

## **EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO GENE *PBRM1* E SUA QUALIFICAÇÃO CLÍNICA EM TUMORES DE PRÓSTATA**

**Aluna:** Sara Teixeira Soares Mota

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

**Co-Orientadora:** Dra. Lara Vecchi

**UBERLÂNDIA - MG  
2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO GENE *PBRM1* E SUA QUALIFICAÇÃO  
CLÍNICA EM TUMORES DE PRÓSTATA**

**Aluna:** Sara Teixeira Soares Mota

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

**Co-Orientadora:** Dra. Lara Vecchi

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA - MG  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M917e Mota, Sara Teixeira Soares, 1993  
2017 Expressão diferencial do gene PBRM1 e sua qualificação clínica em tumores de próstata [recurso eletrônico] / Sara Teixeira Soares Mota. - 2017.

Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo.

Coorientadora: Lara Vecchi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.800>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. 2. Próstata - Câncer. 3. Biomarcadores tumorais. 4. Cromatina. I. Araújo, Thaise Gonçalves de, (Orient.). II. Vecchi, Lara, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

---

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DO GENE *PBRM1* E SUA QUALIFICAÇÃO  
CLÍNICA EM TUMORES DE PRÓSTATA**

**ALUNA: SARA TEIXEIRA SOARES MOTA**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo (Orientador)

**Examinadores:**

Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

**Universidade Federal de Goiás**

Profa Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

**Universidade Federal de Uberlândia**

Profa. Dra. Renata Pereira Alves-Balvedi (suplente)

**Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

Profa Dra. Vivian Alonso Goulart (suplente)

**Universidade Federal de Uberlândia**

**Data da Defesa:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

Profa. Dra Thaise Gonçalves de Araújo

“Construí amigos, enfrentei derrotas, Venci obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe: Não tenho medo de vivê-la!” (Augusto Cury).

“Ter fé é assinar uma folha em branco e deixar que Deus nela escreva o que quiser”  
(Santo Agostinho).

***Muitos Dizem Que Foi Sorte,  
Eu Sempre Soube Que Foi e É Deus...***

## **AGRADECIMENTO**

*Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês (Augusto Branco).*

*Agradeço cada pessoa que de maneira direta ou indireta colaboraram para que esse sonho fosse realizado.*

Primeiramente à Deus por ser essencial em minha vida, meu guia e socorro na hora da angústia. Seu fôlego de vida em mim foi meu sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

Aos meus grandes exemplos de dedicação, carinho e amor meus pais, Maria Aparecida e Veneraldo. Vocês são minha inspiração e meu porto seguro. Obrigada por tudo que fizeram para que eu chegassem até aqui e por me darem meus maiores presentes, meus queridos irmãos Samuel, Clara e Ezequiel.

Agradeço a vocês meus irmãos por serem tão presentes na minha vida, vocês a fazem ter mais sentido.

Ao meu amor Iric por permitir estar vivendo esse lindo sonho ao seu lado.

Amo vocês!!!

À minha orientadora Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo que vem me acompanhado desde a graduação. Obrigada pela oportunidade e pela confiança, por tantos ensinamentos e pela paciência demonstrada nesta fase de conclusão! Obrigada por acreditar em mim e por participar ativamente nesse processo de minha formação acadêmica e pessoal!

À minha co-orientadora Dra. Lara Vecchi, que principalmente nessa fase final se mostrou tão eficaz e importante, que não mediu esforços para me ajudar. Obrigada por seu companheirismo, pela sua paciência, por seus ensinamentos e seu apoio. Além dos inúmeros momentos prazerosos ao longo dessa jornada.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart que além de disponibilizar o laboratório, me auxiliou com tantos ensinamentos e conselhos.

Às minhas amigas *Peppas pig* e ao meu querido George, por tantos momentos divertidos e risadas. Obrigada por sempre estarem prontos para me aconselhar e ajudar. Vocês fizeram os meus dias mais radiantes!

Obrigada a minhas grandes amigas: Bárbara, Bel, Cris e Paty. “*Amigo fiel é proteção poderosa, e quem o encontrar, terá encontrado um tesouro. Amigo fiel não tem preço, e o seu valor é incalculável. Amigo fiel é remédio que cura, e os que temem ao Senhor o encontrarão*” (*Eclo 6,14-16*).

Ao demais amigos do laboratório de Nanobiotecnologia pela aprendizagem diária e por tantos momentos agradáveis. Principalmente a Dra. Luciana Bastos pela dedicação ao laboratório.

À todas as pessoas que contribuíram do Hospital Ac Camargo, principalmente a Dra. Sthephania e a Sueli, pela ajuda com as IHC.

Ao Dr. Bruno do Hospital de Clínicas da UFU que de última hora atendeu meu pedido para as análises de IHC.

Aos órgãos de fomento: CNPq, CAPES e FAPEMIG por financiar este trabalho.

E a todos aqueles, que o pouco espaço me impede de enumera-las, que contribuíram para minha formação profissional e pessoal!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
1.1 Câncer de Próstata .....	7
1.2 O complexo SWI/SNF no câncer de próstata.....	10
1.3 O gene <i>PBRM1</i> .....	13
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo Geral: .....	16
2.2 Objetivos Específicos: .....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1 Triagem dos pacientes .....	17
3.2 Cultura celular .....	19
3.3 Extração de RNA total.....	19
3.4 Transcrição Reversa .....	19
3.5 Quantificação transcrional relativa por qPCR .....	20
3.6 Imunohistoquímica .....	21
3.7 Western blotting .....	22
3.8 Imunofluorescência .....	22
3.9 Análises Estatísticas .....	23
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

A	Adenosina
AR	Receptor nuclear de hormônio Androgênico
ARID1	Domínio 1 de interação rica em AT
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATPase	Adenosinatrifosfatas
B2M	Beta-2-microglobulina
BAF	Complexo Fator Polibromo Associado a BRG-1 ou a BRM
BAH	Domínio Bromo Adjacente
BET	Domínios extra-terminais
BRD	Bromodomínios
BRG1	Gene 1 relacionado a Brahma
BRM	Gene Brahma
BSA	Albumina de soro bovino
C	Citosina
CaP	Câncer de Próstata
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
DEMEM	Meio Dulbecco MEM
DEPC	Dietil pirocarbonato
DP	Desvio Padrão
DTT	Ditiotreitol
E-caderina	Caderina epitelial tipo 1
EGF	Fator de crescimento epidérmico
FGFR2	Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblasto 2
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	Guanina
H3K14Ac	Acetilação em resíduos de Lisina 14 da Histona 3
HMG-box	Grupo de Alta Mobilidade
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IgG	Imunoglobulina G
KCl	Cloreto de potássio
kDA	Quilodaltons

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato monopotássico
KLF6	Membro dos Fatores de Transcrição da família Kruppel
lncRNA	Ácido Ribonucléico longo não codificante
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Fosfato dissódico
NaCl	Ácido Clorídrico
p21	Inibidor de cinase dependente de Ciclina 1A
p53	Proteína Tumoral p53
pb	Pares de base
PBAF	Complexo Fator Polibromo Associado a BAF
PBRM1/BAF180	Gene Polibromo-1
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCA3	Antígeno prostático 3
PSA	Antígeno Prostático Específico
PTEN	Fosfatase e homólogo de tensão
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio produzido pelo Instituto Memorial do <i>Roswell Park</i>
RT	Transcrição Reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SWI/SNF	Tipo de acoplamento/ Sacarose não-fermentável
T	Timina
TMPRSS2-ERG	gene produto da fusão entre protease transmembranar, serina 2 (TMPRSS2) e o fator de transcrição ETS (ERG)]
TNM	Tumor-Linfonodo-Metástase
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## RESUMO

O Câncer de Próstata (CaP) é o sexto tipo de câncer mais comum e mais dominante na população masculina e a segunda maior causa de morte, após o câncer de pulmão. Diversos mecanismos encontram-se envolvidos no surgimento e progressão do CaP, sobretudo aqueles que regulam a expressão de diferentes genes. A proteína Polibromo-1 (PBMR1/BAF180) é uma das subunidades que dão especificidade ao complexo de remodelagem da cromatina SWI/SNF (PBAF) e mutações dentro dos domínios de PBRM1 são descritas em diversos tipos de cânceres. Porém, seu papel no CaP ainda não foi descrito. Por meio de qPCR avaliamos os níveis transcricionais dos domínios do gene *PBRM1* no tecido e sangue periférico de pacientes com CaP e hiperplasia prostática benigna (HPB) e em quatro linhagens celulares, incluindo uma não neoplásica (RWPE), uma hormônio responsiva (LNCaP) e duas hormônio refratárias (PC3 e DU145). Em seguida experimentos de imunohistoquímica foram realizados para avaliar o comportamento da proteína PBRM1 em pacientes com CaP. Ensaios de Western Blotting e imunoflorescência confirmaram o perfil da proteína nos compartimentos celulares. Os domínios do gene PBRM1 se apresentaram diferencialmente expressos no CaP e HPB e nas linhagens prostáticas. O BRD1 (Bromodomínio 1) foi capaz distinguir pacientes com câncer daqueles com a doença benigna, além de correlacionar com TNM. A proteína foi encontrada no núcleo, citoplasma e membrana de pacientes com CaP. Sua expressão mais elevada no núcleo foi significativamente maior quando o PSA foi  $\geq 10\text{ng/mL}$  e em pacientes com maior grau de Gleason. Nas linhagens celulares, PBRM1 também foi encontrada em diferentes compartimentos e tamanhos, sendo que na RWPE a proteína apresentou-se completa e no núcleo, em LNCaP também completa, mas no citoplasma. Já nas PC3 e DU145, foi localizada nos dois compartimentos de forma truncada. PBRM1 pode estar envolvido no desenvolvimento e progressão de tumores prostáticos, regulando diferentes eventos associados à biologia tumoral. Dado seu papel na modificação da cromatina, a definição dos mecanismos envolvidos em seu comportamento pode levar a novas estratégias de tratamento do CaP. Sendo assim, nossos resultados fornecem uma base para um estudo genético molecular biologicamente significativo e clinicamente

relevante. Vale ressaltar que não se trata apenas de um estudo visando à identificação de biomarcadores, mas, sobretudo, evidencia eventos chaves na compreensão molecular do CaP.

**Palavras-chave:** Câncer de próstata, PBRM1, expressão diferencial, AR, remodelagem da cromatina.

## ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the sixth most common and most dominant cancer in the male population and the second largest cause of death after lung cancer. Defined as heterogeneous tumor, several mechanisms are involved with its onset and progression, especially those that alter the expression of different genes. Polybromo-1 (PBRM1/BAF180) protein is one of the subunits that gives specificity to the SWI / SNF chromatin remodeling complex and mutations within the PBRM1 domains are described in several types of cancers. However, its role in PCa has not been described yet. Using qPCR we evaluated the transcriptional levels of PBRM1 domains in the peripheral blood and tissue of patients with PCa and benign prostatic hyperplasia (BPH) and also in four cell lines, including a non-neoplastic (RWPE), a hormone responsive (LNCaP) and two hormones refractory (PC3 and DU145). Subsequently immunohistochemistry experiments were performed to evaluate the behavior of PBRM1 protein in patients with PCa. Western blotting and immunofluorescence assays confirmed and validated the protein expression profile in the cell compartments. PBRM1 domains were differentially expressed in PCa and BPH and in prostatic lines. BRD1 was able to distinguish cancer patients from those with benign disease, besides correlating with TNM. The protein was found in the nucleus, cytoplasm and membrane of patients with PCa. Higher expression in the nucleus was significantly when the PSA was  $\geq 10\text{ng} / \text{mL}$  and in patients with a higher degree of Gleason as well. In the cell lines, PBRM1 was also found in different compartments and sizes. In RWPE the protein was full-length and in the nucleus, in LNCaP also full-length, but in the cytoplasm. In PC3 and DU145, it was located in the two compartments in a truncated form. PBRM1 may be involved in the development and progression of prostatic tumors, regulating different events associated with tumor biology. Given its role in modulating chromatin, defining mechanisms involved in its behavior may lead to new strategies for the treatment of PCa. Therefore, our results provide a basis for biologically significant and clinically relevant molecular genetic study. It is worth highlighting this is not only a study that aims the identification of biomarkers, but, mainly, it shows key events in the molecular understanding of PCa.

**Keywords:** Prostate Cancer, PBRM1, differential expression, AR, remodeling complex

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Câncer de Próstata**

Mundialmente, o Câncer de Próstata (CaP) é o sexto tipo de câncer mais comum e mais dominante na população masculina. No Brasil, é o segundo carcinoma mais frequente, após o câncer de pele não-melanoma, e a segunda maior causa de morte, após o de pulmão. Nos últimos anos, houve um grande aumento na incidência da doença e para o ano de 2016/2017 estima-se 61.200 novos casos. Diversos motivos estão relacionados a esse crescente número de novos casos, entre esses a evolução nos métodos diagnósticos, a melhoria na qualidade dos sistemas de informações e o rastreamento da doença por meio da dosagem dos níveis do antígeno prostático específico (PSA) e do exame de toque retal (BRASIL, 2017).

Embora esse aumento no diagnóstico tenha se mostrado relevante, na prática clínica existem grandes dificuldades a serem superadas, para que as técnicas de investigação sejam menos invasivas e mais eficazes (IPEKCI et al., 2015). Nesse sentido, identificar o CaP em seus estágios iniciais se mostra crucial para a cura, uma vez que o tumor permanece confinado ao seu órgão de origem. O diagnóstico tardio pode levar a consequências graves, incluindo dificuldades na terapia e maior risco de recorrência, reduzindo a sobrevida global e livre de doença nos pacientes (SHARMA et al., 2017).

As estratégias atuais para o tratamento do CaP se baseiam nas características anatômicas e patológicas, como o estadiamento da doença (sistema TNM) e a classificação histológica por Gleason (RODRIGUES et al., 2017). O sistema TNM descreve o tamanho do tumor primário e se este invadiu tecidos adjacentes (T), além de avaliar o comprometimento linfonodal (N) e a presença de metástase (M). O prognóstico e a estratégia terapêutica estão fortemente relacionados ao estágio no momento do diagnóstico, especialmente, a distinção entre CaP localizado (T1-T2) e doença localmente avançada (T3-T4) (BOESEN, 2017).

A análise patológica de uma peça tumoral da próstata geralmente identifica tecido glandular benigno, regiões com neoplasia intra-epitelial e outras concernentes a adenocarcinoma bem diferenciado com distintos níveis de

agressividade. Nesse sentido, o sistema de Gleason visa estabelecer o grau de diferenciação do tumor, em que são pontuadas as duas lesões mais prevalentes e, posteriormente, somadas em um valor geral. O mais elevado significa um carcinoma menos diferenciado e, consequentemente, com potencial mais agressivo (GROZESCU e POPA, 2017).

Entretanto, na rotina clínica, apenas a análise microscópica das lesões não se mostra suficiente para predizer a evolução da doença e a resposta a terapias. Portanto, um marcador específico para o CaP com alta sensibilidade e especificidade é de grande importância e utilidade para complementar e facilitar decisões no diagnóstico (JIANG et al., 2013). Principalmente, que seja capaz de diferenciar indivíduos assintomáticos ou com doenças benignas, para assim diminuir procedimentos cirúrgicos desnecessários e determinar uma melhor conduta diante do tumor maligno. Portanto, a identificação e o estudo de marcadores moleculares que possam diagnosticar e melhor caracterizar os pacientes são cruciais para os avanços em pesquisa básica e aplicada (URQUIDI et al., 2012; NARAYAN et al., 2017).

Biomarcadores, sejam para diagnóstico e/ou prognóstico, são utilizados no CaP com o intuito de aumentar a sobrevida global e livre da doença. O objetivo final seria não só moléculas precisas e adequadas para a identificação precoce, mas também para a triagem de homens com maior risco de desenvolver a doença em sua forma mais agressiva (SHARMA et al., 2016). Um biomarcador tumoral ideal possui relação direta com o processo oncogênico, correlacionando-se com o tamanho do tumor e permite a sua caracterização (GAUDREAU et al., 2016; LIU, 2017).

De acordo com Hanahan e Weinberg (HANAHAN e WEINBERG, 2011) existem seis alterações na fisiologia celular que induzem às transformações celulares malignas: evasão à apoptose, potencial replicativo ilimitado, insensibilidade à inibição de fatores de crescimento, angiogênese contínua, mecanismos de invasão e metástase celular e auto-suficiência a fatores de crescimento. Diferentes eventos moleculares convergem, portanto, para definir o prognóstico e predição da doença de modo que sua elucidação se torna crucial na compreensão dos mecanismos de controle da diferenciação epitelial e transformação oncogênica (LINDSEY e LANGHANS, 2014). Diante da

diversidade genética dos tumores de próstata, o entendimento da complexidade em nível transcripcional é, portanto, desafiadora. De fato, a detecção de alterações moleculares certamente influenciam as decisões clínicas, ao permitir melhor compreender o tumor e suas progressivas alterações (WYATT et al., 2013).

Alguns genes são descritos como biomarcadores de prognóstico, ao correlacionar seus níveis de expressão com cânceres mais agressivos, na doença metastática e na recorrência do tumor, tais como PTEN (Fosfatase e homólogo de tensão), E-caderina (caderina epitelial tipo 1), PCA3 (antígeno prostático 3) e TMPRSS2-ERG [gene produto da fusão entre protease transmembranar, serina 2 (TMPRSS2) e o fator de transcrição ETS (ERG)] (LEYTEN et al., 2014; BERG, 2016; NAM et al., 2016; WISE et al., 2017). Estes marcadores são capazes de distinguir os tumores indolentes daqueles que provavelmente progredirão para estadios mais avançados (FILELLA e FOJ, 2016). Entretanto, o controle da expressão gênica é um elemento do transcriptoma, cuja complexidade é significativamente ampliada por eventos de *splicing* alternativo, o qual se apresenta cada vez mais importante em diferentes mecanismos moleculares. A desregulação desse processo pode estar envolvida em todas as vias neoplásicas, como o crescimento, apoptose, invasão, metástase, angiogênese e no metabolismo celular (WYATT et al., 2013; OLTEAN e BATES, 2014).

Por se tratar de um evento altamente regulado, erros no processamento do mRNA podem resultar em mudanças na estrutura proteica, gerando moléculas não funcionais ou aberrantes, ou transcritos instáveis. Além disso, a introdução de códons de parada leva ao bloqueio da tradução de forma prematura, o que ocasiona transtornos mediados por mutações *nonsense*. Todos esses eventos estão correlacionados com a biologia tumoral (DONALDSON e BEAZLEY-LONG, 2016; RUSSO et al., 2016).

Diversas proteínas implicadas nas alterações malignas da fisiologia celular são produtos do *splicing* alternativo. Algumas evidências correlacionam este mecanismo com a prática clínica (LAPUK et al., 2014). No CaP são descritos genes que expressam isoformas relacionadas à condição maligna, como o receptor nuclear do hormônio androgênico (AR), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o receptor do fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGFR2), a Ciclina D1 e um membro dos fatores de transcrição da família Kruppel (KLF6).

Assim, elucidar o papel dessas isoformas no CaP certamente auxiliará não somente na sua detecção, como também no manejo clínico dos pacientes acometidos pela doença (LAPUK et al., 2014).

O melhor entendimento da biologia do tumor da próstata, em especial de eventos de *splicing* alternativo, pode revelar novos acontecimentos na transformação maligna e culminar na determinação de assinaturas genéticas. A pesquisa por isoformas que possam desempenhar um papel crítico na progressão do tumor oferece, portanto, a oportunidade de desenvolver estratégias inovadoras para a intervenção terapêutica, que possam ser direcionadas seletivamente para as células neoplásicas.

## **1.2 O complexo SWI/SNF no câncer de próstata**

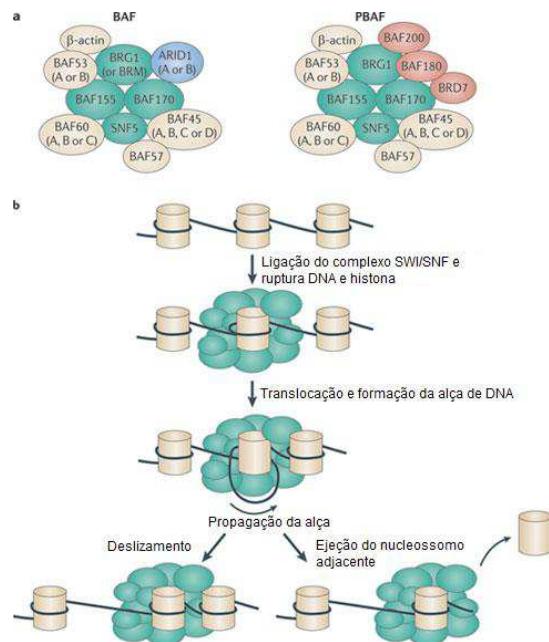
As células malignas, inclusive as prostáticas, apresentam um grande número de alterações somáticas, o que garante vantagens seletivas no microambiente tumoral e assim, contribuem para seu fenótipo alterado. Algumas dessas modificações genéticas incluem mutações pontuais, deleções, amplificações e translocações. Outras mudanças são epigenéticas, incluindo modificações químicas em histonas e no DNA e, consequentemente, na arquitetura da cromatina (GUREL et al., 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

A estrutura da cromatina é regulada por duas classes gerais de complexos: aqueles que modificam covalentemente as caudas das histonas e aqueles que remodelam os nucleossomos por processos dependentes de ATP. Juntos, essas classes cooperam na regulação dinâmica da estrutura da cromatina e, consequentemente, influenciam na expressão de inúmeros genes. Complexos dependentes de ATP são, por sua vez, divididos em famílias baseadas na composição química de suas subunidades incluindo os complexos: SWI/SNF, ISWI, INO80, SWR1 e NURD/Mi2/CHD. Diversas evidências sugerem que o complexo SWI/SNF desempenha um amplo papel na supressão de tumores, uma vez que mutações capazes de inativar suas subunidades têm sido identificadas em diferentes cânceres. Entretanto, os mecanismos pelos quais essas mutações direcionam a tumorigênese ainda permanecem obscuros (LU e ALLIS, 2017).

Nos seres humanos, a família SWI/SNF de remodelagem da cromatina é formado por SWI/SNF A ou BAF (Fator Polibromo Associado a BRG-1 ou a BRM)

e SWI/SNF B ou PBAF (Fator Polibromo Associado a BAF). Cada um destes complexos é constituído por duas subunidades catalíticas ATPase mutuamente exclusivas: a BRM (SMARCA2) ou a subunidade BRG (SMARCA4); um conjunto de subunidades altamente conservadas centrais: SNF5, BAF155 e BAF170; e, finalmente, subunidades variadas que conferem especificidade para cada um destes complexos. A subunidade ARID1A (BAF250A e SMARCF1) ou ARID1B compõe o BAF. A subclasse PBAF possui BAF180 (também conhecido como PBRM1), BAF200 e BRD7 (Figura 1A) (MOHRMANN e VERRIJZER, 2005; WILSON e ROBERTS, 2011; OIKE et al., 2013; WU e ROBERTS, 2013).

Funcionalmente, o SWI/SNF pode regular a expressão gênica por dois mecanismos propostos, mas ainda não validados. Após reconhecer a cromatina, o complexo interrompe a ligação do DNA à histona ao mobilizar o nucleossomo e reposicionar o material genético; ou ejetando o nucleossomo, inserindo/ retirando histonas da cromatina (Figura 1B). Assim, o DNA permanece livre para interagir com fatores de transcrição, co-ativadores e co-repressores (WILSON e ROBERTS, 2011; HELMING et al., 2014).



**Figura 1** - Estrutura molecular do complexo SWI / SNF. a) Composição dos complexos SWI / SNF – A (BAF) e SWI / SNF – B (PBAF). b) Mecanismos de remodelagem da cromatina. Os estágios do processo incluem adesão do SWI / SNF ao DNA, a liberação do complexo DNA-histona, a criação de um laço de DNA que se propaga em todo o nucleossomo e reposicionamento do DNA em relação ao nucleossomo. **Fonte:** WILSON e ROBERTS, 2011 (adaptado).

O funcionamento e expressão de muitas das subunidades de SWI/SNF são descritas no CaP, regulando diretamente os receptores androgênicos, correlacionando com o prognóstico da doença ou auxiliando em sua detecção (LINK et al., 2008; SHEN et al., 2008; LIU et al., 2010; HANSEN et al., 2011; PRENSNER et al., 2013). As subunidades catalíticas BRM e BRG1 do complexo SWI/SNF, por exemplo, foram avaliadas quanto ao seu papel diagnóstico. A expressão de BRG1 foi significativamente maior nos tecidos tumorais do que em benignos e BRM menos expressa nas amostras malignas. Ambas se correlacionaram com o desenvolvimento e a progressão da doença (LIU et al., 2010). Além disso, Shen e colaboradores também descreveram a perda de expressão da proteína BRM associada a vantagens proliferativas induzidas por andrógenos no CaP (SHEN et al., 2008).

De fato, o complexo de remodelagem da cromatina SWI/SNF tem sido sugerido como fundamental para a atividade dos fatores de transcrição dos receptores de andrógeno. Em estudo anterior, a subunidade BAF57 facilitou a interação direta com o receptor, de modo que a interrupção da ligação AR-BAF57 se mostrou capaz de cessar a expressão de genes dependentes de AR, bem como diminuir a proliferação de células tumorais AR-positivas (LINK et al., 2008).

O complexo SWI/SNF também encontra-se envolvido com o funcionamento de RNAs não codificantes. O lncRNA SChLAP1 é altamente expresso em tumores da próstata mais agressivos, está correlacionado com um menor tempo de recorrência e com maior risco de progressão e mortalidade dos pacientes e, interessantemente, envolvido na regulação da subunidade SNF5. SChLAP1 se associa a SNF5 e impede a ligação do complexo no DNA, prejudicando a capacidade de SWI/SNF em regular adequadamente a expressão de genes (PRENSNER et al., 2013). Já a proteína Smarcc1 ou BAF155 também apresentaram uma maior expressão no CaP, e têm sido implicadas na diferenciação, progressão, metástase e recorrência bioquímica do tumor (HEEBOLL et al., 2008; HANSEN et al., 2011).

Tomados em conjunto, estes estudos mostram a importância do complexo SWI/SNF no CaP, sobretudo na regulação androgênica (SHEN et al., 2008). Além disso, cada subunidade desempenha um papel distinto e importante no processo

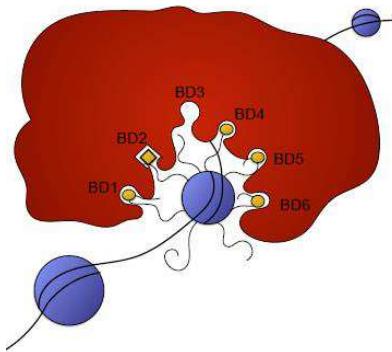
de regulação e compreender suas funções certamente permitirá melhor elucidar os mecanismos relacionados à doença.

### 1.3 O gene *PBRM1*

A proteína humana Polybromo-1 (PBRM1 / BAF180), que confere especificidade para PBAF, é responsável por eventos críticos na transformação oncogênica como o controle do ciclo celular e a transcrição de genes que respondem ao estrógeno. O gene *PBRM1* está localizado na região 3p21, onde os genes supressores de tumores da mama, pulmão e rim já foram mapeados (HORIKAWA e BARRETT, 2002; MORRIS e LATIF, 2017).

Esta proteína contém 1689 aminoácidos e seis bromo-domínios *em tandem* (BRDs), dois domínios de homologia bromo-adjacentes (BAH) e um grupo de alta mobilidade (HMG). Os bromo-domínios são compostos por cerca de 100 aminoácidos e se ligam a resíduos de lisina modificados por acetilação nas histonas; os domínios BAH estão implicados em interações entre as proteínas componentes do complexo e o domínio de HMG se liga ao DNA nucleossomal. Assim, PBAF coordena múltiplos papéis centrais na remodelagem da cromatina, recrutando proteínas efetoras específicas e alterando as interações DNA-histona para controlar as funções gênicas (THOMPSON, 2009).

Os seis BRDs atuam em conjunto e contribuem para a afinidade de PBRM1 pela cromatina e consequentemente a PBAF. A perda da expressão de PBRM1 faz com que PBAF se assemelhe a BAF, mostrando mais uma vez a sua importância para a especificidade do complexo. Porter e Dykhuizen (2017) sugeriram um modelo para a união de PBAF com a cromatina, o qual envolve diretamente seus BRDs. Primeiramente o BRD2 se ligaria a H3K14Ac ancorando o complexo à cromatina. A partir daí os demais BRDs reconheceriam qualquer local de acetilação nas proximidades e estabilizariam a interação de PBAF com a cromatina (Figura 2) (PORTER e DYKHUIZEN, 2017).



**Figura 2** – Modelo proposto referente à ligação dos bromodomínios do gene *PBRM1* com os resíduos de aminoácidos acetilados das histonas.  
Fonte: Porter e Dykhuizen, 2017

O gene *PBRM1* tem sido descrito frequentemente mutado no câncer, indicando o seu papel como um possível supressor de tumor (BROWNLEE et al., 2012). Mutações em *PBRM1* são frequentes em carcinomas de células renais, chegando a ser identificadas em 40% dos casos e em, aproximadamente, 4% dos tumores de mama. Resultados demonstraram o papel fundamental desse gene na regulação do ciclo celular ao atuar na expressão da proteína p21 e, portanto, na transição da fase G1 para S do ciclo celular (XIA et al., 2008; IBRAGIMOVA et al., 2013; LEE et al., 2016).

A perda de expressão da proteína de BAF180 foi recentemente associada com a progressão do carcinoma renal de células claras, ao regular vias associadas com a instabilidade cromossômica e a proliferação celular. Existem também evidências de que BAF180 esteja implicada na regulação da senescência replicativa mediada por p53 (BURROWS et al., 2010; PAWLOWSKI et al., 2013). Costa e seus colaboradores (2014) demonstraram que a perda da expressão de BAF foi associada a fatores prognósticos no câncer renal, como estágio clínico e tamanho do tumor, influenciando significativamente na recorrência e sobrevida dos pacientes. Porém seu papel no CaP ainda não foi descrito.

Neste estudo, avaliamos os níveis transpcionais dos domínios do gene *PBRM1* no tecido e sangue periférico de pacientes com CaP e hiperplasia prostática benigna (HBP) e em quatro linhagens celulares, incluindo uma não neoplásica (RWPE), uma hormônio responsiva (LNCaP) e duas hormônio refratárias (PC3 e DU145). Nossa estratégia de quantificação da expressão diferencial dos domínios do *PBRM1* incluiu ensaios de qPCR, a fim de verificar

sus possíveis associações com a ocorrência do tumor e estimar sua correlação com o desenvolvimento maligno. Em seguida experimentos de imunohistoquímica foram realizados para avaliar o comportamento da proteína PBRM1 em pacientes com CaP. Ensaios de Western Blotting e imunoflorescência confirmaram e validaram o perfil da proteína nos compartimentos celulares.

Os domínios do gene *PBRM1* se apresentaram diferencialmente expressos no CaP e HPB e nas linhagens prostáticas. O BRD1 foi capaz distinguir pacientes com câncer daqueles com a doença benigna, além de correlacionar com TNM. A proteína foi encontrada no núcleo, citoplasma e membrana de pacientes com CaP. Sua expressão mais elevada no núcleo foi significativamente maior quando o PSA foi  $\geq 10\text{ng/mL}$  e em pacientes com maior grau de Gleason. Nas linhagens celulares, PBRM1 também foi encontrada em diferentes compartimentos e tamanhos, sendo que na RWPE a proteína apresentou-se completa e no núcleo, em LNCaP também completa, mas no citoplasma. Já nas PC3 e DU145, foi localizada nos dois compartimentos de forma truncada.

Em particular, nossos resultados demonstraram que eventos de *splicing* alternativo possivelmente influenciam a tumorigênese. Além disso, nosso objeto de estudo, o PBRM1, pode estar envolvido na progressão de tumores prostáticos, regulando diferentes eventos. De modo geral, as alterações nos complexos de remodelagem da cromatina, que possuem um papel central na transcrição e no acesso ao DNA, se mostram importantes para compreender a biologia do tumor. Vale ressaltar que não se trata apenas de um estudo visando à identificação de biomarcadores, mas, sobretudo, evidencia eventos chaves na compreensão molecular do CaP.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral:**

Avaliar o perfil de expressão do gene *PBRM1* em tumores de próstata e sua relação com a agressividade do tumoral.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- Avaliar quantitativamente a expressão dos domínios do gene *PBRM1* no sangue periférico e tecidos de pacientes com e sem tumor e também nas linhagens de próstata.
- Avaliar a expressão da proteína PBRM1 em tecidos prostáticos malignos.
- Estabelecer a correlação entre os resultados de expressão gênica/proteica e os dados histopatológicos dos pacientes.
- Compreender o papel de PBRM1 na biologia tumoral avaliando sua expressão em diferentes linhagens celulares da próstata.
- Demonstrar uma correlação com a localização e o tamanho da proteína com a progressão e agressividade nas linhagens prostáticas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Triagem dos pacientes**

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), em parceria com o Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas. Amostras de sangue periférico de 51 indivíduos, sendo 27 diagnosticados com CaP e 24 com HPB, e de tecidos de 40 pacientes, sendo 27 CaP e 13 HPB, foram coletadas. Os níveis de PSA foram obtidos através do Sistema *IMMULITE 1000* para detecção quantitativa (*Healthcare Diagnostics Inc.*), considerando valores normais entre 0 e 4,0 ng/mL e avaliados também acima ou abaixo de 10 ng/mL (MC GUIRE et al., 2012). Foram incluídos no estudo homens que não tinham sido submetidos à quimioterapia pré-operatória, radiação ou terapia hormonal.

A classificação dos pacientes foi feita de acordo com parâmetros clínicos e laboratoriais como mostra a Tabela 1. Pacientes com CaP foram submetidos a prostatectomia radical e com HBP a prostatectomia transvesical. Todos os procedimentos foram realizados sem dor adicional para os pacientes, e os riscos e benefícios potenciais foram devidamente esclarecidos. Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa na Universidade Federal de Uberlândia, e aprovado sob o número 005/2001.

**Tabela 1:** Características clínicas e hormonais dos pacientes analisados considerando as amostras de tecido e sangue periférico.

Tecido					
	CaP		HPB		
Características	No.	%	No.	%	p
<b>Idade (anos)</b>					
Média ± DP	65,6 ± 6,1		70,9 ± 8,2		<0,0399Ŷ
Mediana (Variação)	62 (51-77)		71 (59-87)		
<65	11	41	4	31	0,5418‡
≥65	16	59	9	69	
<b>PSA (ng/mL)</b>					
Média ± DP	9,57 ± 6,77		8,75 ± 6,27		0,2721Ŷ
Mediana (Variação)	7,88 (2,161-33,1)		8,4 (2,5-24.28)		
<10	17	63	8	62	0,4653‡
≥10	10	37	5	38	
<b>Gleason score</b>					
<7	13	48			
≥7	14	52			
<b>TNM</b>					
pT1	1	4			
pT2	19	70			
pT3	7	26			
Sangue periférico					
	Pacientes CaP		Pacientes HPB		
Características	No.	%	No.	%	p
<b>Idade (anos)</b>					
Média ± DP	63,8 ± 6,2		68 ± 7,77		<0,0135Ŷ
Mediana (Variação)	64 (50-78)		70,5 (50-82)		
<65	16	59	8	33	0,0641‡
≥65	11	41	16	67	
<b>PSA (ng/mL)</b>					
Média ± DP	10,1 ± 6,9		8,15 ± 4,08		0,2856Ŷ
Mediana (Variação)	7,88 (2.5-33.1)		6,905 (2.5-18.16)		
<10	15	56	16	67	0,4172‡
≥10	12	44	8	33	
<b>Gleason score</b>					
<7	13	48			
≥7	14	52			
<b>TNM</b>					
pT1	-	-			
pT2	22	81			
pT3	5	19			

Ŷ teste de Mann-Whitney; ‡ teste de Qui-quadrado; p<0,05 foi considerado significante.

### **3.2 Cultura celular**

Para as análises em linhagens celulares foram utilizadas as células tumorais PC3 e DU145, ambas hormônio-independentes e as células LNCaP, caracterizadas como hormônio-dependentes. Como controle não-tumorigênico foi utilizada a linhagem RWPE. As linhagens PC3 e LNCaP foram cultivadas em meio RPMI 1640 e a DU145 em meio DEMEM, ambos enriquecidos com soro fetal bovino a 10% e 100 mg/mL de gentamicina. A linhagem RWPE foi cultivada em meio de queratinócitos enriquecido com Fator de crescimento epidérmico (EGF), extrato de pituitária, soro fetal bovino a 10% e 100 mg/mL de gentamicina. Todas foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 80% de confluência.

### **3.3 Extração de RNA total**

O mRNA foi extraído em duplicatas e todas as soluções foram preparadas com água de DEPC. Para as amostras de sangue, após a separação do soro, as células foram precipitadas utilizando uma solução salina contendo nove partes de cloreto de amónio 0,144 M a uma parte de bicarbonato de amónio 0,01 M. A mistura foi centrifugada a 3000 rpm durante 15 min. Em seguida utilizou-se isotiocianato de guanidina e fenol-clorofórmio de acordo com os procedimentos descritos anteriormente (NEVES et al., 2013). O RNA foi precipitado durante a noite com isopropanol a -20°C, lavado com etanol a 75% e ressuspensso em 25 µL de água DEPC.

Os mRNAs dos tecidos dos pacientes e das linhagens celulares RWPE, LNCaP, DU145 e PC3 foram extraídos seguindo o protocolo do reagente *Trizol/Reagent®* (*Invitrogen*). A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com *GelRed* (*Uniscience*) assim como pela razão das leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. As quantificações foram realizadas em espectro de microvolumes no comprimento de 260nm. Em seguida, o ácido ribonucléico foi armazenado à -80°C para subsequentes análises.

### **3.4 Transcrição Reversa**

A transcrição reversa foi realizada para cada amostra, utilizando 1µg de RNA total, 10U de inibidor de RNase (*Invitrogen*), 40U de MMLV-RT

(AmershamBiosciences), 1X de Tampão da MMLV-RT (AmershamBiosciences), 200µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros. O volume final de cada reação foi completado para 20µl com água tratada com DEPC. A solução foi incubada em termociclador PTC-100 (MJ Research) a 37°C por 1 hora e aquecida a 95°C por 5 minutos para desnaturação do híbrido RNA-cDNA.

### **3.5 Quantificação transcracional relativa por qPCR**

As quantificações relativas do gene *PBRM1* em relação ao gene de referência *B2M* (Beta-2-microglobulina) (ARAUJO et al., 2014) foram realizadas por PCR em tempo real utilizando o software *ABI PRISM 7300 Sequence Detection System* (Applied Biosystems - Carlsbad, CA, USA). A reação foi preparada para um volume final de 10µL, contendo 5µL de *Power SYBR\_ Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems - Carlsbad, CA, USA), 2µL de cDNA (1:4) e 0,5µM de oligonucleotídeos específicos para cada região do gene *PBRM1* (Tabela 2). Foram construídas curvas de dissociação e padrão para todos os iniciadores. A eficiência da PCR (E) foi calculada de acordo com a equação:  $E = (10^{-1/slope} - 1) \times 100$  para validar a quantificação relativa baseada no método de CT comparativo entre pacientes com CaP e pacientes com HPB.

**Tabela 2:** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as amplificações dos diferentes domínios do gene *PBRM1*.

Alvo	Sequência 5'-3' (direto/reverso)	Amplicon (pb)
BRD1	GGGCACCAAAGCGAAGAAAT TCATCATCATCTTCGTCATCTGCT	271
BRD2	CAGAAACTGCCTCTAAAGTGC CATTGCCAGAGGATACAGAAC	94
BRD3	CCATATCACTACAACAGATCCGAAC ATATCGTCTCCTGGCAAGC	199
BRD4	ATGAGGAGGGCTCCCAGGTT CTACTCAGCTTGAGTTGGGAGAA	128
BRD6	AGAGATTCTCTTCACCGGCA GAGAAGCTGAAAAGAGTGAAGATT C	154
BRD5	TTCTCCAAACTCAAGCTGAGTAG GGGAAGATGCTACAGCGATTCTT	506
BAH2	GTCCTCGTGTGGCAGAATT ACAACACAGCACACTTCCGAG	192
BAH1	GTGTGTGGTCATGTTGTCAAGGA ACTGAGCTGATGGGCATGGT	147
HMG-box	GATGAGGGCTGTGATTAAGGC ATGCCTGCAACAGGTGTCAAC	291

BRD: bromodomínios; BAH: domínios bromo-adjacentes; HMG-box: domínio de alta mobilidade.

### 3.6 Imunohistoquímica

Amostras de tecido prostático de 66 pacientes detectados com CaP foram avaliadas quanto à positividade para a proteína PBRM1. A idade média dos pacientes foi 60,97 anos ( $\pm 8,23$  variando de 44 a 78 anos) anos, os níveis séricos médios de PSA antes da cirurgia foram de 6,3 ng/mL ( $\pm 5,33$  variando entre 0 a 24 ng/mL) e pós-cirurgia de 0,16 ng/mL ( $\pm 0,71$  variando de 0 a 4,64). A classificação histológica de acordo com a pontuação de Gleason foi agrupada em Gleason menor que 7 (45,5%) e Gleason maior ou igual a 7 (55,5%).

As placas de TMA contendo amostras de tecido de 1 mm de diâmetro e 4 mm de espessura foram incubadas durante a noite com anti-PBRM1 (*Sigma*) diluídas em PBS-BSA 1% (p/v) na concentração de 1:25. As lâminas foram reveladas, subsequentemente, com polímero *NovoLink* (*LeicaBiosystems*) de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida a reação foi desenvolvida com DAB (*Sigma*). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris (*Ventana*)

e montadas em película *Entellan neu* (*Merck*). A coloração foi quantificada em scanner digital Aperio ScanScope XT (*Leyca Biosystems*) utilizando os algoritmos *PixelCount* V9.0 e IHC. A quantificação nuclear, citoplasmática e de membrana de PBRM1 nos tecidos da próstata foram classificadas pela intensidade e a extensão da coloração.

### **3.7 Western blotting**

Os extratos proteicos citoplasmáticos e nucleares foram obtidos a partir de  $5 \times 10^5$  de células RWPE, LNCaP, DU145 e PC3, utilizando-se o kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent kit (*Thermoscientific*) conforme as instruções do fabricante. A concentração protéica foi determinada pelo método BCA (*BCA™ Protein Assay; Thermo Scientific™ Pierce™*).

As proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida 10% com tampão de corrida (Tris base 125 mM, Glicina 125 mM e SDS 0,1% (p/v) em água destilada), seguida pela transferência para membrana de nitrocelulose (*Hybond, GE Healthcare*) em sistema *wet* (*GE HealthCare*). Após esse procedimento, a membrana foi bloqueada por 1 hora com leite desnatado a 5% (p/v) em PBS 1X (Tampão Fosfato-Salino, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, 137 mM NaCl e 2,7 mM KCl em pH 7,4) e posteriormente incubada com o anticorpo anti-PBRM1 (1:1000, *Sigma*). Em seguida, foi utilizado o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (*Thermoscientific*) marcado com peroxidase. Por fim, as proteínas foram detectadas por quimiluminescência (*ECL detection reagents® - GE HealthCare*) em filmes de autoradiografia (*GE HealthCare*).

### **3.8 Imunofluorescência**

As células RWPE, LNCaP, DU145 e PC3 foram fixadas com 3% de paraformaldeído e em seguida foram permeabilizadas em solução de PBS-BSA 1% adicionado 0,1% de Triton, e incubadas com anticorpo anti-PBRM1 (1:50, *Sigma*). A marcação para PBRM1 foi obtida após utilização do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (*Abcam*). Os núcleos foram contrastados com TO-PRO-3® Iodide (1:1000, *Invitrogen*). A localização de PBRM1 foi avaliada por microscopia confocal com sobreposição das imagens obtidas no microscópio *Zeiss LSM510*.

### **3.9 Análises Estatísticas**

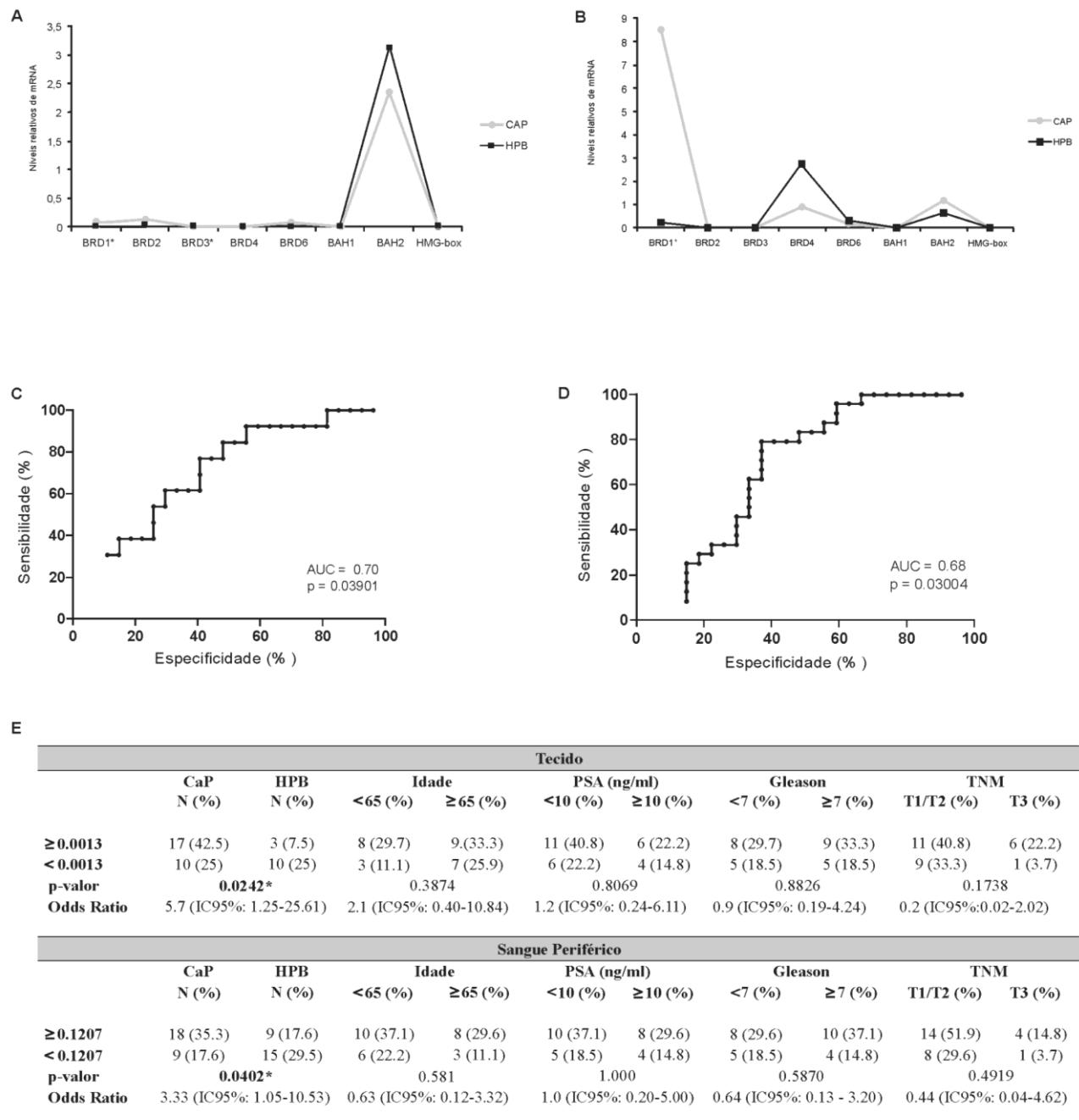
Para as análises estatísticas dos transcritos de *PBRM1* nos pacientes foram utilizados o teste Mann-Whitney. A partir do *cut off* estabelecido para cada uma das amostras foram obtidas as curvas ROC e os valores de Odds ratio comparando-se CaP com HPB. Testes de correlação canônica foram conduzidos para estabelecer as correlações entre os níveis de mRNA e os parâmetros clínicos como idade do paciente no diagnóstico, estadiamento pelo sistema TNM, escore de Gleason e níveis de PSA sérico.

Para os resultados obtidos nas linhagens celulares, foi utilizado o teste t-student. Considerando os dados de imunohistoquímica, o teste qui-quadrado foi empregado para a avaliação de significância. Foram considerados estatisticamente significantes valores de  $P < 0,05$ . Foram utilizados os programas *R*, *Bioestat* e o *GraphPad Prism*, versão 7.0.

## 4 RESULTADOS

A hipótese central que motivou esse estudo foi que o gene PBRM1 encontra-se diferencialmente regulado no CaP, sobretudo correlacionado à agressividade tumoral. Para isso analisamos os níveis de mRNA e de proteínas tanto em pacientes quanto em linhagens tumorais. Considerando o papel de seus domínios, testamos primeiramente nossa hipótese avaliando os níveis transcripcionais de cada um em pacientes com CaP e HPB.

Verificamos que o BRD1 apresentou-se 6,9 e 36,9 vezes significativamente mais expresso no CaP no tecido e no sangue, respectivamente (Figura 3A-B). De acordo com os limites de medianas e quartis que diferenciaram o grupo de pacientes com CaP daqueles com HPB, foi estabelecido um *cut off* para cada domínio. Esse valor foi utilizado no cálculo de Odds Ratio e no teste diagnóstico baseado em curva ROC, sendo 0,0013 para tecido e 0,1207 para sangue periférico, o que evidenciou as AUCs de 70% e 68%, respectivamente (Figura 3C-D). Nesse sentido, quando os níveis transcripcionais do BRD1 se mostraram superiores, os pacientes apresentaram uma chance aumentada de 5,667 e 3,33 vezes de desenvolver a doença nas amostras analisadas (Figura 3E). O BRD3 também se apresentou 9,8 vezes mais expresso no CaP em amostras de tecido ( $p=0,0406$ ).

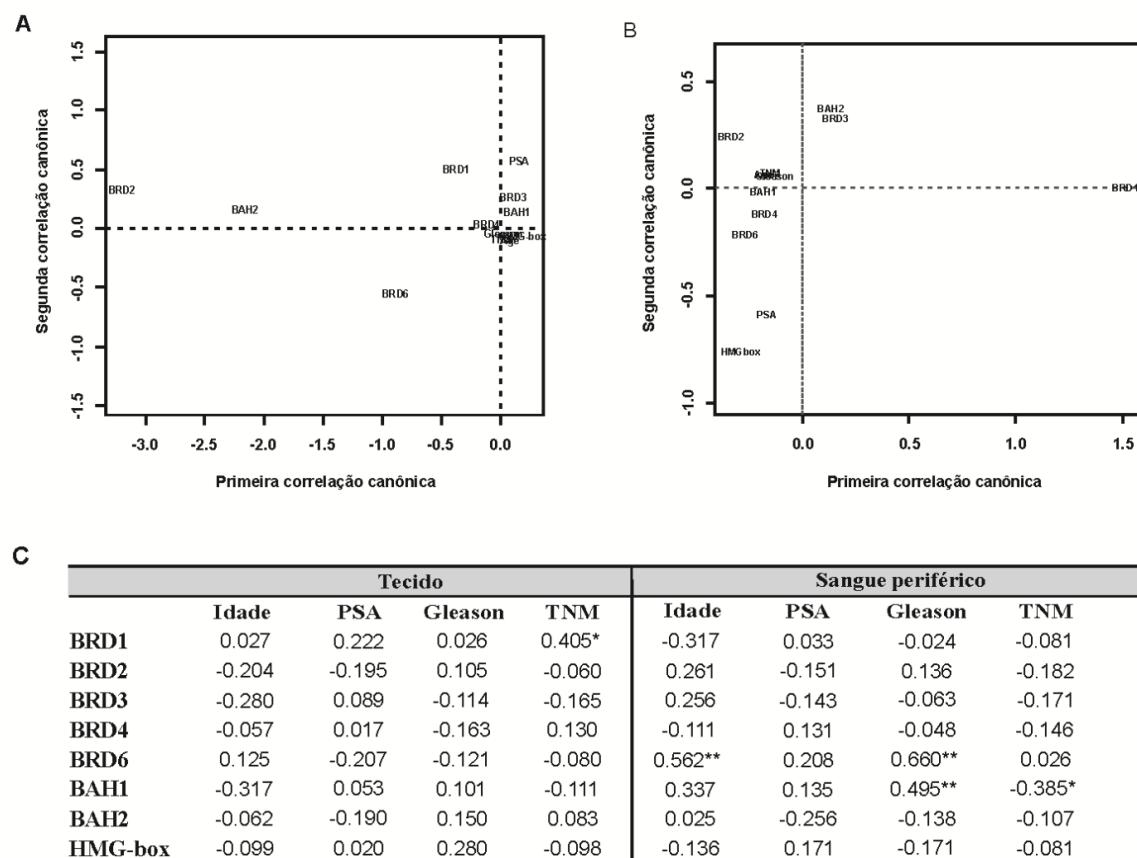


**Figura 3 –Níveis de expressão do mRNA dos domínios do gene *PBRM1*.** Quantificação relativa do mRNA dos domínios de *PBRM1* no câncer de próstata (CaP) e amostras benignas (HPB) no tecido (**A**) e no sangue (**B**). Curva ROC obtida para os níveis de transcrição do BRD1 para amostras de tecido (**C**) e sangue (**D**). Os valores foram calculados para câncer de próstata versus hiperplasia prostática benigna. Em (**E**) a tabela dos valores obtidos para o cálculo de Odds Ratio para BRD1, com *cut off* de 0,0013 para o tecido e de 0,1207 para o sangue. \* P ≤ 0,05. BRD: bromodomínios; BAH: domínios bromo-adjacentes; HMG-box: domínio de alta mobilidade; AUC: área sob a curva.

Para explorar as interações entre os diferentes domínios e os dados clínicos dos pacientes (idade, PSA, Gleason e TNM) foram conduzidas análises de correlação canônica. Em amostras de tecido, BRD3 e BAH1 se agruparam, assim como TNM, Gleason e HMG-box, o que evidencia seu funcionamento

coordenado. Interessantemente, o BRD1 correlacionou com o estadio T3 e, portanto, com tumores localmente avançados (Figura 4A).

Para as análises em sangue periférico, os dados diferiram, com BRD3 agrupando-se com BAH2 (Figura 4B). Além disso, BRD6 correlacionou com idade superior a 65 anos e Gleason maior ou igual a 7 e BAH1 com Gleason e TNM e BAH com TNM e Gleason elevados no sangue (Figura 4C). Portanto, nota-se, em geral, que em CaP há uma maior quantidade de transcritos para PBRM1 e uma expressão diferencial de seus domínios que, por sua vez, correlacionou com a agressividade do tumor.



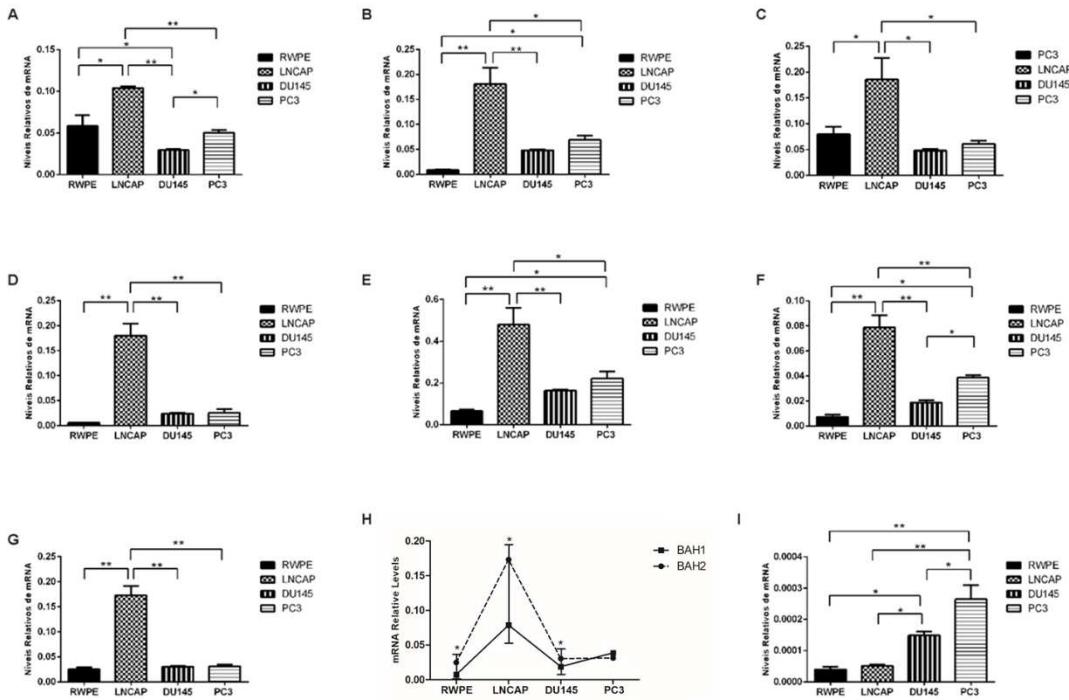
**Figura 4 – Correlação canônica entre os domínios de *PBRM1* e os dados histopatológicos dos pacientes.** Gráfico de correlação canônica para os níveis de mRNA dos domínios do gene *PBRM1* e os dados clínicos em amostras de tecido (A) e sangue (B). Matriz de correlação obtida pela correlação canônica (C). Nos gráficos estão listados os mesmos parâmetros demonstrados na tabela. \* p ≤ 0,05 e \*\* p ≤ 0,01. BRD: bromodomínios; BAH: domínios bromo-adjacentes; HMG-box: domínio de alta mobilidade.

Para avaliar o papel desses domínios na biologia do CaP, foram conduzidos experimentos em quatro linhagens prostáticas incluindo uma não neoplásica, uma hormônio responsiva e duas hormônio refratárias. Todos os

bromodomínios mostraram-se mais expressos nas células LNCaP comparadas às RWPE (Figura 5A-E), corroborando com os dados verificados nos pacientes, em que há maiores níveis de mRNA naqueles diagnosticados com a doença. Além disso, na linhagem tumorigênica hormônio-responsiva, os níveis relativos de mRNA foram superiores às linhagens PC3 para todos os BRDs. Para as DU145, essa diferença não foi verificada para BRD2 e BRD6. Estes dois domínios também se apresentaram 7,8 e 3,4 vezes mais expressos em PC3 comparados às RWPE, respectivamente. Apenas o BRD1 diferenciou as células hormônio-refratárias, apresentando-se 1,7 vezes mais expresso em PC3. O domínio BRD5 apresentou níveis relativos de mRNA muito baixos (dados não mostrados), por isso não apresentou significância entre as linhagens. O perfil transcrional se repetiu entre os bromodomínios sendo menores em RWPE, crescendo significativamente em LNCaP e decrescendo novamente em PC3 e DU145.

Esse comportamento também foi identificado nos domínios bromo-adjacentes (Figura 5 F-G). BAH1 foi mais expresso em LNCaP comparado às demais linhagens. Além disso, foram identificados mais transcritos em PC3 em relação à RWPE e DU145 (5,3 e 2,1 vezes respectivamente). Para BAH2 os níveis de mRNA foram estatisticamente significantes apenas quando comparados a LNCaP (superior às demais células avaliadas). O comportamento transcrional desses domínios se assemelha aos BrDs, identificando maiores níveis de mRNA em RWPE, os quais aumentam em LNCaP e diminuem em PC3 e DU145. Além disso, os níveis de BAH2 são superiores a BAH1, exceto nas PC3 (Figura 5H).

Portanto, ao analisarmos apenas as células tumorais, houve uma perda dos transcritos para BRDs e BAHs nas linhagens não responsivas a tratamento hormonal. O comportamento mudou em relação ao HMG-Box, o qual se apresentou em maiores níveis nas linhagens hormônio-refratárias (Figura 5I) sendo 6,7 e 5,2 vezes mais expresso na PC3 e 3,8 e 2,9 em DU145 comparadas a RWPE e LNCaP, respectivamente. Interessantemente, os transcritos apresentaram uma curva ascendente relacionada à agressividade tumoral. A quantificação não se mostrou significativa apenas quanto as linhagens não-tumorigênicas foram comparadas às LNCaP.



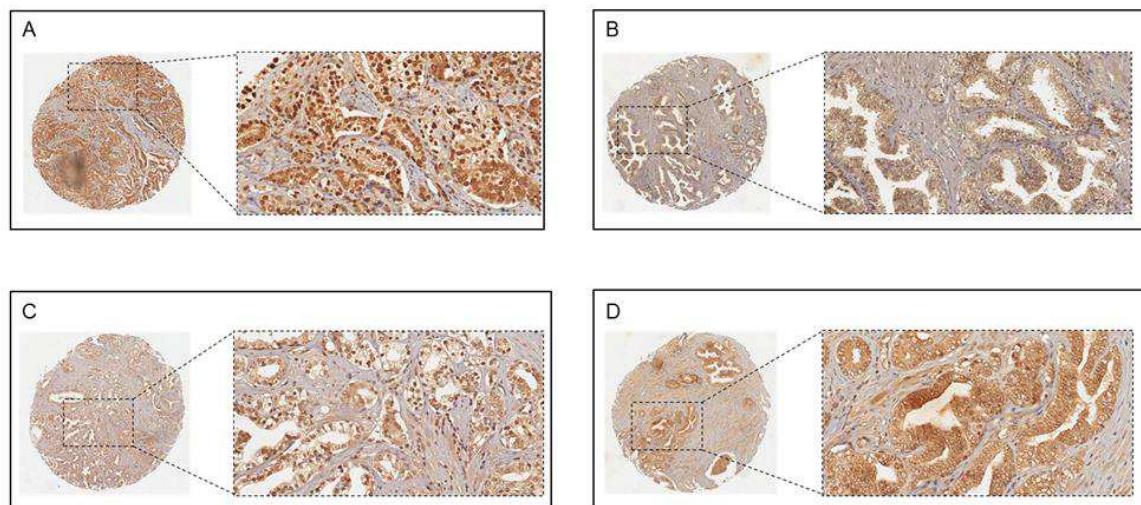
**Figura 5 – Expressão relativa dos transcritos dos domínios do gene *PBRM1* nas linhagens RWPE, LNCaP, PC3 e DU145.** Quantificação relativa do mRNA obtida para os bromodomínios: BRD1 (**A**), BRD2 (**B**), BRD3 (**C**), BRD4 (**D**), BRD6 (**E**) e domínios bromo-adjacentes BAH1 (**F**), BAH2 (**G**). O perfil do comportamento dos transcritos dos BAHs entre as linhagens estão representados em (**H**). Níveis de mRNA para o domínio de alta mobilidade HMG-box (**I**). \*  $p \leq 0,05$  e \*\*  $p \leq 0,001$ . BRD: bromodomínios; BAH: domínios bromo-adjacentes; HMG-box: domínio de alta mobilidade.

## PBRM1 é detectado no núcleo, citoplasma e membrana de células tumorais

Objetivando elucidar o comportamento dessa subunidade no CaP, foram realizados ensaios de imuno-histoquímica para a detecção de PBRM1 em pacientes diagnosticados com a doença. A proteína foi identificada tanto no núcleo, quanto no citoplasma e membrana (Figura 6A-D) e a intensidade de marcação definida como baixa e elevada.

Avaliando os dados dos pacientes, a maior marcação nuclear mostrou-se significativamente correlacionada com o PSA  $\geq 10\text{ng/mL}$  e com pacientes com maior grau de Gleason, e, portanto, com tumores altamente indiferenciados. Esses dados corroboram os anteriores, em que os níveis de PBRM1 foram associados a tumores mais avançados. Não foi verificada correlação com a idade

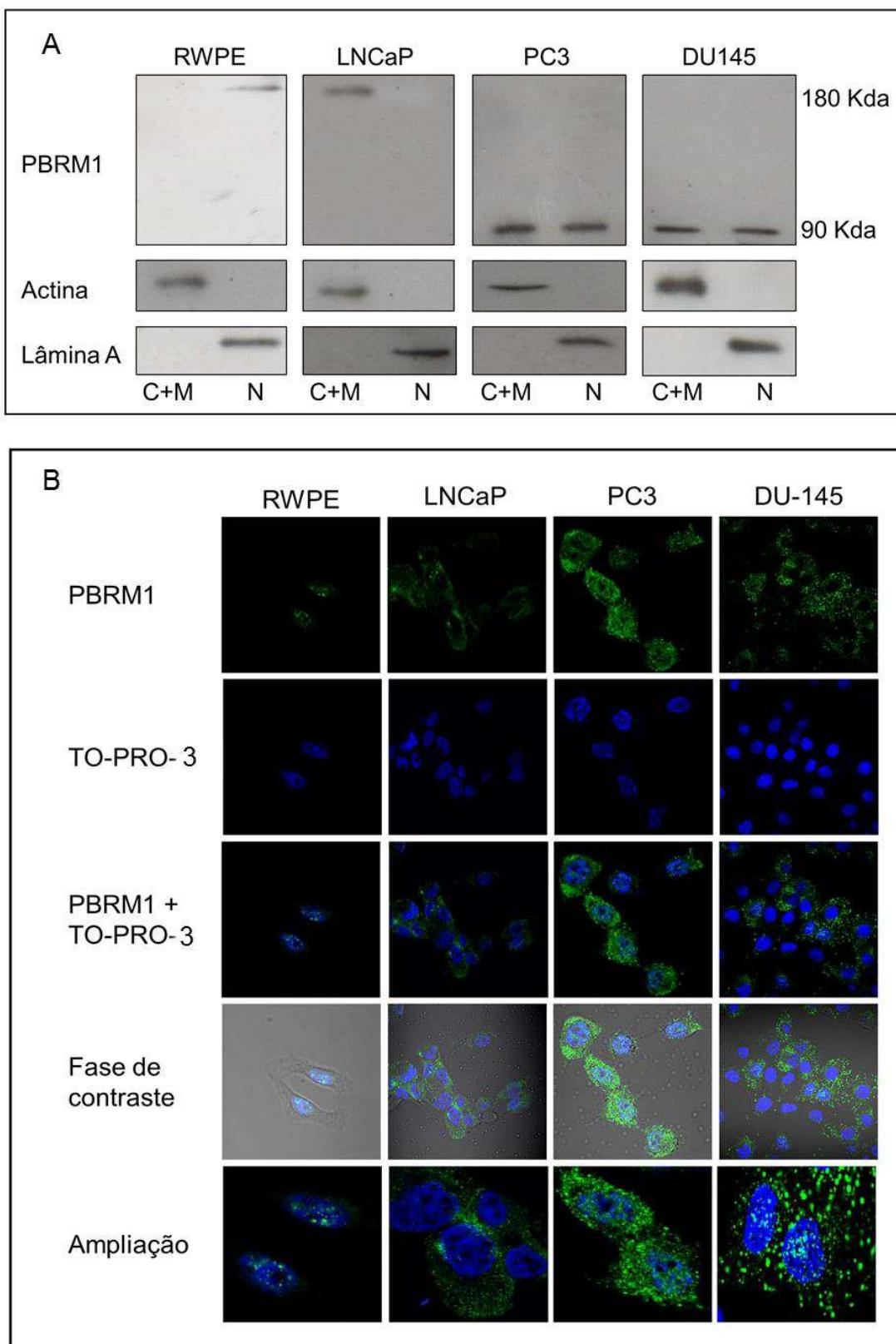
e PSA pós-operatório. Além disso, as demais marcações para citoplasma e membrana também não apresentaram dados estatisticamente significantes (Figura 6E).



	Núcleo		Citoplasma		Membrana	
	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa
<b>Idade</b>						
<65	30 (45.4)	12 (18.2)	20 (30.4)	22 (33.3)	23 (34.8)	19 (28.8)
≥65	12 (18.2)	12 (18.2)	10 (15.1)	14 (21.2)	12 (18.2)	12 (18.2)
<i>Valor de p</i>	0.0707		0.4177		0.7998	
<b>PSA-pre</b>						
<10	33 (50)	24 (36.3)	26 (39.4)	31 (47)	28 (42.5)	29 (43.9)
≥10	9 (13.7)	0	4 (6)	5 (7.6)	7 (10.6)	2 (3)
<i>Valor de p</i>	0.0120*		0.6179		0.1061	
<4	14 (21.2)	9 (13.7)	9 (13.7)	14 (21.2)	13 (19.8)	22 (33.3)
≥4	28 (42.4)	15 (22.7)	21 (31.8)	22 (33.3)	10 (15.1)	21 (31.8)
<i>Valor de p</i>	0.7918		0.3112		0.7973	
<b>PSA-pós</b>						
<0.01	18 (27.3)	15 (22.7)	17 (25.7)	16 (24.3)	16 (24.3)	17 (25.7)
≥0.01	24 (36.3)	9 (13.7)	19 (28.8)	14 (21.2)	19 (28.8)	14 (21.2)
<i>Valor de p</i>	0.1002		0.4025		0.3111	
<b>Gleason</b>						
<7	13 (19.8)	17 (25.7)	16 (24.3)	14 (21.2)	16 (24.3)	14 (21.2)
≥7	29 (43.9)	7 (10.6)	14 (21.2)	22 (33.3)	19 (28.8)	17 (25.7)
<i>Valor de p</i>	0.0019*		0.1775		1.0000	

Figura 6 – Imunohistoquímica para a proteína PBRM1 em tecidos com Câncer de próstata. Intensidade de marcação alta (A) e baixa (B) da protáina PBRM1 em todos compartimentos celulares. Núcleo com intensidade alta e citoplasma e membrana baixa (C). Intensidade de núcleo baixa e citoplasma e membrana alta (D). Tabela (E) de correlação das marcações da PBRM1 nos diferentes compartimentos celulares com os dados histopatológicos dos pacientes. \*p ≤ 0,05.

Ensaios celulares novamente foram realizados para validar e melhor compreender o comportamento dessa molécula no CaP. Os resultados de Western blotting (Fig 7A) e imunofluorescência (Fig 7B) revelaram que, de fato, essa proteína pode ser encontrada em diferentes compartimentos celulares. Entretanto, apresentou, mais uma vez, um comportamento divergente entre as linhagens. Na linhagem RWPE foi detectada a proteína completa localizada predominantemente no núcleo. Já na linhagem LNCaP, onde maiores níveis transpcionais dos BrDs e BAHs foram quantificados, a proteína completa também foi detectada, contudo citoplasmática. Por fim, na linhagem PC3 verificou-se a presença de PBRM1 truncada e intensamente marcada no núcleo. Os transcritos para HMG-box também foram maiores nessa linhagem. As células DU145 demonstraram comportamento semelhante a PC3. Esses resultados revelam a regulação diferencial de PBRM1 no CaP e, o mais interessante, de fato relacionada à biologia tumoral.



**Figura 7 – Marcação de PBRM1 nas diferentes linhagens prostáticas RWPE, LNCaP, PC3 e DU145.** Western blotting (**A**) de PBRM1 em extratos proteicos de citoplasma e membrana (C+M) e núcleo (N). Actina e Lâminina A foram usadas como controles de reação. A localização imunofluorescente (**B**) de PBRM1 nas células foi analisada por coloração com anti-PBRM1 (verde), enquanto os núcleos foram contra-corados com TO-PRO-1 (azul). Imagens mescladas (verde-água) confirmaram a localização nuclear de PBRM1.

#### **4. DISCUSSÃO**

Nós realizamos ensaios para a detecção dos níveis transcricionais e protéicos de PBRM1 em pacientes com câncer de próstata e em linhagens prostáticas para avaliar sistematicamente o papel dessa molécula no surgimento e progressão da doença. Os resultados se mostraram complementares e ainda evidenciaram o perfil da proteína em células hormônio-responsivas e hormônio-refratárias. Nas primeiras foi detectada a proteína completa e citoplasmática e na linhagem PC3 verificou-se a presença de PBRM1 truncada e intensamente marcada no núcleo. Trata-se de uma proteína com diferentes domínios (bromodomínios, domínios bromo-adjacentes e HMG-box) e, como sugerido por nossos resultados, com comportamento peculiar no CaP.

Os BRDs são módulos proteicos, evolutivamente conservados, responsáveis por interações proteína-proteína por meio de ligações acetil-lisinas. São encontrados em uma ampla variedade de proteínas e em quase todos os tecidos, e por isso estão envolvidos em diferentes eventos celulares associados à regulação da expressão gênica. Desempenham diversas funções catalíticas, como metiltransferases, acetiltransferases, helicases e atividades ATPásicas associadas à remodelagem da cromatina (ZENG e ZHOU, 2002; FUJISAWA e FILIPPAKOPOULOS, 2017).

Muitas proteínas contendo BRDs são descritas desreguladas no câncer. Considerando nosso objetivo, mutações já foram mapeadas dentro de BRDs em PBRM1 vinculadas a diferentes tumores (BARBIERI et al., 2013; FUNG et al., 2015; STUHLMILLER et al., 2015; GHOSHAL et al., 2016; HUANG et al., 2016; PORTER e DYKHUIZEN, 2017). Em um primeiro momento, avaliamos o perfil de expressão de seus seis BRDs em pacientes com CaP e HPB e em diferentes linhagens celulares. Esses domínios atuam em conjunto e contribuem com a afinidade de PBRM1 pela cromatina. Embora sejam capazes de se ligar a qualquer substrato acetilado, são responsáveis por recrutar, segmentar, reter ou orientar o complexo PBAF a regiões específicas na cromatina (ZENG e ZHOU, 2002; FILIPPAKOPOULOS et al., 2012). Portanto, modificações nesses domínios podem alterar o perfil regulatório do complexo e, consequentemente, estarem

envolvidas com a transformação e progressão tumorais, sobretudo em neoplasias da próstata, até então não avaliadas.

Tanto em amostras de tecido quanto em amostras de sangue, o BRD1 foi capaz de diferenciar CaP e HPB. Já foi descrito que BRD1, BRD3 e BRD4 se ligam a uma ampla gama de peptídeos acetilados em todas as histonas. O BRD2 tem uma interação específica com H3K14ac, ancorando e estabilizando PBAF na cromatina e BRD6 está implicado na especificidade de PBRM1. Nesse cenário, diferentes combinações de BRDs podem se ligar a sequências promotoras distintas (ou em locais de dano de DNA), uma vez que a necessidade por cada um varia conforme o padrão de modificações na cromatina. (BROWNLEE et al., 2012; FILIPPAKOPOULOS et al., 2012; PORTER e DYKHUIZEN, 2017). Um perfil de expressão pode estar envolvido a uma situação patológica específica e, consequentemente, diretamente associado a características da doença.

Isso se mostra razoável, uma vez que verificamos que os níveis de transcritos para BRD1 foram mais elevados em pacientes com tumores classificados como T3 e os de BRD6 foram maiores em pacientes com grau de Gleason superior ou igual a 7. Mutações já foram encontradas dentro de BRD1 em outros tipos de canceres, como no câncer de mama (BAI et al., 2017), pulmão (KAUR et al., 2016), rim (PORTER e DYKHUIZEN, 2017) e bexiga(HUANG et al., 2015) correlacionadas com um pior prognóstico do paciente (PAWLOWSKI et al., 2013; HUANG et al., 2015; KIM et al., 2015; MO et al., 2015) e sabe-se que o BRD6 apresenta peculiaridades estruturais que direcionam todo o complexo (PORTER e DYKHUIZEN, 2017). Fato é que os resultados apresentados sugerem um perfil associado a um alto risco de doença disseminada, com Gleason e TNM elevados (FILELLA e FOJ, 2016) o que os tornam moléculas terapêuticas promissores para a supressão de células malignas (GHOSHAL et al., 2016; JAIN e BARTON, 2016). A família de bromodomínios e extra-terminais (BET), incluindo o BRD3, BRD2 e BRD4 já foram alvos de terapia, por controlarem a proliferação e progressão tumorais (BAI et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

Os domínios BAH dentro de PBRM1 estão envolvidos nas interações com outros componentes do complexo PBAF e/ou com proteínas de ligação ao DNA (GOODWIN e NICOLAS, 2001; YANG e XU, 2013). Neste estudo, a expressão relativa de mRNA do BAH1 em sangue foi maior em pacientes com tumores

indiferenciados (Gleason ≥7) e localmente avançados (T3). Sugere-se que BAH1 possa estar envolvido no reconhecimento e transcrição de genes oncogênicos e, consequentemente, na formação de heterocromatina em regiões correspondentes a genes supressores de tumor (ZHU et al., 2015).

As análises de correlações canônicas agruparam a expressão dos domínios de *PBRM1* com fatores prognósticos. Esses dados nos fornecem um melhor entendimento da intricada rede molecular associada ao CaP, e que, de fato, existe um comportamento específico de *PBRM1* nesse tumor, suportando nossa hipótese. Em amostras de tecido, BRD3 e BAH1 se agruparam, assim como TNM, Gleason e HMG-box.

O grupo HMG-box coordena a transcrição, coordenando a ligação dos fatores regulatórios às sequências alvo e estabilizando os promotores (UEDA e YOSHIDA, 2010; MONTE et al., 2016). Realiza um papel importante em muitos processos relacionados ao câncer, cuja expressão aumentada já foi descrita em muitos tipos de cânceres, como rim, ovário, pâncreas e gástrico (ISHIGURO et al., 2005; STROS, 2010; YANG et al., 2012; GUO et al., 2016; CAI et al., 2017). Neste estudo, as correlações obtidas sugerem seu envolvimento na regulação de vias concernentes à agressividade e progressão do CaP, incluindo a androgênica e expressão de PSA.

Em estudos anteriores a associação de outros marcadores com os níveis séricos de PSA aumentou a sensibilidade desse antígeno para diferenciar os pacientes com CaP daqueles com HPB (NEVES et al., 2013; ARAUJO et al., 2014; NUNES et al., 2016). Compreender a regulação dessa via certamente auxilia na compreensão da biologia do CaP. Para melhor entender o comportamento de *PBRM1* em diferentes situações tumorais, análises de expressão também foram conduzidas em linhagens celulares.

As células LNCaP apresentaram maiores níveis transcripcionais dos BRDs e BAHs comparadas às não neoplásicas, corroborando nossos resultados com amostras de pacientes. Além disso, esses níveis foram superiores comparados às linhagens hormônio-refratárias. Já para HMG-box, os transcritos foram maiores em DU145 e PC3. A superexpressão desse domínio confirma estudos anteriores que mostraram seu importante papel no desenvolvimento e progressão de

tumores (WUNDERLICH e BOTTGER, 1997; LEE et al., 2010; PELUSO e CHIAPPETTA, 2010; ZHANG et al., 2011; BARREIRO-ALONSO et al., 2016).

Nas análises protéicas, PBRM1 mostrou-se completa e citoplasmática nas LNCaP e em RWPE completa e nuclear. Sabe-se que PBRM1 permite a transcrição de vários genes envolvidos com a parada do ciclo celular (LEE et al., 2016) e, portanto, seu estado íntegro e nuclear sugere sua função regulatória relativa à inibição de tumor em linhagens não neoplásicas. A localização no citoplasma associa-se, provavelmente, à função dessa proteína em eventos de sinalização celular, contudo, ainda não descritos. Resultados anteriores demonstraram que PBRM1 é alvo da degradação proteica proteossomal induzida por p53 em carcinoma renal positivo para esse supressor de tumor (MACHER-GOEPPINGER et al., 2015). Células LNCaP expressam p53, sugerindo que a localização citoplasmática possa estar envolvida em processo de degradação do complexo. Essas células são responsivas ao tratamento hormonal, e AR e p53 coordenam o crescimento andrógeno-dependente no CaP (CRONAUER et al., 2004).

Nas células PC3 e DU145, que representam uma forma mais agressiva da doença, PBRM1 além de localizar-se no núcleo, apresentou-se de forma truncada. Há relatos de PBRM1 mutado em carcinomas de rim, por apresentar códons de parada prematuros, o que compromete sua atividade de controle da proliferação celular (VARELA et al., 2011). Os níveis relativos de mRNA para HMG-box foram maiores nessas linhagens. Adicionalmente, as análises com os tecidos neoplásicos da próstata por imunohistoquímica mostraram que PBRM1 apresentou-se mais expresso no núcleo que nos demais compartimentos celulares, correlacionando com elevado grau de Gleason. Portanto, tanto nas células consideradas mais agressivas, quanto em pacientes com tumores mais indiferenciados e avançados, os níveis de HMG-box se apresentaram mais elevados. De fato, este desempenha diferentes funções conforme os compartimentos celulares em que são encontrados, na mitocôndria ligando ao DNA, no citoplasma direcionando a sinalização e no meio extracelular em citocinas inflamatórias. No núcleo suas atividades são diversas, regulando a maquinaria molecular (WUNDERLICH e BOTTGER, 1997; UEDA e YOSHIDA, 2010; MALARKEY e CHURCHILL, 2012).

A perda de expressão de PBRM1 pode promover o câncer ao redirecionar o complexo SWI/SNF a um diferente conjunto de genes promotores de tumor (MURAKAMI et al., 2017), evidenciando a importância de PBRM1 para a especificidade de PBAF (PORTER e DYKHUIZEN, 2017). Nesse sentido, mostramos que nas células PC3 e DU145 a alteração estrutural da proteína poderia determinar sua associação a diferentes fatores transpcionais e, assim, se ligar a outros locais no DNA regulando genes envolvidos com a progressão do tumor.

Portanto, PBRM1 tem um nítido comportamento dicotômico no CaP, em que sua expressão completa ou truncada resultam no seu envolvimento em diferentes eventos celulares, diretamente correlacionados às características da doença. PBRM1 é necessário para a expressão de p21 e para a parada do ciclo celular em células de câncer de mama após o tratamento com o Fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Xia et al., 2008). Por outro lado, em fibroblastos embrionários de camundongos, PBRM1 suprime a expressão de p21 e a sua deleção desencadeia a parada do ciclo e a senescência celulares (Lee et al., 2016). Esses achados corroboram nossa afirmação de que, no CaP, PBRM1 tenha um comportamento singular, uma vez que o gene se comporta conforme os tipos celulares estudados.

A localização de PBRM1 seria resultado da sua interação com diferentes proteínas co-ativadoras ou co-repressoras, que modulariam sua função. Nesse cenário, visto que as células PC3 e DU145 são hormônios refratárias (também conhecido como CaP resistente à castração), o AR continua sendo condutor relevante nesta progressão ao recrutar, também, fatores transpcionais (CHISM et al., 2014; CHANDRASEKAR et al., 2015; CRONA et al., 2015; GALLETTI et al., 2017). PBRM1 parece coordenar a via androgênica e modular o comportamento das células mediante a resposta hormonal, definindo, assim, seu comportamento.

Sabe-se que o AR coordena a expressão gênica levando a mudanças na conformação da cromatina durante a tumorigênese da próstata. Há relatos mostrando que o complexo SWI/SNF interage com esse receptor (ROULEAU et al., 2002; SITZ et al., 2004). Em especial, a subunidade BAF57 é necessária para a ativação de genes AR-dependente em células de adenocarcinoma prostático e que, juntamente com a subunidade BRM são fundamentais para a transcrição de

genes envolvidos com a via androgênica (MARSHALL et al., 2003; LINK et al., 2005).

Vários estudos vêm sendo conduzidos sugerindo que múltiplos fatores de crescimento, citocinas e quinases aumentam a sinalização da via relacionada ao AR, promovendo assim a progressão para a resistência à castração de maneira independente do ligante (WANG et al., 2009; SHTIVELMAN et al., 2014). Sugerimos que sua localização nuclear truncada esteja envolvida nesses mecanismos, comprometendo, por conseguinte, a sobrevida dos pacientes.

Fato é que, a identificação e caracterização dessas vias androgênicas mediadas por PBRM1 podem levar a terapias direcionadas. Estudos adicionais são, portanto, necessários para melhor elucidar como AR modula PBRM1 (ou vice versa) dentro das células e como essas vias de sinalização convergem para a progressão do CaP.

Nossos resultados fornecem a base para um estudo de genética molecular biologicamente significativo e clinicamente relevante que pode influenciar estratégias para melhorar compreensão do CaP. Finalmente, a pesquisa de *splicing* alternativo em tumores da próstata pode revelar novos eventos em transformação maligna com diferentes resultados clínicos.

De fato, devemos nos esforçar para compreender a interação dessa proteína com outras moléculas que estão modulando a sua localização e expressão, que nitidamente afetam a ocorrência e progressão do CaP. Importante ressaltar, no entanto, que este estudo não é simplesmente um estudo de biomarcador. Da mesma forma, estamos identificando, pela primeira vez, eventos moleculares em transformação maligna da próstata, que sugerem caminhos de cooperação necessários até então não descritos. Futuras análises se mostram primordiais para elucidar esse comportamento dicotômico de PBRM1 no CaP.

## 5. CONCLUSÃO

Neste estudo mostramos as primeiras evidências da expressão e significado clínico de PBRM1 no CaP, sugerindo que a expressão diferencial dos seus domínios PBRM1 pode estar envolvida no desenvolvimento e progressão da doença. Não somente a expressão, mas a localização desta proteína fornece evidências valiosas para uma melhor compreensão da biologia tumoral. Portanto, a elucidação da transcrição diferencial de genes, em especial o *splicing* alternativo, se torna uma ferramenta para identificação de eventos moleculares relacionados à transformação maligna. Além disso, a identificação de vias oncogênicas e proteínas que modulam ou são modulados por PBRM1 pode se tornar estratégias adicionais no tratamento e diagnóstico da doença.

## ANEXOS

### **Anexo I: Classificação Tumor, Nódulo, Metástase (TNM) de câncer de próstata**

<b>Tumor Primário</b>	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor não diagnosticado clinicamente, não palpável ou visível por meio de exame de imagem
T1a	Achado histológico incidental em < 5% do tecido ressecado
T1b	Achado histológico incidental em > 5% do tecido ressecado
T1c	Tumor identificado por biópsia de agulha, devido à PSA elevado
T2	Tumor limitado à próstata
T2a	Envolve metade ou menos de um dos lobos
T2b	Envolve mais do que a metade de um dos lobos
T2c	Envolve os dois lobos
T3	Tumor se extende através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular unilateral ou bilateral
T3b	Tumor invade vesículas seminais
T4	Tumor está fixo ou invade outras estruturas adjacentes, que não as vesículas seminais: colo vesical, sfíncter externo, reto, músculos elevadores e/ou parede pélvica
N	<b>Linfonodos Regionais</b>
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional
N1	Metástase em linfonodo regional
M	<b>Metástase à distância</b>
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
M1a	Linfonodos não regionais
M1b	Ossos
M1c	Outras localizações

## REFERÊNCIAS

Araujo, T. G. et al. Dynamic dialog between cytokeratin 18 and annexin A1 in breast cancer: a transcriptional disequilibrium. *Acta Histochem*, v. 116, n. 7, Sep, p. 1178-84. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2014.06.008>

PMid:25028131

Bai, L. et al. Targeted Degradation of BET Proteins in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res*, v. 77, n. 9, May 01, p. 2476-2487. 2017.

Barbieri, I. et al. Bromodomains as therapeutic targets in cancer. *Brief Funct Genomics*, v. 12, n. 3, May, p. 219-30. 2013.

<https://doi.org/10.1093/bfgp/elt007>

PMid:23543289

BARREIRO-ALONSO, A. et al. High Mobility Group B Proteins, Their Partners, and Other Redox Sensors in Ovarian and Prostate Cancer. *Oxid Med Cell Longev*, v. 2016, n., p. 5845061. 2016.

Berg, K. D. The prognostic and predictive value of TMPRSS2-ERG gene fusion and ERG protein expression in prostate cancer biopsies. *Dan Med J*, v. 63, n. 12, Dec, p. 2016.

Boesen, L. Multiparametric MRI in detection and staging of prostate cancer. *Dan Med J*, v. 64, n. 2, Feb, p. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Tipos de Câncer: Próstata. . Rio de Janeiro, 2017. Disponível em<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata>>. Acesso em junho de 2017.

Brownlee, P. M. et al. Cancer and the bromodomains of BAF180. *Biochem Soc Trans*, v. 40, n. 2, Apr, p. 364-9. 2012.

<https://doi.org/10.1042/BST20110754>

PMid:22435813

Burrows, A. E. et al. Polybromo-associated BRG1-associated factor components BRD7 and BAF180 are critical regulators of p53 required for induction of replicative senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, n. 32, Aug 10, p. 14280-5. 2010.

Chandrasekar, T. et al. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*, v. 4, n. 3, Jun, p. 365-80. 2015.

PMid:26814148 PMCid:PMC4708226

Chism, D. D. et al. Mechanisms of acquired resistance to androgen receptor targeting drugs in castration-resistant prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, v. 14, n. 11, Nov, p. 1369-78. 2014.

<https://doi.org/10.1586/14737140.2014.928594>

PMid:24927631 PMCid:PMC4221359

Crona, D. J. et al. Androgen receptor targeting drugs in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance. *Clin Pharmacol Ther*, v. 98, n. 6, Dec, p. 582-9. 2015.

<https://doi.org/10.1002/cpt.256>

PMid:26331358 PMCid:PMC4715745

Cronauer, M. V. et al. Inhibition of p53 function diminishes androgen receptor-mediated signaling in prostate cancer cell lines. *Oncogene*, v. 23, n. 20, Apr 29, p. 3541-9. 2004.

PMid:15077179

Da Costa, W. H. et al. Polybromo-1 (PBRM1), a SWI/SNF complex subunit is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int*, v. 113, n. 5b, May, p. E157-63. 2014.

<https://doi.org/10.1111/bju.12426>

PMid:24053427

Donaldson, L. F. e Beazley-Long, N. Alternative RNA splicing: contribution to pain and potential therapeutic strategy. *Drug Discov Today*, v., n., Jun 18, p. 2016.

FILELLA, X. e FOJ, L. Prostate Cancer Detection and Prognosis: From Prostate Specific Antigen (PSA) to Exosomal Biomarkers. *Int J Mol Sci*, v. 17, n. 11, Oct 26, p. 2016.

Filippakopoulos, P. et al. Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell*, v. 149, n. 1, Mar 30, p. 214-31. 2012.

Fujisawa, T. e Filippakopoulos, P. Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 18, n. 4, Apr, p. 246-262. 2017.

<https://doi.org/10.1038/nrm.2016.143>

PMid:28053347

FUNG, J. J. et al. Registered report: Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukemia. *Elife*, v. 4, n., Sep 01, p. 2015.

Galletti, G. et al. Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer Treat Rev*, v. 57, n., Jun, p. 16-27.

2017.

GAUDREAU, P. O. et al. The Present and Future of Biomarkers in Prostate Cancer: Proteomics, Genomics, and Immunology Advancements. *Biomark Cancer*, v. 8, n. Suppl 2, p. 15-33. 2016.

Ghoshal, A. et al. BET inhibitors in cancer therapeutics: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, v. 26, n. 4, p. 505-22. 2016.

<https://doi.org/10.1517/13543776.2016.1159299>

PMid:26924192

Goodwin, G. H. e Nicolas, R. H. The BAH domain, polybromo and the RSC chromatin remodelling complex. *Gene*, v. 268, n. 1-2, May 02, p. 1-7. 2001.

Grozescu, T. e Popa, F. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life*, v. 10, n. 1, Jan-Mar, p. 5-12. 2017.

PMid:28255369 PMCid:PMC5304372

Gurel, B. et al. Molecular alterations in prostate cancer as diagnostic, prognostic, and therapeutic targets. *Adv Anat Pathol*, v. 15, n. 6, Nov, p. 319-31. 2008.

<https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31818a5c19>

PMid:18948763 PMCid:PMC3214657

Hanahan, D. e Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, Mar 4, p. 646-74. 2011.

Hansen, R. L. et al. Smarcc1 expression: a significant predictor of disease-specific survival in patients with clinically localized prostate cancer treated with no intention to cure. *Scand J Urol Nephrol*, v. 45, n. 2, Mar, p. 91-6. 2011.

<https://doi.org/10.3109/00365599.2010.530295>

PMid:21087120

Heeboll, S. et al. SMARCC1 expression is upregulated in prostate cancer and positively correlated with tumour recurrence and dedifferentiation. *Histol Histopathol*, v. 23, n. 9, Sep, p. 1069-76. 2008.

PMid:18581278

HELMING, K. C. et al. Vulnerabilities of mutant SWI/SNF complexes in cancer. *Cancer Cell*, v. 26, n. 3, Sep 08, p. 309-17. 2014.

Horikawa, I. e Barrett, J. C. cDNA cloning of the human polybromo-1 gene on chromosome 3p21. *DNA Seq*, v. 13, n. 4, Aug, p. 211-5. 2002.

<https://doi.org/10.1080/1042517021000021590>

PMid:12487023

Huang, L. et al. PBRM1 suppresses bladder cancer by cyclin B1 induced cell

cycle arrest. *Oncotarget*, v. 6, n. 18, Jun 30, p. 16366-78. 2015.

Huang, Y. et al. Regulation of GLI Underlies a Role for BET Bromodomains in Pancreatic Cancer Growth and the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res*, v. 22, n. 16, Aug 15, p. 4259-70. 2016.

Ibragimova, I. et al. Aberrant promoter hypermethylation of PBRM1, BAP1, SETD2, KDM6A and other chromatin-modifying genes is absent or rare in clear cell RCC. *Epigenetics*, v. 8, n. 5, May, p. 486-93. 2013.

<https://doi.org/10.4161/epi.24552>

PMid:23644518 PMCid:PMC3741218

JAIN, A. K. e BARTON, M. C. Bromodomain Histone Readers and Cancer. *J Mol Biol*, v., n., Nov 24, p. 2016.

Jiang, N. et al. A-methylacyl-CoA racemase (AMACR) and prostate-cancer risk: a meta-analysis of 4,385 participants. *PLoS One*, v. 8, n. 10, p. e74386. 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074386>

PMid:24130666 PMCid:PMC3794046

Kaur, G. et al. Bromodomain and hedgehog pathway targets in small cell lung cancer. *Cancer Lett*, v. 371, n. 2, Feb 28, p. 225-39. 2016.

Kim, J. Y. et al. The Impact of PBRM1 Expression as a Prognostic and Predictive Marker in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Urol*, v. 194, n. 4, Oct, p. 1112-9. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.04.114>

PMid:25997916

Lapuk, A. V. et al. The role of mRNA splicing in prostate cancer. *Asian J Androl*, v. 16, n. 4, Jul-Aug, p. 515-21. 2014.

<https://doi.org/10.4103/1008-682X.127825>

PMid:24830689 PMCid:PMC4104073

Lee, H. et al. BAF180 regulates cellular senescence and hematopoietic stem cell homeostasis through p21. *Oncotarget*, v. 7, n. 15, Apr 12, p. 19134-46. 2016.

LEE, H. et al. Analysis of nuclear high mobility group box 1 (HMGB1)-binding proteins in colon cancer cells: clustering with proteins involved in secretion and extranuclear function. *J Proteome Res*, v. 9, n. 9, Sep 03, p. 4661-70. 2010.

Leyten, G. H. et al. Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer. *Eur Urol*, v. 65, n. 3, Mar, p. 534-42. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.11.014>

PMid:23201468

Lindsey, S. e Langhans, S. A. Crosstalk of Oncogenic Signaling Pathways during Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Oncol*, v. 4, n., p. 358. 2014.

LINK, K. A. et al. Targeting the BAF57 SWI/SNF subunit in prostate cancer: a novel platform to control androgen receptor activity. *Cancer Res*, v. 68, n. 12, Jun 15, p. 4551-8. 2008.

Link, K. A. et al. BAF57 governs androgen receptor action and androgen-dependent proliferation through SWI/SNF. *Mol Cell Biol*, v. 25, n. 6, Mar, p. 2200-15. 2005.

<https://doi.org/10.1128/MCB.25.6.2200-2215.2005>

PMid:15743818 PMCid:PMC1061596

Liu, X. B. et al. [Expression of BRG1 and BRM proteins in prostatic cancer].

*Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, v. 39, n. 9, Sep, p. 591-4. 2010.

PMid:21092585

Liu, Y. The context of prostate cancer genomics in personalized medicine. *Oncol Lett*, v. 13, n. 5, May, p. 3347-3353. 2017.

<https://doi.org/10.3892/ol.2017.5911>

PMid:28521441 PMCid:PMC5431214

LU, C. e ALLIS, C. D. SWI/SNF complex in cancer. *Nat Genet*, v. 49, n. 2, Jan 31, p. 178-179. 2017.

Macher-Goeppinger, S. et al. PBRM1 (BAF180) protein is functionally regulated by p53-induced protein degradation in renal cell carcinomas. *J Pathol*, v. 237, n. 4, Dec, p. 460-71. 2015.

<https://doi.org/10.1002/path.4592>

PMid:26178300

Malarkey, C. S. e Churchill, M. E. The high mobility group box: the ultimate utility player of a cell. *Trends Biochem Sci*, v. 37, n. 12, Dec, p. 553-62. 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.09.003>

PMid:23153957 PMCid:PMC4437563

MARSHALL, T. W. et al. Differential requirement of SWI/SNF for androgen receptor activity. *J Biol Chem*, v. 278, n. 33, Aug 15, p. 30605-13. 2003.

McGuire, B. B. et al. Outcomes in patients with Gleason score 8-10 prostate cancer: relation to preoperative PSA level. *BJU Int*, v. 109, n. 12, Jun, p. 1764-9. 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10628.x>

PMid:22017732

Mo, D. et al. Low PBRM1 identifies tumor progression and poor prognosis in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 8, n. 8, p. 9307-13. 2015.  
PMid:26464681 PMCid:PMC4583913

MOHRMANN, L. e VERRIJZER, C. P. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta*, v. 1681, n. 2-3, Jan 11, p. 59-73. 2005.

MONTE, E. et al. Reciprocal Regulation of the Cardiac Epigenome by Chromatin Structural Proteins Hmgb and Ctcf: IMPLICATIONS FOR TRANSCRIPTIONAL REGULATION. *J Biol Chem*, v. 291, n. 30, Jul 22, p. 15428-46. 2016.

Morris, M. R. e Latif, F. The epigenetic landscape of renal cancer. *Nat Rev Nephrol*, v. 13, n. 1, Jan, p. 47-60. 2017.

<https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.168>

PMid:27890923

Nam, R. K. et al. MiR-301a regulates E-cadherin expression and is predictive of prostate cancer recurrence. *Prostate*, v. 76, n. 10, Jul, p. 869-84. 2016.

<https://doi.org/10.1002/pros.23177>

PMid:26990571

Narayan, V. M. et al. Novel biomarkers for prostate cancer: An evidence-based review for use in clinical practice. *Int J Urol*, v. 24, n. 5, May, p. 352-360. 2017.

<https://doi.org/10.1111/iju.13326>

PMid:28345187

Neves, A. F. et al. Prostate cancer antigen 3 (PCA3) RNA detection in blood and tissue samples for prostate cancer diagnosis. *Clin Chem Lab Med*, v. 51, n. 4, Apr, p. 881-7. 2013.

<https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0392>

PMid:23241599

Nunes, S. B. et al. Association of vitamin D receptor variants with clinical parameters in prostate cancer. *Springerplus*, v. 5, n., p. 364. 2016.

Oike, T. et al. Inactivating mutations in SWI/SNF chromatin remodeling genes in human cancer. *Jpn J Clin Oncol*, v. 43, n. 9, Sep, p. 849-55. 2013.

<https://doi.org/10.1093/jco/hyt101>

PMid:23904343

Oltean, S. e Bates, D. O. Hallmarks of alternative splicing in cancer. *Oncogene*, v. 33, n. 46, Nov 13, p. 5311-8. 2014.

PAWLOWSKI, R. et al. Loss of PBRM1 expression is associated with renal cell carcinoma progression. *Int J Cancer*, v. 132, n. 2, Jan 15, p. E11-7. 2013.

Peluso, S. e Chiappetta, G. High-Mobility Group A (HMGA) Proteins and Breast Cancer. *Breast Care (Basel)*, v. 5, n. 2, p. 81-85. 2010.

<https://doi.org/10.1159/000297717>

PMid:20847819 PMCid:PMC2931040

PORTER, E. G. e DYKHUIZEN, E. C. Individual Bromodomains of Polybromo-1 Contribute to Chromatin Association and Tumor Suppression in Clear Cell Renal Carcinoma. *J Biol Chem*, v., n., Jan 04, p. 2017.

Prensner, J. R. et al. The long noncoding RNA SChLAP1 promotes aggressive prostate cancer and antagonizes the SWI/SNF complex. *Nat Genet*, v. 45, n. 11, Nov, p. 1392-8. 2013.

<https://doi.org/10.1038/ng.2771>

PMid:24076601 PMCid:PMC3812362

Rodrigues, D. N. et al. The molecular underpinnings of prostate cancer: impacts on management and pathology practice. *J Pathol*, v. 241, n. 2, Jan, p. 173-182. 2017.

<https://doi.org/10.1002/path.4826>

PMid:27753448

Rouleau, N. et al. Novel ATPase of SNF2-like protein family interacts with androgen receptor and modulates androgen-dependent transcription. *Mol Biol Cell*, v. 13, n. 6, Jun, p. 2106-19. 2002.

<https://doi.org/10.1091/mbc.01-10-0484>

PMid:12058073 PMCid:PMC117628

RUSSO, A. et al. Molecular signalling involving intrinsically disordered proteins in prostate cancer. *Asian J Androl*, v., n., May 20, p. 2016.

Sharma, P. et al. Biomarkers for prostate cancer: present challenges and future opportunities. *Future Sci OA*, v. 2, n. 1, Mar, p. FSO72. 2016.

<https://doi.org/10.4155/fso.15.72>

PMid:28031932 PMCid:PMC5137959

Sharma, S. et al. Prostate cancer diagnostics: Clinical challenges and the ongoing need for disruptive and effective diagnostic tools. *Biotechnol Adv*, v. 35, n. 2, Mar - Apr, p. 135-149. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.11.009>

PMid:27939303

SHEN, H. et al. The SWI/SNF ATPase Brm is a gatekeeper of proliferative control in prostate cancer. *Cancer Res*, v. 68, n. 24, Dec 15, p. 10154-62. 2008.

Shtivelman, E. et al. Molecular pathways and targets in prostate cancer.

Oncotarget, v. 5, n. 17, Sep 15, p. 7217-59. 2014.

Sitz, J. H. et al. Dyrk1A potentiates steroid hormone-induced transcription via the chromatin remodeling factor Arip4. Mol Cell Biol, v. 24, n. 13, Jul, p. 5821-34. 2004.

<https://doi.org/10.1128/MCB.24.13.5821-5834.2004>

PMid:15199138 PMCid:PMC480880

Stuhlmiller, T. J. et al. Inhibition of Lapatinib-Induced Kinome Reprogramming in ERBB2-Positive Breast Cancer by Targeting BET Family Bromodomains. Cell Rep, v. 11, n. 3, Apr 21, p. 390-404. 2015.

Thompson, M. Polybromo-1: the chromatin targeting subunit of the PBAF complex. Biochimie, v. 91, n. 3, Mar, p. 309-19. 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.10.019>

PMid:19084573 PMCid:PMC2646799

Ueda, T. e Yoshida, M. HMGB proteins and transcriptional regulation. Biochim Biophys Acta, v. 1799, n. 1-2, Jan-Feb, p. 114-8. 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.11.005>

PMid:20123073

Urquidi, V. et al. Molecular diagnostic trends in urological cancer: biomarkers for non-invasive diagnosis. Curr Med Chem, v. 19, n. 22, p. 3653-63. 2012.

<https://doi.org/10.2174/092986712801661103>

PMid:22680923 PMCid:PMC3428062

VARELA, I. et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. Nature, v. 469, n. 7331, Jan 27, p. 539-42. 2011.

Wang, Q. et al. Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer. Cell, v. 138, n. 2, Jul 23, p. 245-56. 2009.

Wilson, B. G. e Roberts, C. W. SWI/SNF nucleosome remodelers and cancer. Nat Rev Cancer, v. 11, n. 7, Jul, p. 481-92. 2011.

<https://doi.org/10.1038/nrc3068>

PMid:21654818

WISE, H. M. et al. Prostate cancer, PI3K, PTEN and prognosis. Clin Sci (Lond), v. 131, n. 3, Feb 01, p. 197-210. 2017.

Wu, J. N. e Roberts, C. W. ARID1A mutations in cancer: another epigenetic tumor suppressor? Cancer Discov, v. 3, n. 1, Jan, p. 35-43. 2013.

<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0361>

PMid:23208470 PMCid:PMC3546152

Wunderlich, V. e Bottger, M. High-mobility-group proteins and cancer--an emerging link. *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 123, n. 3, p. 133-40. 1997.  
PMid:9119878

Wyatt, A. W. et al. The diverse heterogeneity of molecular alterations in prostate cancer identified through next-generation sequencing. *Asian J Androl*, v. 15, n. 3, May, p. 301-8. 2013.  
<https://doi.org/10.1038/aja.2013.13>  
PMid:23503423 PMCid:PMC3739651

Xia, W. et al. BAF180 is a critical regulator of p21 induction and a tumor suppressor mutated in breast cancer. *Cancer Res*, v. 68, n. 6, Mar 15, p. 1667-74. 2008.

Yang, N. e Xu, R. M. Structure and function of the BAH domain in chromatin biology. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 48, n. 3, May-Jun, p. 211-21. 2013.  
<https://doi.org/10.3109/10409238.2012.742035>  
PMid:23181513

Zeng, L. e Zhou, M. M. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett*, v. 513, n. 1, Feb 20, p. 124-8. 2002.

Zhang, Y. et al. High-mobility group A1 proteins enhance the expression of the oncogenic miR-222 in lung cancer cells. *Mol Cell Biochem*, v. 357, n. 1-2, Nov, p. 363-71. 2011.  
<https://doi.org/10.1007/s11010-011-0907-1>  
PMid:21656127

ZHOU, B. et al. Discovery of a Small-Molecule Degrader of Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Proteins with Picomolar Cellular Potencies and Capable of Achieving Tumor Regression. *J Med Chem*, v., n., Mar 24, p. 2017.

ZHU, H. et al. Computational Prediction and Validation of BAHD1 as a Novel Molecule for Ulcerative Colitis. *Sci Rep*, v. 5, n., Jul 17, p. 12227. 2015.