI H; HAN Y; XIE L; YAN Z; LI Y; AN Y; DONG H; ZHU W; GUO X, Comprehensive Review of Web Servers and Bioinformatics Tools for Cancer Prognosis Analysis. **Front Oncol**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 10-68, 2020.

WILLIAM A. HALL; COLLEEN A. LAWTON; ASHESH B. JANI; ALAN POLLACK; FELIX Y. FENG, Biomarkers of Outcome in Patients With Localized Prostate Cancer Treated With Radiotherapy, **Seminars in Radiation Oncology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 11-20, 2017.

ESPOSITO S; RUSSO MV; AIROLDI I; TUPONE MG; SORRENTINO C; BARBARITO G; DI MEO S; DI CARLO E, SNAI2/Slug gene is silenced in prostate cancer and regulates neuroendocrine differentiation, metastasis-suppressor and pluripotency gene expression. **Oncotarget**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 21-34, 2015. PMID: 25686823

TSUI KH; LIN YH; CHANG KS; HOU CP; CHEN PJ; FENG TH; JUANG HH, Transgelin, a p53 and PTEN-Upregulated Gene, Inhibits the Cell Proliferation and Invasion of Human Bladder Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo. **Int J Mol Sci**, [s. 7.], v. 10, n. 1, p. 1-19, 2019..

LI L; AMERI AH; WANG S; JANSSON KH; CASEY OM; YANG Q; BESHIRI ML; FANG L; LAKE RG; AGARWAL S; ALILIN AN; XU W; YIN J; KELLY K, EGR1 regulates angiogenic and osteoclastogenic factors in prostate cancer and promotes metastasis. **Oncogene**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 14, 2019. PMID: 31312026

A. LEGARRA; O.F. CHRISTENSEN, Genomic evaluation methods to include intermediate correlated features such as high-throughput or omics phenotypes, Presented as part of the Breeding and Genetics Symposium: Beyond Genetic Markers, **JDS Communications**, [s.l: s.n.] 2022.

National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), **National Center for Biotechnology Information**, [s.l: s.n.] 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>