

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ISABELLA CASTRO MARTINS

**PERFIL TRANSCRICIONAL DO GENE *ARID1A* EM CÉLULAS DE CÂNCER DE
PRÓSTATA**

PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2018

ISABELLA CASTRO MARTINS

**PERFIL TRANSCRICIONAL DO GENE *ARID1A* EM CÉLULAS DE CÂNCER DE
PRÓSTATA**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Prof (a). Dr (a). Thaise Gonçalves de
Araújo**

**PATOS DE MINAS - MG
DEZEMBRO DE 2018**

ISABELLA CASTRO MARTINS

Perfil transcricional do gene *ARID1A* em células de Câncer de Próstata

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – IBTEC
Presidente

MSc. Mariana Alves Pereira Zóia – IBTEC
Membro

MSc. Sara Teixeira Soares Mota – IBTEC
Membro

Patos de Minas - MG, 11 de dezembro de 2018.

“Senhor, fazei-me instrumento da Vossa paz (...)

Ó Mestre, fazei que eu procure mais:

Consolar, que ser consolado;

Compreender, que ser compreendido;

Amar, que ser amado.

Pois é dando que se recebe.

É perdoando que se é perdoado.

E é morrendo que se vive para a vida eterna.”

Oração de São Francisco de Assis

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus que me concedeu o dom da vida e saúde. Que está sempre ao meu lado guiando todos os meus passos.

Aos meus pais, Moacir e Celeste, que sempre me apoiaram e deram todo suporte necessário para que eu pudesse chegar até aqui. Amo muito vocês!!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho; por me acolher em seu grupo de pesquisa; pela confiança e paciência em todos os momentos e pelos inúmeros ensinamentos que contribuíram para meu crescimento científico e pessoal.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética e Biotecnologia – GBio, por todo auxílio. Desejo para todos muito sucesso em suas pesquisas!

À Profa. Dra. Cristina Ribas Fürstenau e à todos os membros do Laboratório de Cultura de Células Animais – LACCA, pela prestatividade e cooperação.

Ao Douglas, à Luisa, à Raquel e à Paulinha, pela parceria em tantos experimentos em ambos os laboratórios.

À MSc. Mariana Zóia e à MSc. Sara Mota, pela disponibilidade de participarem da banca examinadora e dividirem comigo este momento tão especial.

À todos os docentes, por contribuírem ativamente para minha formação acadêmica, e à todos os técnicos e funcionários da UFU – Patos de Minas, pelos serviços prestados.

À Liga Nacional dos Acadêmicos em Biotecnologia – LiNA Biotec, pela oportunidade de integrar a equipe e pela troca de conhecimentos com todos os seus membros.

Aos grandes amigos que conheci na faculdade: Willow, Leonardo, Iara, Mikaelle, João Lucas, Pedro Henrique e Flávia. Agradeço pela companhia nos estudos, lanches, festas e em tantos outros momentos felizes e agradáveis. Nunca me esquecerei desses anos, vocês são amigos que levarei para toda a vida!

Aos velhos amigos: Alisson, Larissa, Thamires, Mariana, Bárbara, Iago e Sávio, por vibrarem comigo a cada conquista (mesmo não entendendo nada sobre o meu curso rsrs); pelos conselhos, paciência e cumplicidade há tantos anos!

Às pinschers queridas Amora, Pretinha e Mel, pela companhia diária enquanto me dedicava a escrita deste trabalho. Vocês, e o Barão, são a alegria da família e as criaturinhas mais puras e carinhosas desse mundo!

À toda a minha família. Em especial aos meus pais, Moacir e Celeste, pelo amor incondicional, ao meu irmão Iury, pelo companheirismo. Amo muito vocês!!

À todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

O Câncer de Próstata (CaP) é, atualmente, o segundo tipo mais frequente entre os homens brasileiros, ficando atrás somente do câncer de pele não melanoma. O surgimento e a progressão dessa neoplasia maligna estão associados a diversos eventos moleculares que controlam a expressão de diferentes genes. A proteína ARID1A é uma das subunidades que confere especificidade ao complexo de remodelagem da cromatina SWI/SNF (BAF), descrita como supressora tumoral. Porém, seu papel no CaP ainda não foi elucidado. Nesse sentido, avaliamos o papel dos transcritos do gene *ARID1A* na tumorigênese prostática por qPCR, bem como correlacionamos sua expressão com os níveis de mRNA dos genes *ANXA1*, *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2*. Foram extraídos o mRNA total das linhagens tumorais prostáticas LNCaP (hormônio-dependente), DU145 e PC3 (hormônio-independentes) e da não-tumorigênica RWPE-1. Foi otimizado o método Cq comparativo a fim de avaliar os transcritos normalizados pelo gene *B2M*. A expressão de *ARID1A* foi 1,22 e 1,15 vezes maior nas linhagens LNCaP e PC3 quando comparadas à RWPE-1 ($P<0,05$; $P<0,01$, respectivamente). A expressão de mRNA de *ANXA1* diminuiu na linhagem hormônio-dependente, com transcritos significativamente maiores em DU145 e PC3. Foram detectados transcritos dos genes *AR* e *PSA* apenas na linhagem LNCaP. Para o *AR-V7* seus níveis transcricionais se mostraram elevados em LNCaP, comparando-se à DU145 (20,13 vezes) e à PC3 (4,64 vezes) ($P<0,01$; $P<0,01$). A expressão de *HER2* também se destacou em LNCaP. Nesta, 8,43, 9,34 e 4,43 mais transcritos foram quantificados quando comparados à RWPE-1, DU145 e PC3, respectivamente ($P<0,0001$; $P<0,0001$; $P<0,001$). Os resultados para *ARID1A* não se correlacionaram com os demais. Foi verificada uma correlação negativa entre *ANXA1* e os alvos *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2*. Estes quatro últimos apresentaram correlação positiva entre si ($R>0,94$). Os resultados sugerem que *ARID1A* esteja envolvido no surgimento ou desenvolvimento inicial do CaP, que a perda de *ANXA1* em LNCaP esteja relacionada com a gênese do tumor e sua posterior elevação em DU145 e PC3 pode estar associada à resistência a terapia hormonal. São necessários experimentos que avaliem o comportamento das proteínas produzidas por esses genes para posterior aplicação como biomarcadores direcionados ao CaP avançado.

Palavras-chave: Epigenética. qPCR. Marcador molecular. Remodelagem de cromatina. Complexo SWI/SNF.

ABSTRACT

Prostate cancer (CaP) is the second most common cancer among Brazilian men, after non-melanoma skin cancer. The onset and progression of this malignant neoplasm are associated with several molecular events that control the expression of different genes. The ARID1A protein is one of the subunits that confers specificity to the SWI / SNFA (BAF) chromatin remodeling complex, described as a tumor suppressor. However, its role in PCa has not yet been elucidated. In this sense, we analyzed the role of ARID1A gene transcripts in prostatic tumorigenesis by qPCR. We also correlated the expression of ARID1A with the mRNA levels of the ANXA1, AR, PSA, AR-V7 and HER2 genes. Total mRNA was extracted from LNCaP (hormone-dependent), DU145 and PC3 (hormone-independent) and non-tumorigenic RWPE-1 prostatic cell lines. The comparative Cq method was optimized to quantify the transcripts normalized by the B2M gene. The expression of ARID1A was 1.22 and 1.15 fold higher in LNCaP and PC3 lineages when compared to RWPE-1 ($P<0.05$; $P<0.01$, respectively). The mRNA expression of ANXA1 was downregulated in the hormone-dependent lineage, with significantly higher transcripts in DU145 and PC3. Transcripts of the AR and PSA genes were detected only in the LNCaP cell line ($P<0.001$; $P<0.0001$). The expression of AR-V7 increased in tumor cell lines, with higher transcriptional levels in LNCaP, compared to DU145 (20.13-fold) and PC3 (4.64-fold) ($P<0.01$; $P<0.01$). HER2 expression was also upregulated in LNCaP with increased transcripts (8.43-fold, 9.34-fold and 4.43-fold) when compared to RWPE-1, DU145 and PC3, respectively ($P<0.0001$; $P<0.0001$; $P<0.001$). The ARID1A transcripts did not correlate with the others. A negative correlation was verified between ANXA1 and the AR, PSA, AR-V7 and HER2 targets. The latter four presented a positive correlation with each other ($R>0.94$). The results suggest that ARID1A is involved in the onset or initial development of PCa. The loss of ANXA1 in LNCaP may be related to the tumor's genesis and the subsequent elevation of mRNA levels in DU145 and PC3 may be associated to the resistance to hormone therapy. Additional experiments are needed to evaluate the behavior of the proteins transcribed by these genes for validation of biomarkers to advanced PCa.

Keywords: Epigenetics. qPCR. Molecular marker. Remodeling of chromatin. SWI/SNF complex.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT: Serina/Treonina Quinase
ANXA1: Anexina A1
AR: Receptor de Andrógeno
ARID1A: Domínio 1A de Interação a Regiões Ricas em AT
ARID1B: Domínio 1B de Interação a Regiões Ricas em AT
ARID2: Domínio 2 de Interação a Regiões Ricas em AT
AR-V7: Variante 7 do Receptor de Andrógeno
ATP: Adenosina Trifosfato
B2M: Beta-2-Microglobulina
BAF: Complexo Fator Polibromo Associado a BRG-1 ou a BRM
BRG1: Gene 1 Relacionado a Brahma
BRM: Gene Brahma
CaP: Câncer de Próstata
cDNA:  cido Desoxirribonucleico Complementar
CPRC: Câncer de Próstata Resistente a Castração
DEPC: Dietil Pirocarbonato
DHT: Diidrotestosterona
DMEM: Meio de Eagle Modificado de Dulbecco
DNA:  cido Desoxirribonucleico
dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EGF: Fator de Crescimento Epidérmico
EP: Extrato de Pituitária
FBS: Soro Fetal Bovino
HER2: Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HPB: Hiperplasia Prostática Benigna
IMDM: Meio de Dulbecco Modificado de Iscove
LHRH: Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
MgCl₂: Cloreto de Magnésio
MMLV-RT: Enzima Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murino de Moloney.
mRNA:  cido Ribonucleico Mensageiro
mTOR: Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos
PAP: Fosfatase  cida Prostática
pb: Pares de Base
PBAF: Complexo Fator Polibromo Associado a BAF
PBRM1: Polibromo-1
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PI3K: Fosfatidilinositol-3-Quinase
PSA: Antígeno Prostático Específico
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RNA:  cido Ribonucleico
RNase: Ribonuclease
RPMI-1640: Meio produzido pelo Instituto Memorial Roswell Park
RT: Transcrição Reversa
SWI/SNF: Complexo *Switch*/Sacarose Não-Fermentável
TPA: Terapia de Privação Androgênica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Aspectos gerais sobre o câncer	12
2.2 O câncer de próstata	13
2.3 A terapia de bloqueio hormonal	14
2.4 Os biomarcadores tumorais	16
2.5 O complexo remodelador da cromatina SWI/SNF	17
2.5.1 A subunidade ARID1A	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Cultivo celular	21
3.2 Extração do RNA total	22
3.3 Transcrição reversa	22
3.4 PCR para validação das amostras	23
3.5 Ensaio de qPCR	23
3.6 Análises estatísticas	25
4 RESULTADOS	25
5 DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

O Câncer de Próstata (CaP) é uma doença complexa e biologicamente heterogênea. No Brasil, estima-se para o biênio 2018-2019 cerca de 61,62 novos casos a cada 100 mil homens (INCA, 2018). A alta incidência e morbidade tornam esta neoplasia maligna um importante problema de saúde pública no país.

Em geral, o CaP apresenta desenvolvimento lento, indolor e com poucos sintomas, sendo estes inespecíficos. Seu diagnóstico, quando precoce, é crucial para o sucesso terapêutico e para maiores chances de cura. Entretanto, mesmo recebendo tratamento adequado e, inicialmente, respondendo às terapias, grande parte dos pacientes progride para um estágio mais avançado da doença, definido como um quadro de resistência à privação androgênica (HUANG et al., 2018).

O estudo de alterações moleculares presentes em tumores prostáticos é, portanto, essencial para o esclarecimento das vias associadas à doença. Neste sentido, a compreensão de diferentes mecanismos relacionados à tumorigênese pode auxiliar na descoberta de novos biomarcadores para o CaP, uma vez que os marcadores moleculares disponíveis atualmente ainda apresentam limitações.

A subunidade Domínio 1A de Interação a Regiões Ricas em AT (ARID1A), constituinte do complexo remodelador da cromatina *Switch/Sacarose Não-Fermentável* (SWI/SNFA), se apresenta como importante objeto de estudo e promissor biomarcador para o CaP (LUCHINI et al., 2015). Seu comportamento como supressora tumoral, já descrito para outros tipos de cânceres, sugere seu papel-chave na modulação de mecanismos e sinais que conduzem ao surgimento e/ou progressão da doença (KADOCH et al., 2013).

É descrito na literatura que a redução da expressão de *ARID1A*, no câncer de mama, ativa a transcrição de *ANXA1* e modula a atividade de componentes da cascata de sinalização HER2/PI3K/mTOR. A correlação negativa entre esses genes contribui para a resistência de pacientes à terapia hormonal utilizando o anticorpo monoclonal Trastuzumabe e favorece a proliferação das células tumorais e a progressão da doença (BERNS et al., 2016).

Com base nesse estudo, hipotetizamos que, em células resistentes à terapia de bloqueio hormonal no CaP, há uma menor expressão da subunidade *ARID1A*, pertencente ao complexo remodelador da cromatina SWI/SNF. Ainda, acreditamos que a expressão de *ARID1A* esteja correlacionada a dos genes Anexina A1 (*ANXA1*), Receptor de Andrógeno (*AR*), Antígeno

Prostático Específico (*PSA*), Variante 7 do Receptor de Andrógeno (*AR-V7*) e Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*HER2*).

Nesse contexto, destacamos que o comportamento de *ARID1A* no CaP ainda têm sido pouco descrito. Assim, fornecemos novos caminhos para a definição de estratégias voltadas para o controle da progressão desses tumores e intervenção terapêutica, aumentando a sobrevida de pacientes e contribuindo para outras futuras associações gênicas envolvendo esta doença.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais sobre o câncer

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018), câncer é o nome atribuído a um conjunto de doenças que têm como principais características o crescimento anormal e a replicação rápida e desordenada de um conjunto de células. Diferentemente das células normais, as cancerígenas possuem menor especialização em suas funções, não obedecem ao controle do ciclo celular, dividem-se continuamente e não sinalizam para apoptose. Além disso, podem induzir à angiogênese com o intuito de suprir suas necessidades nutricionais e à demanda por oxigênio (ALMEIDA et al., 2005).

Tumores malignos são capazes de invadir tecidos vizinhos e, posteriormente, se desprenderem de seu grupamento original, percorrendo, por meio da corrente sanguínea ou sistema linfático, outras regiões do corpo até se fixarem em um novo local, fato conhecido como metástase (HANAHA; WEINBERG, 2011). As células presentes em tumores benignos não possuem essa capacidade, mas, em algumas situações, são demasiadamente grandes e comprometem a atividade de outros órgãos. Além disso, são compostos por células diferenciadas que se assemelham a seu tecido de origem, crescem mais lentamente e quando retirados, em sua maioria, não reincidem; fenótipo característico da malignidade (KREEGER; LAUFFENBURGER, 2010; HANAHA; WEINBERG, 2011).

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos estão relacionados à ocorrência de neoplasias. Condições ambientais, como exposição a radiações ionizantes e não ionizantes, produtos químicos, agentes infecciosos, além de hábitos e comportamentos, como tabagismo, alcoolismo, obesidade e alimentação, correspondem a aproximadamente 95% das causas

(RUIZ; HERNÁNDEZ, 2014; WHITEMAN; WILSON, 2016). Os tumores também podem ser provocados por razão hereditária, relativa à propensão genética, histórico familiar e etnia (NATIONAL CANCER INSTITUTE – NIH, 2015).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA (2018), estima-se, para o biênio 2018-2019, cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil. Para as mulheres, os mais frequentes serão o de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%) e pulmão (6,2%). Em homens, o principal corresponderá ao câncer de próstata (CaP) (31,7%), além do de pulmão (8,7%), intestino (8,1%) e estômago (6,3%).

2.2 O câncer de próstata

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino, com formato de noz, localizada abaixo da bexiga, na frente do reto e circunda a porção inicial da uretra, canal pelo qual a urina é transportada para o exterior (TOIVANEN; SHEN, 2017). É responsável pela produção e armazenamento de alguns componentes do líquido seminal, que nutrem e protegem os espermatozoides, até que sejam liberados durante o ato sexual (A.C.CAMARGO CANCER CENTER, 2018).

O tamanho deste órgão varia ao longo da vida, sendo em jovens menor do que em indivíduos adultos e idosos. A hiperplasia prostática benigna (HPB) é o crescimento e alargamento da próstata, comum em homens mais velhos. A ampliação da glândula faz com que a uretra seja esmagada, provocando dificuldade e dores na passagem da urina (AMERICAN CANCER SOCIETY – ACS, 2016). Apesar de ser um problema clínico muito importante, que requer cuidados e tratamentos especiais, a HPB não está correlacionada com a ocorrência do câncer (INSTITUTO ONCOGUIA, 2016).

No Brasil, o CaP é o segundo tipo mais frequente entre os homens, ficando atrás somente do câncer de pele não melanoma (INCA, 2018). O número de pacientes vem crescendo devido à evolução dos métodos de diagnóstico. Ainda, levando-se em conta o aumento da expectativa de vida da população e por se tratar de uma doença frequente em idosos, constitui um sério problema de saúde pública (INCA, 2017).

Em geral, o CaP possui desenvolvimento lento, indolente e assintomático. Quando os sintomas são detectados, se assemelham aos associados com outras patologias, como prostatites e HPB, incluindo micção frequente, fluxo urinário fraco ou interrompido, impotência, sangue no líquido seminal, dor ou ardor ao urinar e fraqueza ou dormência nas

pernas ou pés (INSTITUTO ONCOGUIA, 2017). Contudo, quando decorrentes da presença do tumor, correlacionam-se a uma doença já em estado avançado (CATALONA, 2018).

A detecção precoce encontra-se diretamente relacionada às chances de cura. Nesse sentido, a Sociedade Brasileira de Urologia (SBU, 2018) recomenda a dosagem anual do Antígeno Prostático Específico (PSA) e o toque retal para homens acima de 45 anos. De fato, o rastreamento em uma população assintomática de risco se torna uma estratégia crucial para o controle da doença (DAMIÃO et al., 2015). Além disso, para maior precisão diagnóstica, devem ser realizadas a ultrassonografia transretal, a biópsia e os estudos histopatológicos (BACELAR JUNIOR et al., 2015).

A escolha do melhor tratamento baseia-se no quadro clínico do paciente, sua idade, os níveis de PSA sérico, o estadiamento, a extensão do tumor e a diferenciação celular (CULIG; SANTER, 2014). Atualmente, diferentes abordagens estão disponíveis, cada qual com seus benefícios, riscos, efeitos colaterais e indicações. As principais estratégias padronizadas para o CaP primário são o rastreamento da doença, a prostatectomia radical, a radioterapia externa e a radioterapia interna (braquiterapia). Para a doença em estágio avançado, os tratamentos mais indicados são a quimioterapia, a imunoterapia, a terapia de privação androgênica (TPA) e tratamentos para dores ósseas provocadas pelas metástases (LITWIN; TAN, 2017; WEINER; KUNDU, 2018).

2.3 A terapia de bloqueio hormonal

A hormonioterapia é um tipo de tratamento que visa inibir ou bloquear a ação de hormônios que interferem no crescimento e desenvolvimento das células tumorais, sendo amplamente utilizada nos cânceres de mama e próstata (PONTES, 2018). Em geral, utiliza medicamentos administrados por via oral e pode ser complementar a outras metodologias ou ser empregada com finalidade paliativa (NIH, 2014).

O Receptor de Andrógeno (AR) é um fator de transcrição induzido por ligante, expresso tanto no CaP primário quanto no metastático (HÅÅG et al., 2005). Além disso, é o mais importante mediador de sinalização androgênica, sendo responsável por regular eventos celulares essenciais, como proliferação, diferenciação e apoptose, bem como o desenvolvimento normal e funções relacionadas à próstata (CULIG; SANTER, 2014). Portanto, pressupõe-se que alterações malignas nesta glândula ocorram, dentre outros fatores, devido à estimulação androgênica anormal (SCHALKEN, 2005).

Os principais hormônios sexuais masculinos endógenos que se ligam ao AR são a testosterona e a diidrotestosterona (DHT), produzidas nas células de Leydig nos testículos e em pequenas quantidades pelas glândulas suprarrenais (CHANDRASEKAR et al., 2015b). São responsáveis por controlar o desenvolvimento e a manutenção das características masculinas (NIH, 2014). Dessa forma, o recurso terapêutico baseia-se na regulação negativa dos níveis de androgênios circulantes no organismo ou bloqueio do receptor, sendo implementado no CaP avançado com o intuito de minimizar alguns sintomas da doença (PROSTATE CANCER INSTITUTE, 2018).

Diferentes metodologias são adotadas para o bloqueio hormonal. A TPA pode ser realizada com análogos, agonistas e antagonistas do Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante (LHRH); estrógenos; antiandrógenos, ou antagonistas de andrógenos (CHOI; LEE, 2011; GROSSMANN; CHEUNG; ZAJAC, 2013; PONTES, 2018). Cirurgicamente, realiza-se a orquiectomia bilateral, em que há a remoção dos testículos e, portanto, a privação da produção de testosterona (UROLOGY CARE FOUNDATION, 2018).

No entanto, muitos pacientes refratam à terapia, o que define o quadro de resistência à castração, clinicamente agressivo e preocupante. Nesses casos, há o aumento dos níveis de PSA e incidência de metástases, independentemente dos níveis hormonais circulantes (DAMIÃO et al., 2015). Pacientes com Câncer de Próstata Resistente à Castração (CPRC) apresentam pior prognóstico e menor tempo de sobrevida (HUANG et al., 2018).

Alguns genes encontram-se relacionados ao CPRC, como o gene Anexina A1 (*ANXA1*), que pertence a uma família de moduladores da resposta anti-inflamatória regulada por glicorticóides (SHEIKH; SOLITO, 2018). Alterações em sua expressão estão associadas à progressão dos tumores e risco à metástase, regulando a proliferação, invasão e migração celulares (BIAOXUE; XIGUANG; SHUANYING, 2014).

O gene *AR* também está correlacionado ao CaP avançado. Aberrações nas suas vias de sinalização e alterações em seus níveis de expressão estão presentes em, aproximadamente, 63% dos casos de CPRC (ROBINSON et al., 2015). Tais modificações são decorrentes de mutações pontuais, rearranjos estruturais genômicos, superexpressão, amplificação e processamento alternativo, gerando variantes de *splicing* (GRAHAM; SCHWEIZER, 2016; HO; DEHM, 2017). Atualmente, encontram-se descritas na literatura diversas variantes, tais como AR-V1, AR-V3, AR-V7, AR-V9 e AR^{v567es} (LUO et al., 2018). Dentre estas, a mais comumente expressa em linhagens celulares humanas e amostras clínicas é a Variante 7 do Receptor de Andrógeno (*AR-V7*) (BERRUTI; VOLTA, 2017), cuja expressão é associada ao menor tempo de sobrevida em pacientes com CPRC (LIU et al., 2014).

O *PSA* é um gene utilizado há aproximadamente 20 anos como biomarcador para o CaP (SAINI, 2016). Além disso, o monitoramento de seus níveis séricos permite avaliar a resposta dos pacientes à TPA. Durante a terapia, as concentrações de PSA diminuem drasticamente por um ou dois meses em cerca de 80% dos pacientes (TOMIOKA et al., 2014). Todavia, ao longo do tratamento, observa-se que o aumento de sua expressão está correlacionado ao CPRC, bem como à recorrência tumoral e à mortalidade pela doença em cerca de 7 anos (DUSKOVA; VESELY, 2015).

O Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*HER2*) é um proto-oncogene que, em condições fisiológicas normais, encontra-se desativado (LIU et al., 2014). Contudo, apresenta-se superexpresso e correlacionado a um pior prognóstico em diversos cânceres, como de mama, ovário, estômago e bexiga (PICCART-GEBHART et al., 2005; HANSEL et al., 2008; STEFFENSEN et al., 2008). A expressão elevada de *HER2* também está associada à recorrência e mortalidade por CaP (SHARIFI et al., 2016), bem como à sobrevivência das células tumorais na ausência de androgênios, possivelmente ativando o receptor, condição esta característica dos casos de CPRC (CRAFT et al., 1999; SIGNORETTI et al., 2000).

Desse modo, é imprescindível que haja maneiras de prognosticar clinicamente pacientes com propensão ao CPRC ou desvendar mecanismos moleculares associados ao seu funcionamento (WANG et al., 2018). Faz-se necessária a busca de novos marcadores moleculares para o CPRC, que sejam seletivos e sensíveis para predizerem a progressão da doença (TAILLE et al., 2016).

2.4 Os biomarcadores tumorais

Os marcadores tumorais são moléculas produzidas pelo tumor ou pelo próprio organismo em resposta à presença e ao desenvolvimento da neoplasia (OLIVEIRA; FONSECA, 2011). Estas substâncias podem ser proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, antígenos de superfície celular, hormônios, transcritos de RNA, metabólitos, genes e enzimas, identificadas na corrente sanguínea, tecidos e fluidos biológicos (OLIVEIRA; FONSECA, 2011; COSTA-PINHEIRO et al., 2015).

Os marcadores moleculares auxiliam no diagnóstico, prognóstico, detecção precoce de recorrência, localização de metástases e direcionamento de terapias (RODRIGUES; SALES, 2013; KALIA, 2015). Além disso, devem obedecer a diversos requisitos para que possam ser utilizados, como serem liberados para a circulação em níveis mensuráveis, serem altamente

específicos ao órgão ou tecido de origem e apresentarem alta seletividade, bem como valores preditivos positivos e negativos relevantes (DIAMANDIS, 2010). Finalmente, devem requerer métodos simples e, preferencialmente, não invasivos para suas dosagens (VELONAS et al., 2013).

Considerando o CaP, o biomarcador mais utilizado para seu rastreio e detecção precoce é o PSA. Contudo, este apresenta limitações quanto a sua especificidade, uma vez que seus níveis séricos são alterados em condições não malignas, como prostatite aguda, HPB e cateterização (HATAKEYAMA et al., 2016).

Portanto, compreender molecularmente o CaP se mostra relevante, pois a caracterização desses marcadores certamente conduzirá a novas perspectivas no manejo de pacientes com a doença (TONON; SCHOFFEN, 2009). Logo, será possível prever com maior confiança o estágio patológico do tumor, auxiliar na seleção de alvos terapêuticos e viabilizar associações entre características clínicas e tumorais (MARTIN et al., 2012).

Marcadores moleculares também incluem alterações epigenéticas. A epigenética é o estudo das modificações que ocorrem na expressão gênica mantendo-se a sequência primária de DNA (MULLER; PRADO, 2008; WU; SARKISSYAN; VADGAMA, 2014). Os mecanismos epigenéticos englobam modificações químicas tanto na molécula de DNA quanto nas histonas, possibilitando alterações estruturais na cromatina e nos nucleossomos (ELSNER; SIQUEIRA, 2016). Além disso, são relevantes na ativação e no silenciamento gênico, bem como na modulação de diferentes processos celulares (COSTA; PACHECO, 2013).

Na carcinogênese, eventos epigenéticos, como a metilação aberrante de DNA, modificações pós-traducionais de histonas, níveis de expressão alterados de RNAs não-codificantes, incluindo microRNAs (miRNAs), e a remodelagem de cromatina dependente de adenosina trifosfato (ATP), desempenham um papel importante ainda pouco explorado (OKUGAWA; GRADY; GOEL, 2015; GOODWIN; PICKETTS, 2018). Esta utiliza a energia da hidrólise do ATP para mobilizar e desempacotar os nucleossomos, possibilitando o controle dinâmico e acessibilidade à informação genética (CLAPIER et al., 2017).

2.5 O complexo remodelador da cromatina SWI/SNF

Os organismos eucariotos desenvolveram, ao longo do tempo, diversas estratégias para armazenar grandes quantidades de material genético dentro do núcleo de suas células. O DNA é conservado e compactado firmemente dentro da cromatina por meio de proteínas a esta

associada, formando assim estruturas conhecidas como nucleossomos (MCBRIDE; KADOCH, 2018). No entanto, para a ocorrência de eventos e modificações nos genes contidos nos nucleossomos, é necessário permitir o acesso à maquinaria celular (PIERRE; KADOCH, 2017).

O complexo de remodelagem da cromatina *Switch/Sacarose Não-Fermentável* (SWI/SNF) regula processos celulares-chave, como a progressão do ciclo celular, reparo de danos no DNA, diferenciação, estabilidade genômica e morte celular programada (BITLER; FATKHUTDINOV; ZHANG, 2015; ZHOU et al., 2016; SAVAS; SKARDASI, 2018). Contudo, ainda é incerto o mecanismo pelo qual o complexo é recrutado, pois sua afinidade depende da sequência de DNA subjacente, do compartimento celular em que se encontra, do tipo de tecido e da fase do ciclo celular (EUSKIRCHEN; AUERBACH; SNYDER, 2012).

A remodelagem da estrutura dos nucleossomos realizada pelo complexo SWI/SNF é capaz de mobilizá-los por deslizamento. Este evento envolve a ligação do complexo a uma região do DNA, a interrupção de seu contato com as histonas, a translocação do material e a formação de um laço de DNA, gerando sítios mais acessíveis a fatores regulatórios (BECKER; WORKMAN, 2013; NARLIKAR; SUNDARAMOORTHY; OWEN-HUGHES, 2013). Pode também ejetar e inserir octâmeros de histonas (SAHA; WITTMAYER; CAIRNS, 2006) possibilitando a abertura da estrutura da cromatina para a ocorrência de eventos moleculares posteriores (SARNOWSKA et al., 2016).

Em mamíferos, o complexo SWI/SNFA é constituído por um conjunto de macromoléculas com 12 a 15 subunidades agrupadas combinatoriamente a partir dos produtos de 29 genes (PULICE; KADOCH, 2016). Possui subunidades ATPásicas mutuamente exclusivas, denominadas Gene 1 Relacionado a Brahma (BRG1) e Gene Brahma (BRM) (RAAB et al., 2017). Ambas são capazes de alterar o posicionamento de nucleossomos e compartilham, aproximadamente, 75% de homologia em suas sequências (SKULTE et al., 2014; SAVAS; SKARDASI, 2018).

De acordo com a composição de suas subunidades, o complexo pode ser subdividido em duas famílias principais: (i) o complexo do Fator Polibromo Associado a BRG-1 ou a BRM (BAF), que inclui exclusivamente as subunidades Domínio 1A de Interação a Regiões Ricas em AT (ARID1A) ou Domínio 1B de Interação a Regiões Ricas em AT (ARID1B), além da subunidade catalítica BRG1 ou BRM; (ii) o complexo Fator Polibromo Associado a BAF (PBAF), caracterizado pela presença das subunidades Polibromo-1 (PBRM1) e Domínio 2 de Interação a Regiões Ricas em AT (ARID2) (WILLIAMSON et al., 2016; HODGES; KIRKLAND; CRABTREE, 2017) além de BRG1 (SENA; WANG; HU, 2013). Importante

destacar que estes dois grupos também compartilham oito subunidades idênticas, sendo essas BAF170, BAF155, BAF60a/b/c, BAF57, BAF53a/b, BAF47, BAF45a/b/c/d e beta-actina (BROWNLEE; MEISENBERG; DOWNS, 2015).

Com o advento dos sequenciamentos de nova geração, diversas mutações têm sido descritas nas proteínas constituintes do SWI/SNFA (TAKEDA et al., 2016; HUGHES; OWEN-HUGHES, 2017). Considerando a biologia tumoral, 20% dos cânceres humanos apresentam essas alterações, sendo responsáveis pelo aumento na sensibilidade a danos no DNA, evidenciando o papel dessas subunidades como supressoras tumorais (KADOCH et al., 2013; BIEGEL; BUSSE; WEISSMAN, 2014; PIERRE; KADOCH, 2017; MCBRIDE; KADOCH, 2018). De fato, a perda da função dessas proteínas tem sido associada à transformação oncogênica (MCBRIDE; KADOCH, 2018).

Dentre as mais mutadas destacam-se as subunidades BRG1 e BRM (SHAIN; POLLACK, 2013; RAAB et al., 2017) e os membros da família ARID (ARID1A, ARID1B e ARID2). Destes, ARID1A apresenta a maior taxa de mutação em carcinomas humanos (KADOCH et al., 2013; SAVAS; SKARDASI, 2018), incluindo tumores ginecológicos, carcinoma de células claras de ovário, de mama, de pâncreas, de estômago e de fígado (JONES et al., 2010; GUAN; WANG; SHIH, 2011; FUJIMOTO et al., 2012; WANG et al., 2014; CHO et al., 2015; CHANDLER et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

2.5.1 A subunidade ARID1A

O gene *ARID1A* está localizado na região 1p36.11 e possui atividade helicase e ATPase, regulando a transcrição de diferentes genes e direcionando o complexo SWI/SNFA para locais da cromatina que necessitem ser remodelados (NAGL et al., 2005; NIH, 2018). Em mamíferos, ARID1A é capaz de se ligar ao DNA desempenhando um papel crucial na homeostase ao regular genes relacionados à progressão do ciclo celular (WILSKER et al., 2004; HOHMANN et al., 2014).

A subunidade ARID1A, também conhecida como BAF250a, SMARCF1 ou p270, pertence a uma família de proteínas que contém um domínio de ligação ao DNA altamente conservado, com cerca de 100 aminoácidos (WU; WANG; SHIH, 2014; HE et al., 2015). ARID1A é constituída, portanto, por este domínio que se liga às sequências ricas em AT para que haja o reconhecimento do complexo SWI/SNFA e pelo domínio C-terminal, responsável por ativar a transcrição gênica favorecendo a interação de receptores nucleares hormonais (PAIVA, 2009; LUCHINI et al., 2015).

Sugere-se sua função como supressora tumoral, tanto como *caretaker*, conservando a integridade do genoma, quanto *gatekeeper*, auxiliando na regulação do ciclo celular e apoptose (LUCHINI et al., 2015). Sua inativação, por mutações somáticas ou mecanismos epigenéticos, contribui para a perda de suas funções e início do processo de carcinogênese (ALLDREDGE; ESKANDER, 2017).

Associações entre a expressão de *ARID1A* e o prognóstico de câncer de estômago, de bexiga, de intestino e de células claras renais já foram relatadas, sugerindo também seu potencial como marcador prognóstico (FARAJ et al., 2014; WEI, 2014; WIEGAND et al., 2014; PARK et al., 2015). Ainda, uma recente meta-análise mostrou que a perda de *ARID1A* também está associada a uma redução do tempo vida de pacientes com câncer e a recorrência de tumores ginecológicos, gastrointestinais e urológicos (LUCHINI et al., 2015). Contudo, a expressão do gene *ARID1A* e seu papel na carcinogênese prostática têm sido pouco investigados.

Segundo Berns e colaboradores (2016), perdas na expressão de *ARID1A* ativam a transcrição de *ANXA1*, contribuindo para a resistência de pacientes com câncer de mama à terapia hormonal e à uma das drogas mais frequentemente utilizadas para o tratamento de um de seus subtipos: o anticorpo monoclonal Trastuzumabe. Com a perda de *ARID1A*, a via de sinalização HER2/PI3K/mTOR (Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano/Fosfatidilinositol-3-Quinase/Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos) é ativada através da ativação de AKT (Serina/Treonina Quinase), favorecendo a proliferação e a sobrevivência das células tumorais. O estudo sugere que a correlação negativa entre esses genes provavelmente contribui para a progressão da doença, para a falta de resposta aos agentes terapêuticos alvo e pode ser utilizada como biomarcador para o tratamento hormonal do câncer de mama.

Portanto, baseando-se nesse estudo, propomos que a resistência a terapia hormonal no CaP também possa estar correlacionada aos níveis de expressão de *ARID1A*, sobretudo no quadro mais agressivo da doença, o CPRC. Diante disso, o presente trabalho propõe o estudo dos transcritos de uma subunidade chave pertencente a um complexo de remodelagem de cromatina visando caracterizá-lo em cultura de células (RWPE-1, LNCaP, DU145 e PC3) e avaliar sua correlação com os genes *ANXA1*, *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2*, abrindo novos caminhos para sua aplicação como um possível marcador molecular em tumores prostáticos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o papel dos transcritos do gene *ARID1A* na tumorigênese prostática.

Objetivos específicos

- Extrair o RNA total das linhagens prostáticas tumorais LNCaP (hormônio-dependente), DU145 e PC3 (hormônio-independentes) e da não-tumorigênica RWPE-1;
- Quantificar os transcritos do gene *ARID1A* nas diversas linhagens;
- Correlacionar os níveis de mRNA com os subtipos tumorais;
- Correlacionar a expressão de *ARID1A* com os níveis de mRNA dos genes *ANXA1*, *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2*;
- Sugerir os genes-chave para o fenótipo hormônio-independente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular

Para as análises foram mantidas em cultura quatro linhagens de células prostáticas. A linhagem RWPE-1 foi utilizada como controle (não-neoplásica) e mantida em meio IMDM (Gibco), enriquecido com 5 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF) (Gibco), 0,05 ng/mL de extrato de pituitária (EP) (Gibco), 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco) e 1 µL/mL de gentamicina (Cultilab). As linhagens tumorais LNCaP (hormônio-dependente) e PC3 (hormônio-independente) foram mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de FBS e 1 µL/mL de gentamicina. Já a linhagem tumorigênica DU145 (hormônio-independente) foi mantida em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de FBS e 1 µL/mL de gentamicina.

Todas as linhagens foram incubadas em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado em dias alternados até que 80% da confluência de cada garrafa fosse atingida.

3.2 Extração do RNA total

O mRNA total de cada uma das linhagens foi extraído utilizando o reagente TRIzol®Reagent (Life Technologies), seguindo-se as recomendações do fabricante. A qualidade do material foi analisada em gel de agarose 1,5%, utilizando-se como tampão de corrida TBE 0,5X (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA). Para visualização foi utilizada formamida (Dinâmica Química Contemporânea) e Gel Red 1X (Uniscience). As amostras foram resolvidas durante 25 min a 90 V, visualizadas por luz ultravioleta e fotodocumentadas pelo equipamento Transiluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia).

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (PG Instruments) e a razão 260 nm/280 nm foi utilizada também como parâmetro qualitativo. Em seguida, o mRNA foi armazenado à -80°C para subseqüentes análises.

3.3 Transcrição reversa

A transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se 1 µg de mRNA total obtido de cada linhagem, 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Invitrogen), 1X de Tampão da MMLV-RT (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) (Invitrogen) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros (Invitrogen). Para cada reação o volume final foi ajustado para 20 µL utilizando água tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich), um reagente inibidor de RNase. Também foram preparadas reações controle para verificação de possíveis contaminantes exógenos.

A amostras foram incubadas no termociclador ProFlex (Applied Biosystems) durante 1 hora a 37°C e, posteriormente, aquecidas a 5°C por 5 min, para que houvesse a desnaturação do híbrido RNA-cDNA e inativação da enzima MMLV-RT. O cDNA foi, então, armazenado a -20°C para posterior amplificação.

3.4 PCR para validação das amostras

A qualidade do cDNA obtido foi analisada por meio da amplificação de um fragmento de 94 pb do gene de referência Beta-2-Microglobulina (*B2M*). Para esta reação, as condições utilizadas foram: 1X de tampão de PCR (0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, glicerol 50% v/v, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0) (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (Invitrogen), 5 pmoles de *primers* (Invitrogen) (5' AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA 3' e 5' TGTTGATGTTGGATAAGAGAA 3'), 1 U Platinum®Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 4 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 2 µL de cDNA e água de injeção (Isofarma), utilizada para completar o volume final da reação para 20 µL.

A reação foi conduzida no termociclador ProFlex (Applied Biosystems). Inicialmente foi realizada uma desnaturação a 95°C durante 4 min e o material amplificado após 28 ciclos compostos pelas seguintes etapas: desnaturação a 94°C por 40 s, anelamento a 59°C por 40 s e extensão a 72°C por 50 s. Por fim, foi realizada uma extensão final de 72°C por 5 min. Em seguida, o produto da reação foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando como tampão de corrida TBE 0,5X (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA), corado com Gel Red 1X (Uniscience), visualizado por luz ultravioleta e fotodocumentado pelo equipamento Transiluminador L-Pix (Loccus Biotecnologia).

3.5 Ensaios de qPCR

Foram quantificados os transcritos dos genes *ARID1A*, *ANXA1*, *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2* (oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1) por PCR em tempo real (qPCR) utilizando o gene *B2M* como referência. Para cada um dos alvos foi construída a curva padrão relativa para validação do método Cq comparativo. Essa foi obtida, portanto, para a determinação da eficiência de amplificação dos genes alvo em relação à do gene de referência. Para estimar a eficiência (Ef) dos ensaios de qPCR foi realizado o cálculo: $Ef = (10 - 1/slope - 1) \times 100$.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos dos genes Domínio 1A de Interação a Regiões Ricas em AT (*ARID1A*); Anexina A1 (*ANXA1*); Receptor de Andrógeno (*AR*); Antígeno Prostático Específico (*PSA*); Variante 7 do Receptor de Andrógeno (*AR-V7*) e Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*HER2*).

Gene	Sequência 5' → 3'
<i>ARID1A</i>	F: CATTGCCCAAGATCGAGGTT R: GCCCATGCCTGTGTGTATCTG
<i>ANXA1</i>	F: GATTCAGATGCCAGGGCCT R: CACTCTGCGAAGTTGTGGAT
<i>AR</i>	F: CATGTGGAAGCTGCAAGGTCT R: GTGTAAGTTGCGGAAGCCAGG
<i>PSA</i>	F: AACCAGAGGAGTTCTTGACC R: GTGATACCTTGAAGCACACC
<i>AR-V7</i>	F: CACTAGAGGAGCACCTTAGGAATTG R: ACTGGAACACTCTGACTTCAGAATATG
<i>HER2</i>	F: GACTGCCTGTCCCTACAACCTACCTT R: ATGCCCAGACCATAGCACACTC

As reações foram conduzidas no equipamento StepOnePlus (Applied Biosystems) e preparadas para um volume final de 10 µL, contendo 2 µL de cDNA, tampão SYBR®Green (Applied Biosystems), oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen) e água de injeção (Isofarma). Os volumes de tampão, dos oligonucleotídeos iniciadores e a ciclagem encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Condições para a amplificação, por qPCR, dos genes Domínio 1A de Interação a Regiões Ricas em AT (*ARID1A*); Anexina A1 (*ANXA1*); Receptor de Andrógeno (*AR*); Antígeno Prostático Específico (*PSA*); Variante 7 do Receptor de Andrógeno (*AR-V7*); Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*HER2*) e Beta-2-Microglobulina (*B2M*).

Gene	Tampão (µL)	Primers (µL)	Tempo e temperatura de anelamento
<i>ARID1A</i>	4,0	0,5	65 °C por 2 min
<i>ANXA1</i>	5,0	1,0	60 °C por 1 min
<i>AR</i>	4,5	0,5	65 °C por 2 min
<i>PSA</i>	4,5	0,5	60 °C por 1 min
<i>AR-V7</i>	4,5	0,5	57 °C por 2 min
<i>HER2</i>	4,5	0,5	60 °C por 1 min
<i>B2M</i>	5,0	1,0	60 °C por 1 min

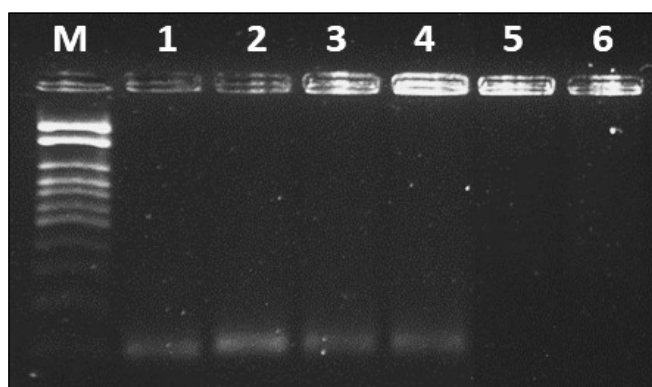
3.6 Análises estatísticas

Para a análise dos dados referentes às linhagens foi empregado o teste t unipareado. As correlações observadas entre os transcritos foram avaliadas utilizando o teste de correlação de Pearson. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software) e consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

Foram realizados ensaios de qPCR a fim de se estabelecer o perfil transcricional do gene *ARID1A* e sua correlação com os genes *ANXA1*, *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2* em modelos celulares prostáticos. O mRNA total foi, portanto, extraído e a razão das leituras de absorbância a 260 e 280 nm foi definida para se verificar a qualidade do material. Essa obedeceu ao intervalo de 1,8 a 2,0; sendo estes os valores utilizados para se determinar o grau de pureza das amostras de mRNA (SATO, 2015). Além disso, a visualização da banda de 94 pb (Figura 1), correspondente ao gene de referência *B2M*, em todas as linhagens também validou a utilização do cDNA em ensaios posteriores.

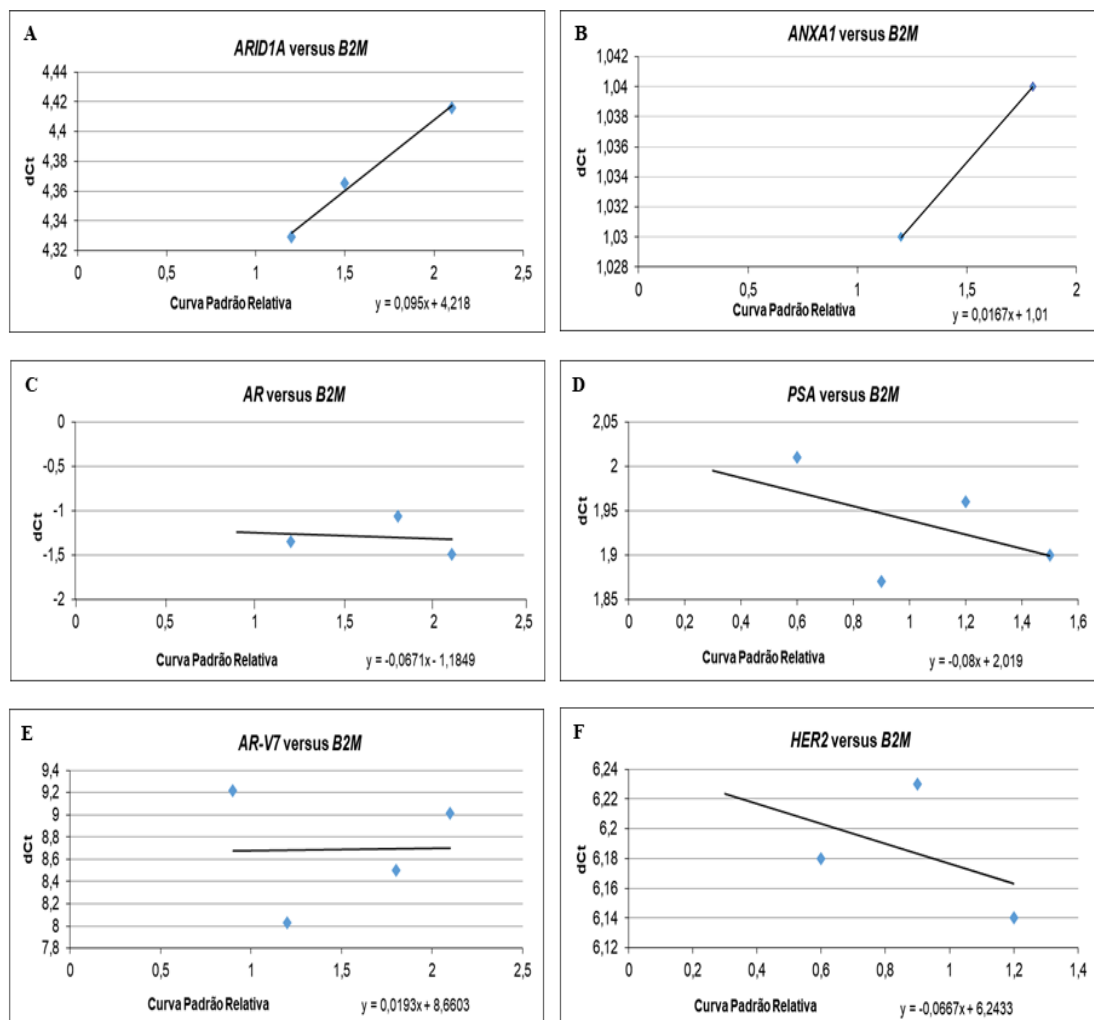
Figura 1: Amplificação do fragmento de 94 pb do gene de referência Beta-2-Microglobulina (*B2M*). M: Marcador molecular de 100 pb; 1 a 4: cDNA das linhagens prostáticas RWPE-1, LNCaP, DU145 e PC3, respectivamente; 5 e 6: controles de contaminação.



Para a detecção dos transcritos foram conduzidos ensaios de qPCR utilizando a metodologia de Cq comparativo. Para cada um dos alvos o método foi validado após a construção da curva padrão relativa a partir da diluição seriada do cDNA. Este passo garantiu

a eficiência da amplificação e a normalização das amostras com o gene de referência em questão. Os *slopes* de todos os genes foram próximos de -3,32, indicando uma reação com 100% de eficiência. Com a definição desse parâmetro, validou-se um aumento de 10 vezes nos amplicons a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial ($\log_2 10 = 3,3219$). Além disso, o R^2 também foi $\geq 0,97$ para todas as curvas. A eficiência encontra-se representada na Figura 2 e o gráfico foi gerado por regressão linear no software Microsoft Excel®.

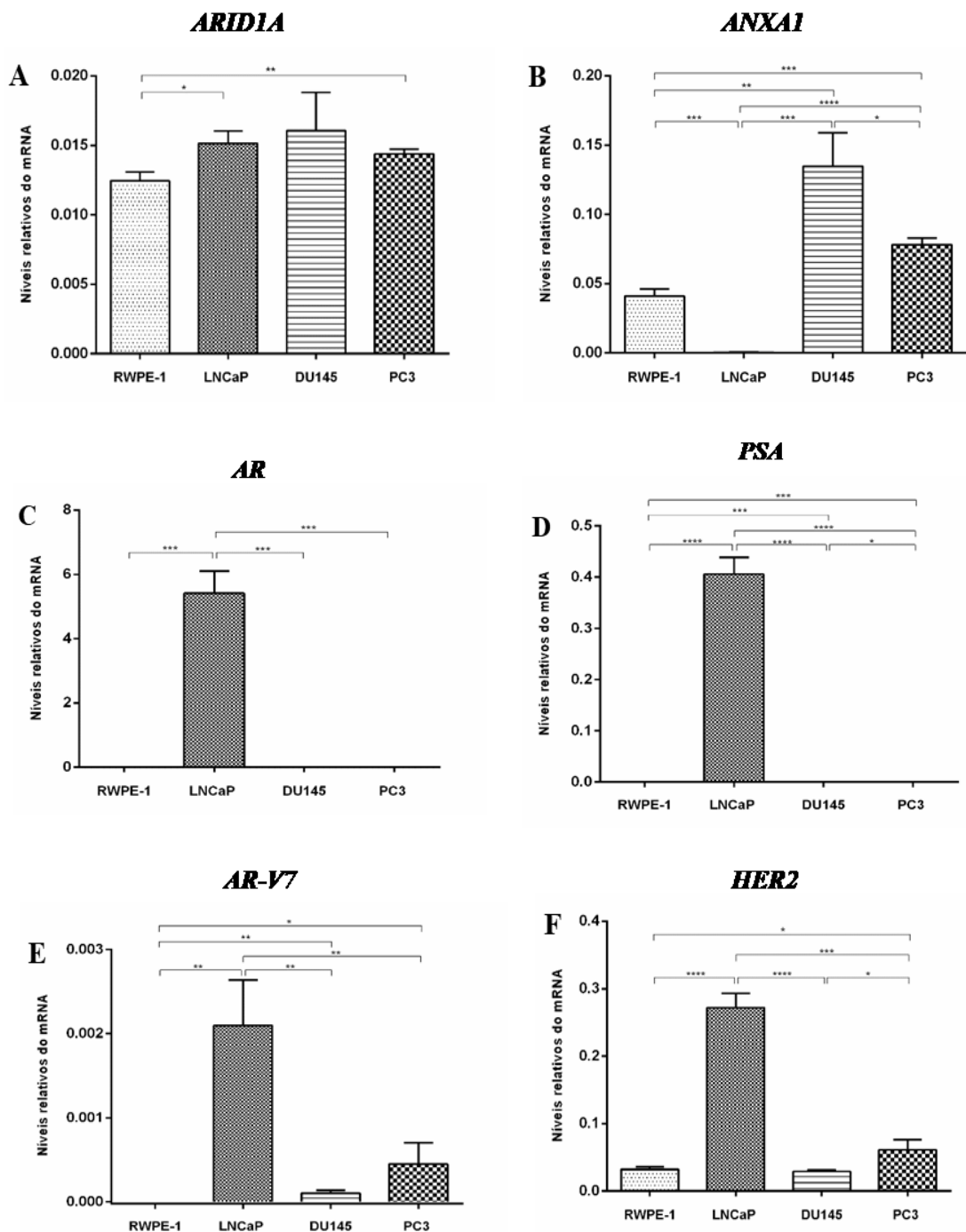
Figura 2: Validação do método Cq comparativo para a quantificação dos transcritos, por qPCR, dos genes Domínio 1A de Interação a Regiões Ricas em AT (*ARID1A*); Anexina A1 (*ANXA1*); Receptor de Andrógeno (*AR*), Antígeno Prostático Específico (*PSA*); Variante 7 do Receptor de Andrógeno (*AR-V7*) e Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*HER2*). Em A, expressão do gene *ARID1A*; em B, expressão do gene *ANXA1*; em C, expressão do gene *AR*; em D, expressão do gene *PSA*; em E, expressão do gene *AR-V7* e em F, expressão do gene *HER2*. O gene Beta-2-Microglobulina (*B2M*) foi utilizado como referência.



Considerando os perfis de expressão gênica para cada um dos alvos (Figura 3), os níveis relativos do mRNA para o gene *ARID1A* (Figura 3A) se mostraram ligeiramente superiores nas linhagens LNCaP e PC3 quando comparadas   não-tumorigênica (1,22 e 1,15

vezes maior, respectivamente). Além disso, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as linhagens tumorais.

Figura 3: Quantificação relativa dos níveis transcricionais dos genes Domínio 1A de Interação a Regiões Ricas em AT (*ARID1A*); Anexina A1 (*ANXA1*); Receptor de Andrógeno (*AR*); Antígeno Prostático Específico (*PSA*); Variante 7 do Receptor de Andrógeno (*AR-V7*) e Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*HER2*) por qPCR em diferentes linhagens prostáticas (RWPE-1, LNCaP, DU145 e PC3). Em A, expressão do gene *ARID1A*; em B, expressão do gene *ANXA1*; em C, expressão do gene *AR*; em D, expressão do gene *PSA*; em E, expressão do gene *AR-V7* e em F, expressão do gene *HER2* (* $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$; **** $P<0,0001$).



Já o gene *ANXA1* demonstrou um comportamento peculiar, diminuindo sua expressão na linhagem hormônio-dependente, com transcritos significativamente maiores nas linhagens tumorais hormônio-independentes (Figura 3B). Os níveis transcricionais foram 3,28 e 1,90 vezes maiores nas linhagens DU145 e PC3 quando comparados à RWPE-1 e 385,78 e 223,69 quando comparados à LNCaP.

Para os genes *AR* (Figura 3C) e *PSA* (Figura 3D) foram detectados transcritos apenas na linhagem LNCaP. Quanto à *AR-V7* (Figura 3E), sua expressão gênica se mostrou significativamente aumentada nas linhagens tumorais. Entre estas, os níveis transcricionais foram maiores em LNCaP, comparando-se à DU145 (20,13 vezes) e à PC3 (4,64 vezes). No entanto, não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as linhagens tumorais hormônio-independentes.

Finalmente, para *HER2* (Figura 3F), seus níveis de mRNA também se destacaram para LNCaP. Nesta, 8,43, 9,34 e 4,43 mais transcritos foram quantificados quando comparados à RWPE-1, DU145 e PC3, respectivamente. Em PC3 os níveis transcricionais do gene também foram superiores (1,90 vezes) ao modelo não-tumorigênico. Além disso, a expressão do gene na linhagem PC3 foi 2,11 vezes maior do que para DU145.

A relação entre os níveis de mRNA dos genes analisados foi avaliada por meio do teste de correlação de Pearson, conforme a Tabela 3. Os transcritos do gene *ARID1A* não se correlacionaram com os demais. Foram verificadas correlações negativas entre a expressão gênica de *ANXA1* e os alvos *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2*. Estes quatro últimos apresentaram forte correlação positiva entre si, com valores de R superiores a 0,94.

Tabela 3: Correlação de Pearson entre os transcritos dos genes Anexina A1 (*ANXA1*); Receptor de Andrógeno (*AR*); Antígeno Prostático Específico (*PSA*); Variante 7 do Receptor de Andrógeno (*AR-V7*) e Receptor do Tipo 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (*HER2*).

Análise	Correlação de Pearson (R)	Equação da reta	P*
<i>ANXA1 X AR</i>	- 0,717	$y = 0,08434 - 0,01535x$	0,00861
<i>ANXA1 X AR-V7</i>	- 0,662	$y = 0,08882 - 38,05981x$	0,01895
<i>ANXA1 X HER2</i>	- 0,727	$y = 0,0993 - 0,3623x$	0,00735
<i>ANXA1 X PSA</i>	- 0,721	$y = 0,08451 - 0,20660x$	0,00821
<i>AR-V7 X AR</i>	0,949	$y = 1,857e-04 + 3,533e-04x$	2,57e-06
<i>AR-V7 X HER2</i>	0,975	$y = - 1,707e-04 + 8,456e-03x$	6,55e-08
<i>AR-V7 X PSA</i>	0,957	$y = 1,794e-04 + 4,776e-03x$	1,07e-06
<i>HER2 X AR</i>	0,988	$y = 0,04122 + 0,04246x$	1,68e-09
<i>HER2 X PSA</i>	0,990	$y = 0,04086 + 0,570003x$	7,13e-10
<i>PSA X AR</i>	0,996	$y = 0,00078 + 0,07438x$	3,58e-12

* teste t

5 DISCUSSÃO

O complexo SWI/SNF utiliza a energia da hidrólise de ATP para remodelar a estrutura da cromatina, permitindo mobilizar e reposicionar nucleossomos e ejetar e inserir octâmeros de histonas (LU; ROBERTS, 2013). Alterações nos genes que codificam as subunidades deste complexo são comumente relatadas em neoplasias malignas, evidenciando seu papel como regulador epigenético na tumorigênese (MASLIAH-PLANCHON et al., 2015).

A subunidade ARID1A do complexo SWI/SNF é descrita como mutada em cerca de 20% dos cânceres humanos (KADOCH et al., 2013). Por apresentar funções como supressora tumoral, alterações em sua expressão ou inativação impactam a expressão de outros genes e, conseqüentemente, vias de sinalização diretamente envolvidas com o desenvolvimento e progressão de tumores (BERNS et al., 2016). Além disso, é descrito na literatura que mutações neste gene são intimamente ligadas a um pior prognóstico de pacientes com tumores gástricos, mamários e de ovário (YAN et al., 2013; YOKOYAMA et al., 2014; TAKAO et al., 2017). Portanto, por estar correlacionado a outras neoplasias malignas em

estágio avançado, acreditamos que *ARID1A* também possa desempenhar papel relevante na progressão do CaP.

No CaP, muitos pacientes evoluem para o quadro de CPRC, também conhecido como hormônio-refratário (SCHWEIZER; YU, 2015). Nesta fase, há a progressão da doença clínica, com o desenvolvimento de metástases, e bioquímica, com a elevação dos níveis de hormônios androgênicos, apesar da castração química ou cirúrgica (CHANDRASEKAR et al., 2015a). Dessa forma, compreender os mecanismos envolvidos na progressão do CaP são fundamentais para a busca de novos biomarcadores e o desenvolvimento de terapias direcionadas para esse estágio da doença.

No presente estudo quantificamos e analisamos os transcritos de *ARID1A* buscando avaliar seus papéis na tumorigênese prostática. Ainda, visamos correlacionar a expressão de *ARID1A* com os níveis de mRNA dos genes *ANXA1*, *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2*. Para isso, utilizamos as linhagens prostáticas RWPE (não-tumorigênica), LNCaP (hormônio-dependente), DU145 e PC3 (hormônio-independentes).

A linhagem RWPE-1, isolada a partir do epitélio prostático de um indivíduo adulto e sadio foi utilizada como controle, visto que apresenta as características de células normais da próstata (MARTINUCCI, 2017). Além disso, é capaz de expressar marcadores epiteliais luminais, como a citoqueratina 8 e 18, o gene supressor tumoral *p53* e o AR (BELLO et al., 1997). A linhagem tumorigênica LNCaP, derivada de sítio metastático linfonodal, mimetiza o CaP em seu estágio inicial, uma vez que são células imortalizadas hormônio-responsivas (FUSCALDI, 2012). Além disso, produz fosfatase ácida prostática (PAP), PSA e EGF (SCHUURMANS et al., 1991).

As linhagens tumorigênicas DU145 e PC3, isoladas de metástases cerebral e óssea, respectivamente, estão associadas a altas taxas de proliferação (FUSCALDI, 2012). Por se tratarem de células que apresentam crescimento tumoral que independe da produção de andrógenos e que não expressam o AR são utilizadas como modelo para estudos sobre o CaP avançado (RUSSELL; KINGSLEY, 2003). A linhagem PC3 não expressa *PSA* e expressa altos níveis de *EGF*, o qual contribui para seu crescimento autônomo. No entanto, embora esta seja hormônio-independente, possui uma fraca marcação do AR em seu núcleo (WEBBER; BELLO; QUADER, 1997). Portanto, em nosso estudo, foram utilizadas linhagens celulares distintas, o que permitiu a comparação dos dados referentes aos subtipos tumorais hormônio-dependente e hormônio-independentes.

Foram comparadas as quantificações dos transcritos de diferentes genes nas linhagens prostáticas RWPE-1, LNCaP, DU145 e PC3. De fato, estas estão bem descritas na literatura,

com técnicas de cultivo e expansão padronizadas; permitindo, assim, o monitoramento efetivo do microambiente em que se encontram (MOROZ, 2013). Dessa forma, por apresentarem particularidades entre si, é possível avaliar o comportamento celular e a expressão de moléculas características do tecido que representam (MARTINUCCI, 2017).

A expressão gênica dos alvos foi verificada por qPCR. Esta metodologia permite detectar e quantificar em tempo real a intensidade da fluorescência emitida durante a amplificação do cDNA alvo (NASCIMENTO; SUAREZ; PINHAL, 2010). Além disso, possui vantagens em relação a PCR convencional, como rapidez, alta sensibilidade, especificidade, detecção de quantidades relativamente pequenas de DNA e análise simultânea de um grande número de amostras (OLIVEIRA, 2010). Em nosso estudo foi adotada a estratégia semi-quantitativa, baseada no método Cq comparativo, o qual necessita de um gene de referência para a normalização dos dados.

Genes de referência, também denominados *housekeeping*, têm como principais características serem expressos em todos os tipos de amostras biológicas e se manterem estáveis sob diferentes condições experimentais (WANG et al., 2016). São frequentemente empregados como controle interno para determinar os níveis de expressão relativa de genes alvo. Para o presente estudo, o gene *B2M* foi utilizado como referência. Na literatura estão descritos diversos estudos sobre o CaP que o utilizaram como controle endógeno (NEVES, 2007; MOURA, 2012; KATZ, 2014; MOTA, 2017). Dessa forma, a escolha de um gene constitutivo que possa ser usado para a normalização possibilita determinar de modo preciso e confiável a expressão gênica, bem como é um passo crucial para análises das curvas padrão relativas (LIU et al., 2015).

A eficiência dos ensaios de qPCR é determinada por meio da linearidade e da inclinação das curvas padrão relativas dos genes alvo em diferentes concentrações de cDNA (NISHI et al., 2009). As curvas de amplificação obedecem a três fases: a exponencial, a linear e o platô. Tais curvas são geradas segundo concentrações conhecidas do alvo molecular em estudo (WODEWOTZKY, 2010). As curvas atenderam às exigências descritas no *The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE) (BUSTIN et al., 2009), um guia que fornece informações necessárias para a avaliação das condições experimentais e a validação dos protocolos utilizados para as reações de qPCR. Dessa forma, confirmamos e validamos a estratégia experimental empregada.

Considerando os níveis transcricionais de *ARID1A*, na literatura tem sido descrita a perda na expressão do gene e da proteína em diversos tipos de tumores, como carcinoma de células renais claras, de endométrio, de ovário e de intestino (WANG et al., 2012; TAKEDA

et al., 2016; JIANG et al., 2017). Contudo, em nosso estudo foi observada uma maior expressão de mRNA nas linhagens LNCaP e PC3 quando comparadas à RWPE-1. Segundo Zhao e colaboradores (2015), pacientes com carcinoma hepatocelular apresentaram uma superexpressão de *ARID1A* em seus tecidos tumorais quando comparada à expressão de tecidos adjacentes não-tumorigênicos. Balbás-Martínez e colaboradores (2013) também demonstraram esse comportamento, com maiores níveis dessa proteína em pacientes com câncer de bexiga, inclusive com valor prognóstico. Nossos ensaios indicaram esse perfil em modelos celulares de próstata, contudo, já em nível transcricional, sugerindo que a maior expressão proteica pode refletir a modulação de eventos moleculares anteriores.

De fato, o conhecimento acerca da função de *ARID1A* e das consequências decorrentes das alterações em seus níveis de expressão ainda é limitado. Seu comportamento conflitante em diferentes tipos tumorais evidencia a necessidade de estudos adicionais que esclareçam seu comportamento no CaP.

Apesar de responder ao estímulo de hormônios glicocorticoides como andrógenos (MATHUR, 2018), não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as linhagens tumorais avaliadas neste estudo. Acreditamos que a expressão de *ARID1A* possivelmente não esteja correlacionada à resistência a terapia hormonal e ao CPRC, visto que os níveis de mRNA não se alteraram, significativamente, quando comparamos as linhagens hormônio-independentes à hormônio-responsiva. Dessa forma, sugere-se que o gene *ARID1A* esteja envolvido no surgimento do CaP ou em seu desenvolvimento inicial, possivelmente através da regulação da expressão de genes envolvidos na transformação oncogênica (SUN et al., 2017).

A expressão de *ARID1A* aumenta a transcrição mediada por receptores glicocorticoides, ao remodelar a cromatina sob estímulo hormonal (WALLBERG et al., 2000; INOUE et al., 2002). Não encontramos correlação entre os níveis transcricionais de *ARID1A* e os demais genes estudados. Entretanto, nosso estudo limita-se à quantificação dos níveis de mRNA, não analisando modificações pós-transcricionais que possam impactar nas proteínas efetivamente ativas nas células. Portanto, são necessários ensaios adicionais que avaliem essas proteínas no CaP, além de experimentos que possam elucidar a função de *ARID1A*, bem como suas interações com outros genes envolvidos no processo carcinogênico.

Berns e colaboradores (2016) sugerem que a perda de *ARID1A* ativa uma ou mais vias de sinalização que conferem vantagens às células tumorais, que proliferam intensamente e evadem aos mecanismos apoptóticos. Em câncer de mama, a perda de *ARID1A* é associada à

ativação de *ANXA1*, o que culmina com a resistência a drogas direcionadas ao bloqueio de *HER2*.

O gene *ANXA1* codifica uma proteína com 37 kDa capaz de se ligar aos fosfolipídios de forma cálcio-dependente (VOLPATO, 2017). Encontra-se envolvido em diferentes processos celulares, incluindo sobrevivência, proliferação, apoptose, diferenciação e migração (BOUDHRAA et al., 2016). A desregulação de seus níveis de expressão é relacionada ao desenvolvimento de tumores (BOUDHRAA et al., 2016), contudo, sua relevância na oncogênese se mostra específica ao tecido afetado (GUO; LIU; SUN, 2013). Nesse contexto, suas funções e mecanismos de atuação na carcinogênese prostática, sobretudo em CPRC, ainda necessitam ser investigados.

Patton e colaboradores (2005) verificaram que os níveis proteicos e de mRNA de *ANXA1* se mostraram significativamente menores em pacientes com neoplasia intraepitelial prostática de alto grau e CaP quando comparados com os casos de hiperplasia. Adicionalmente, sua perda de expressão já foi previamente associada ao surgimento de CaP e tumores esofágicos (PAWELETZ et al., 2000). Esses dados confirmam os resultados encontrados, uma vez que houve uma perda nos níveis de transcritos de *ANXA1* na linhagem LNCaP, a qual é constituída por células prostáticas tumorais responsivas a hormônio. Hasegawa e colaboradores (2006) também observaram esse comportamento, em que o gene foi expresso apenas na linhagem PC3 e não na LNCaP.

Apesar da localização subcelular de *ANXA1* (citoplasmática, nuclear, extracelular) impactar diretamente em suas funções (BOUDHRAA et al., 2016), verificamos que seus níveis transcricionais, no CaP, apresentam um perfil peculiar que acompanha a agressividade da doença. É descrito na literatura que a superexpressão de *ANXA1* aumenta a resistência às drogas no tratamento contra o CaP, o que a sugere como parâmetro de resposta a diferentes drogas (HASEGAWA et al., 2006).

Dessa forma, supomos que a perda na expressão de *ANXA1* em LNCaP esteja envolvida com o início e promoção do tumor. Todavia, para a progressão da doença, incluindo para o fenótipo de resistência ao tratamento hormonal, se mostra necessário o aumento de sua expressão. Portanto, sua posterior elevação em DU145 e PC3 pode estar relacionada à resistência a terapia hormonal e ao quadro agressivo de CPRC, cujo mecanismo ainda necessita ser elucidado.

Quanto à sinalização androgênica, Schaeffer e colaboradores (2008) observaram uma diminuição na expressão de *ANXA1* em CaP sob estímulo androgênico. Em nosso estudo, seus níveis transcricionais se correlacionaram negativamente com os do *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2*.

O quadro de CPRC é resultado da ativação do AR independente de andrógeno e, consequentemente, de suas vias a jusante (SMOLLE et al., 2017). Os mecanismos envolvidos com esse fenótipo incluem a ativação do receptor por *feedback*, incluindo via *HER2*, por mutações e por variantes de *splicing*, com destaque para o AR-V7 (SCHWEIZER; YU, 2015).

Membro de uma superfamília de receptores nucleares, o AR é ativado pela ligação de hormônios andrógenos, como testosterona e DHT (KRAUSE et al., 2014). Possui papel essencial no desenvolvimento glândula prostática, seja em condições de normalidade, seja no CaP (CULIG, 2015). Ainda, alterações em sua expressão contribuem, e estão fortemente relacionadas, ao desenvolvimento e à progressão tumoral de pacientes com CPRC (COUTINHO et al., 2016).

O gene *PSA* codifica uma proteína pertencente à família das serino proteases e é produzido pelas células epiteliais prostáticas (PAYNE; CORNFORD, 2011) em resposta ao AR. Portanto, o monitoramento de seus níveis séricos permite avaliar a resposta de pacientes à terapia de bloqueio hormonal e a progressão da doença para sua fase mais grave, o CPRC (KIM et al., 2016; MIZOKAMI et al., 2017).

Em nosso estudo transcritos do *AR* e *PSA* foram detectados apenas na linhagem hormônio-dependente LNCaP. Tai e colaboradores (2011) também observaram o mesmo comportamento para os transcritos de ambos os genes. No estudo, as células da linhagem LNCaP expressaram *AR* e *PSA* e seu crescimento foi inibido pela privação androgênica. Por outro lado, as células da linhagem PC3 não expressaram estes genes e, ainda, manifestaram proliferação de modo independente à andrógenos. Além disso, como descrito por outros estudos, a linhagem DU145 também não é capaz de expressar *AR* e *PSA* (RUSSELL; KINGSLEY, 2003; FONTENELE, 2014).

Nossos resultados corroboram ensaios anteriores (SARWAR et al., 2014) e certificam as linhagens utilizadas. O crescimento dessas células independe de hormônio (TAI et al., 2011) e a ausência de transcritos desses genes é sugerida como uma marca desse subtipo tumoral, o qual utiliza moléculas diferentes para conduzir sua agressividade, como variantes de AR, EGFR e HER2 (BAEK et al., 2012; CHANDRASEKAR et al., 2015a).

O *splicing* alternativo do AR tem sido descrito como um dos principais mecanismos responsáveis pela atividade persistente do receptor, bem como pela sobrevivência das células do CaP (SUN et al., 2010). Estudos apontam que a detecção de transcritos de *AR-V7* em células tumorais prostáticas está diretamente relacionada a resistência a Enzalutamida e o Acetato de Abiraterona, agentes farmacológicos frequentemente utilizados na TPA (ANTONARAKIS et al., 2014; SHARP et al., 2018; WANG et al., 2018).

A expressão de *AR-V7* correlaciona-se à progressão do CaP e ao menor tempo de sobrevida em pacientes com CPRC (LIU et al., 2014). Logo, esperava-se que os níveis relativos do mRNA deste gene fossem mais elevados nas linhagens tumorais hormônio-independentes DU145 e PC3. Entretanto, em nosso estudo observamos que expressão de *AR-V7* se mostrou significativamente elevada na linhagem tumoral hormônio-responsiva LNCaP. Como descrito na literatura, esta linhagem é capaz de gerar transcritos a partir do gene, mas sua tradução em proteínas não é detectada (HU et al., 2009, WADOSKY; KOOCHKEPOUR, 2017).

Finalmente, avaliamos também os transcritos de *HER2*, o qual codifica uma glicoproteína pertencente à família quinases transmembranas, que normalmente são expressas em baixos níveis em diversas células epiteliais secretoras humanas, como as encontradas nos tecidos da próstata (YEH et al., 1999). Como esperado, em nosso estudo, a linhagem RWPE-1, isolada a partir do epitélio prostático, exibiu discretos níveis de mRNA do gene *HER2*.

Detectamos transcritos deste gene nas linhagens DU145 e PC3. É descrito na literatura que ambientes com baixos níveis de andrógenos permitem a sobrevivência e a supressão da apoptose de células tumorais hormônio-independentes que expressam *HER2*, contribuindo para a resistência à terapia hormonal e a progressão da doença (ANDERSSON et al., 2014). Além disso, maiores níveis de expressão deste gene em CaP estão associados a menor sensibilidade à quimioterapia, pior prognóstico e menor taxa de sobrevida de pacientes (LIU et al., 2015).

Por meio do teste de correlação de Pearson, foram verificadas correlações positivas entre os genes *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2*, com valores de R superiores a 0,94. De fato, estudos apontam que a reativação do *AR* em casos de TPA é responsável pelo aumento dos níveis de *PSA*, o que contribui para o crescimento tumoral (PAYNE; CORNFORD, 2011). Além disso, em condições de CPRC, a expressão de *HER2* é induzida, promovendo a transativação do *AR* e o aumento dos níveis de mRNA de *PSA* (LEE et al., 2003, SCHWEIZER; YU, 2015). Baek e colaboradores (2012) sugerem que o aumento na expressão de *HER2* favorece a atividade transcricional e estabilidade do *AR*. Por fim, segundo Liu e colaboradores (2014), para que haja a síntese do mRNA do gene *AR-V7* a transcrição do *AR* precisa estar ativada. Portanto, o funcionamento concernente desses quatro alvos é essencial para o quadro avançado de CaP.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos apontam que maiores níveis de mRNA de *ARID1A* são encontrados no modelo celular responsivo a andrógeno, não se correlacionando com os demais alvos analisados. Esse comportamento sugere seu envolvimento com a promoção do CaP. Interessantemente, para o gene *ANXA1*, houve uma perda dos transcritos em LNCaP, com elevação de expressão nas linhagens DU145 e PC3, evidenciando um perfil dependente da progressão e agressividade da doença.

Por fim, os genes *AR*, *PSA*, *AR-V7* e *HER2* correlacionaram-se positivamente, o que pressupõe um efeito orquestrado nesse tipo tumoral. Contudo, devido à limitação das análises ao mRNA, são necessários novos ensaios que analisem o comportamento das proteínas produzidas por esses genes para posterior aplicação como biomarcadores direcionados ao CaP avançado.

REFERÊNCIAS

A.C. CAMARGO CANCER CENTER. **Tudo sobre o câncer: próstata**. Disponível em: <<http://www.accamargo.org.br/tudo-sobre-o-cancer/prostata/32/>>. Acesso em: 26 ago. 2018.

ALLDREDGE, J. K.; ESKANDER, R. N. EZH2 inhibition in ARID1A mutated clear cell and endometrioid ovarian and endometrioid endometrial cancers. **Gynecologic Oncology Research And Practice**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2017.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **About prostate cancer**. 2016. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8793.00.pdf>>. Acesso em: 05 set. 2018.

ANDERSSON, J. et al. *In vitro* modeling of HER2-targeting therapy in disseminated prostate cancer. **International Journal Of Oncology**, v. 45, n. 5, p. 2153-2158, 2014.

ANTONARAKIS, E. S. et al. AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. **New England Journal Of Medicine**, v. 371, n. 11, p. 1028-1038, 2014.

BACELAR JUNIOR, A. J. et al. Câncer de próstata: métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 10, n. 3, p. 40-46, 2015.

BAEK, K. H. et al. Correlation of AR, EGFR, and HER2 Expression Levels in Prostate Cancer: Immunohistochemical Analysis and Chromogenic In Situ Hybridization. **Cancer Research And Treatment**, v. 44, n. 1, p. 50-56, 2012.

BALBÁS-MARTÍNEZ, C. et al. ARID1A Alterations Are Associated with FGFR3-Wild Type, Poor-Prognosis, Urothelial Bladder Tumors. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. e62483, 2013.

BECKER, P. B.; WORKMAN, J. L. Nucleosome Remodeling and Epigenetics. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 5, n. 9, p. 17905-17905, 2013.

BELLO, D. et al. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 6, p. 1215-1223, 1997.

BERNS, K. et al. Loss of ARID1A Activates ANXA1, which Serves as a Predictive Biomarker for Trastuzumab Resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 21, p. 5238-5248, 2016.

BERRUTI, A.; VOLTA, A. D. Resistance to Hormonal Therapy in Prostate Cancer. **Handbook Of Experimental Pharmacology**, 2017.

BIAOXUE, R.; XIGUANG, C; SHUANYING, Y. Annexin A1 in Malignant Tumors: Current Opinions and Controversies. **The International Journal Of Biological Markers**, v. 29, n. 1, p. 8-20, 2014.

BIEGEL, J. A.; BUSSE, T. M.; WEISSMAN, B. E. SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer. **American Journal Of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 166, n. 3, p. 350-366, 2014.

BITLER, B. G.; FATKHUTDINOV, N.; ZHANG, R. Potential therapeutic targets in ARID1A-mutated cancers. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, v. 19, n. 11, p. 1419-1422, 2015.

BOUDHRAA, Z. et al. Annexin A1 localization and its relevance to cancer. **Clinical Science**, v. 130, n. 4, p. 205-220, 2016.

BROWNLEE, P. M.; MEISENBERG, C.; DOWNS, J. A. The SWI/SNF chromatin remodelling complex: Its role in maintaining genome stability and preventing tumourigenesis. **DNA Repair**, v. 32, p. 127-133, 2015.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CATALONA, W. J. Prostate Cancer Screening. **Medical Clinics Of North America**, v. 102, n. 2, p. 199-214, 2018.

CHANDLER, R. L. et al. Coexistent ARID1A–PIK3CA mutations promote ovarian clear-cell tumorigenesis through pro-tumorigenic inflammatory cytokine signalling. **Nature Communications**, v. 6, p. 1-14, 2015.

CHANDRASEKAR, T. et al. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CPRC). **Translational Andrology And Urology**, v. 4, n. 3, p. 365-380, 2015a.

CHANDRASEKAR, T. et al. Targeting molecular resistance in castration-resistant prostate cancer. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2015b.

CHENG, S. et al. ARID1A represses hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration through lncRNA MVIH. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 491, n. 1, p. 178-182, 2017.

CHO, H. D. et al. Loss of Tumor Suppressor ARID1A Protein Expression Correlates with Poor Prognosis in Patients with Primary Breast Cancer. **Journal Of Breast Cancer**, v. 18, n. 4, p. 339-346, 2015.

CHOI, S.; LEE, A. Efficacy and safety of gonadotropin-releasing hormone agonists used in the treatment of prostate cancer. **Drug, Healthcare And Patient Safety**, n. 3, p. 107-119, 2011.

CLAPIER, C. R. et al. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 7, p. 407-422, 2017.

CRAFT, N. et al. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. **Nature Medicine**, v. 5, n. 3, p. 280-285, 1999.

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p.125-136, 2013.

COSTA-PINHEIRO, P. et al. Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer. **Epigenomics**, v. 7, n. 6, p. 1003-1015, 2015.

COUTINHO, I. et al. Androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer: a lesson in persistence. **Endocrine-related Cancer**, v. 23, n. 12, p. 179-197, 2016.

CULIG, Z. Androgen Receptor Coactivators in Regulation of Growth and Differentiation in Prostate Cancer. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 231, n. 2, p. 270-274, 2015.

CULIG, Z.; SANTER, F. R. Androgen receptor signaling in prostate cancer. **Cancer And Metastasis Reviews**, v. 33, n. 2-3, p. 413-427, 2014.

DAMIÃO, R. et al. Câncer de próstata. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, p. 80-86, 2015.

DIAMANDIS, E. P. Cancer Biomarkers: Can We Turn Recent Failures into Success? **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 19, p. 1462-1467, 2010.

DUSKOVA, K.; VESELY, S. Prostate Specific Antigen. Current clinical application and future prospects. **Biomedical Papers**, v. 159, n. 1, p. 018-026, 2015.

ELSNER, V. R.; SIQUEIRA, I. R. **Epigenética aplicada à saúde e a doença: princípios fundamentais baseados em evidências atuais**. Porto Alegre: Editora Universitária Metodista IPA, 2016. 136 p.

EUSKIRCHEN, G.; AUERBACH, R. K.; SNYDER, M. SWI/SNF Chromatin-remodeling Factors: Multiscale Analyses and Diverse Functions. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 287, n. 37, p. 30897-30905, 2012.

FARAJ, S. F. et al. ARID1A immunohistochemistry improves outcome prediction in invasive urothelial carcinoma of urinary bladder. **Human Pathology**, v. 45, n. 11, p. 2233-2239, 2014.

FONTENELE, R. S. **Análise do papel de mediadores inflamatórios na manutenção do estado tumoral no modelo câncer de próstata *in vitro***. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

FUJIMOTO, A. et al. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. **Nature Genetics**, v. 44, n. 7, p. 760-764, 2012.

FUSCALDI, L. L. **Emprego do peptídeo 99mTc-HYNIC-βAla-Bombesina(7-14) na identificação de tumor de próstata da linhagem LNCaP em modelo experimental**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

GOODWIN, L. R.; PICKETTS, D. J. The role of ISWI chromatin remodeling complexes in brain development and neurodevelopmental disorders. **Molecular And Cellular Neuroscience**, v. 87, p. 55-64, 2018.

GRAHAM, L.; SCHWEIZER, M. T. Targeting persistent androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer. **Medical Oncology**, v. 33, n. 5, p. 1-17, 2016.

GROSSMANN, M.; CHEUNG, A. S.; ZAJAC, J. D. Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. **Best Practice And Research Clinical Endocrinology And Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 603-616, 2013.

GUAN, B.; WANG, T.; SHIH, I. ARID1A, a Factor That Promotes Formation of SWI/SNF-Mediated Chromatin Remodeling, Is a Tumor Suppressor in Gynecologic Cancers. **Cancer Research**, v. 71, n. 21, p. 6718-6727, 2011.

GUO, C.; LIU, S.; SUN, M. Potential role of Anxa1 in cancer. **Future Oncology**, v. 9, n. 11, p. 1773-1793, 2013.

HÅÅG, P. et al. Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 96, n. 3-4, p. 251-258, 2005.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANSEL, D. E. et al. HER2 Overexpression and Amplification in Urothelial Carcinoma of the Bladder Is Associated WithMYCCoamplification in a Subset of Cases. **American Journal Of Clinical Pathology**, v. 130, n. 2, p. 274-281, 2008.

HASEGAWA, N. et al. A Comparative Study of Protein Profiling by Proteomic Analysis in Camptothecin-Resistant PC3 and Camptothecin-Sensitive LNCaP Human Prostate Cancer Cells. **Urologia Internationalis**, v. 77, n. 4, p. 347-354, 2006.

HATAKEYAMA, S. et al. Recent progress and perspectives on prostate cancer biomarkers. **International Journal Of Clinical Oncology**, v. 22, n. 2, p. 214-221, 2016.

HE, F. et al. Decreased expression of ARID1A associates with poor prognosis and promotes metastases of hepatocellular carcinoma. **Journal Of Experimental And Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 1, p. 1-8, 2015.

HO, Y.; DEHM, S. M. Androgen Receptor Rearrangement and Splicing Variants in Resistance to Endocrine Therapies in Prostate Cancer. **Endocrinology**, v. 158, n. 6, p. 1533-1542, 2017.

HODGES, C.; KIRKLAND, J. G.; CRABTREE, G. R. The Many Roles of BAF (mSWI/SNF) and PBAF Complexes in Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 6, n. 8, p. 1-34, 2017.

HOHMANN, A. F. et al. A rationale to target the SWI/SNF complex for cancer therapy. **Trends In Genetics**, v. 30, n. 8, p. 356-363, 2014.

HU, R. et al. Ligand-Independent Androgen Receptor Variants Derived from Splicing of Cryptic Exons Signify Hormone-Refractory Prostate Cancer. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 16-22, 2009.

HUANG, Y. et al. Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer (Review). **Oncology Letters**, v. 15, p. 6063-6076, 2018.

HUGHES, A. L.; OWEN-HUGHES, T. Deciphering Subunit-Specific Functions within SWI/SNF Complexes. **Cell Reports**, v. 18, n. 9, p. 2075-2076, 2017.

INOUE, H. et al. Largest Subunits of the Human SWI/SNF Chromatin-remodeling Complex Promote Transcriptional Activation by Steroid Hormone Receptors. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, n. 44, p. 41674-41685, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Monitoramento das ações de controle do câncer de próstata**. 2017. Disponível em: <<http://www.saude.df.gov.br/wp-content/uploads/2018/03/informativo-c%a2ncer-de-pr%b3stata-2017.pdf>>. Acesso em: 03 out. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 01 abr. 2018.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Hiperplasia prostática benigna**. 2016. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/voce-sabe-o-que-e-hiperplasia-prostatica-benigna/9594/426/>>. Acesso em: 05 set. 2018.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Sinais e sintomas do câncer de próstata**. 2017. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/sinais-e-sintomas-do-cancer-de-prostata/1188/288/>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

JIANG, W. et al. Intratumoral heterogeneity analysis reveals hidden associations between protein expression losses and patient survival in clear cell renal cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 23, p. 37423-37434, 2017.

JONES, S. et al. Frequent Mutations of Chromatin Remodeling Gene ARID1A in Ovarian Clear Cell Carcinoma. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 228-231, 2010.

KADOCH, C. et al. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. **Nature Genetics**, v. 45, n. 6, p. 592-601, 2013.

KALIA, M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. **Metabolism**, v. 64, n. 3, p. 16-21, 2015.

KATZ, B. S. **Estudo dos genes e microRNAs relacionados à transição epitélio-mesenquimal no adenocarcinoma de próstata**. 2014. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

KIM, K. et al. Loss of ARID1A Expression in Gastric Cancer: Correlation with Mismatch Repair Deficiency and Clinicopathologic Features. **Journal Of Gastric Cancer**, v. 15, n. 3, p. 201-209, 2015.

KIM, Y. et al. Discovery of prostate specific antigen pattern to predict castration resistant prostate cancer of androgen deprivation therapy. **Bmc Medical Informatics And Decision Making**, v. 16, n. 1, p.1-9, 2016.

KRAUSE, W. C. et al. Androgen receptor and its splice variant, AR-V7, differentially regulate FOXA1 sensitive genes in LNCaP prostate cancer cells. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 54, p. 49-59, 2014.

KREEGER, P. K.; LAUFFENBURGER, D. A. Cancer systems biology: a network modeling perspective. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 2-8, 2010.

LEE, M. et al. ErbB-2 signaling is involved in regulating PSA secretion in androgen-independent human prostate cancer LNCaP C-81 cells. **Oncogene**, v. 22, n. 5, p. 781-796, 2003.

LITWIN, M. S.; TAN, H. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. **Jama**, v. 317, n. 24, p. 2532-2542, 2017.

LIU, C. et al. Effect of siRNA targeting HER2/neu on the proliferation and viability of prostate cancer PC-3M cells. **Genetics And Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 17145-17153, 2015.

LIU, J. et al. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization in *Panax ginseng* at Different Stages of Growth and in Different Organs. **Plos One**, v. 9, n. 11, e112177, 2015.

LIU, L. L. et al. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 33, n. 24, p. 3140-3150, 2014.

LU, P.; ROBERTS, C. W. The SWI/SNF tumor suppressor complex. **Nucleus**, v. 4, n. 5, p. 374-378, 2013.

LUCHINI, C. et al. Prognostic role and implications of mutation status of tumor suppressor gene ARID1A in cancer: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 6, n. 36, p. 39088-39097, 2015.

LUO, J. et al. Role of Androgen Receptor Variants in Prostate Cancer: Report from the 2017 Mission Androgen Receptor Variants Meeting. **European Urology**, v. 73, n. 5, p. 715-723, 2018.

MASLIAH-PLANCHON, J. et al. SWI/SNF Chromatin Remodeling and Human Malignancies. **Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 10, n. 1, p. 145-171, 2015.

MARTIN, S. K. et al. Emerging biomarkers of prostate cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 28, p. 409-417, 2012.

MARTINUCCI, B. **Relação entre a fibronectina e o câncer de próstata: análise de genes e microRNAs**. 2017. 49 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular Estrutural e Funcional) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

MATHUR, R. ARID1A loss in cancer: Towards a mechanistic understanding. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 190, p. 15-23, 2018.

MCBRIDE, M. J.; KADOCH, C. Disruption of mammalian SWI/SNF and polycomb complexes in human sarcomas: mechanisms and therapeutic opportunities. **The Journal Of Pathology**, p. 1-35, 2018.

MIZOKAMI, A. et al. Understanding prostate-specific antigen dynamics in monitoring metastatic castration-resistant prostate cancer: implications for clinical practice. **Asian Journal Of Andrology**, v. 19, n. 2, p. 143-148, 2017.

MOROZ, A. **Efeitos da finasterida sobre culturas de células epiteliais prostáticas normais e tumorais em diferentes sistemas in vitro**. 2013. 47 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

MOSCHETA, M. S.; SANTOS, M. A. Grupos de apoio para homens com câncer de próstata: revisão integrativa da literatura. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 17, n. 5, p. 1225-1233, 2012.

MOTA, S. T. S. **Expressão diferencial do gene PBRM1 e sua qualificação clínica em tumores de próstata**. 2017. 56 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

MOURA, C. M. **Análise da expressão da molécula CD44 e suas isoformas no câncer de próstata**. 2012. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MULLER, H. R.; PRADO, K. B. Epigenética: um novo campo da genética. **Rubs**, v. 1, n. 3, p. 61-69, 2008.

NAGL, N. G. et al. The p270 (ARID1A/SMARCF1) Subunit of Mammalian SWI/SNF-Related Complexes Is Essential for Normal Cell Cycle Arrest. **Cancer Research**, v. 65, n. 20, p. 9236-9244, 2005.

NARLIKAR, G.; SUNDARAMOORTHY, R.; OWEN-HUGHES, T. Mechanisms and Functions of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes. **Cell**, v. 154, n. 3, p. 490-503, 2013.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, 7-19, 2010.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NIH. **ARID1A gene**. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/arid1a#conditions>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NIH. **Hormone therapy for prostate cancer**. 2014. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/prostate/prostate-hormone-therapy-fact-sheet>>. Acesso em: 05 set. 2018.

NATIONAL CANCER INSTITUTE – NIH. **Risk factors for cancer**. 2015. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

NEVES, A. F. **Variações transcricionais dos genes AR, SRD5A2, KLK2, PCA3, KLK3 e PSMA e implicações no diagnóstico molecular do câncer de próstata**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

NISHI, S. M. et al. Emprego da RT-PCR em tempo real para a quantificação da expressão de genes associados à resposta imune em bezerros bovinos experimentalmente infectados por *Neospora caninum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 01, p. 8-14, 2009.

OKUGAWA, Y.; GRADY, W. M.; GOEL, A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer: Emerging Biomarkers. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1204-1225, 2015.

OLIVEIRA, G. G.; FONSECA, C. A. Uso de marcadores tumorais no diagnóstico e acompanhamento do tratamento do câncer. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, n. 2, p. 60-74, 2011.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. 111 f. Dissertação de mestrado – Universidade de Aveiro, 2010.

OZAWA, Y. et al. Decreased Expression of ARID1A Contributes to Infiltrative Growth of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **The Tohoku Journal Of Experimental Medicine**, v. 235, n. 3, p. 185-191, 2015.

PAIVA, G. **Genes candidatos a marcadores tumorais na progressão do adenocarcinoma de próstata identificados por análise de HR-CGH e CGH-ARRAY**. 2009. 215 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

PARK, J. H. et al. Decreased ARID1A expression correlates with poor prognosis of clear cell renal cell carcinoma. **Human Pathology**, v. 46, n. 3, p. 454-460, 2015.

PATTON, K. T. et al. Decreased annexin I expression in prostatic adenocarcinoma and in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. **Histopathology**, v. 47, n. 6, p. 597-601, 2005.

PAWELETZ, C. P. et al. Loss of annexin 1 correlates with early onset of tumorigenesis in esophageal and prostate carcinoma. **Cancer Research**, v. 60, n. 22, p. 6293-6297, 2000.

PAYNE, H.; CORNFORD, P. Prostate-specific antigen: An evolving role in diagnosis, monitoring, and treatment evaluation in prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 29, n. 6, p. 593-601, 2011.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. **New England Journal Of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1659-1672, 2005.

PIERRE, R. S.; KADOCH, C. Mammalian SWI/SNF complexes in cancer: emerging therapeutic opportunities. **Current Opinion In Genetics and Development**, v. 42, p. 56-67, 2017.

PROSTATE CANCER INSTITUTE. **Hormonal therapy**. 2018. Disponível em: <http://www.prostatecancer.org.au/pci/hormonal_therapy.html>. Acesso em: 05 set. 2018.

PONTES, S. **A influência da disfunção erétil na qualidade de vida de homens com câncer de próstata**. 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado em Gerontologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2018.

PULICE, J. L.; KADOCH, C. Composition and Function of Mammalian SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes in Human Disease. **Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology**, v. 81, p. 53-60, 2016.

RAAB, J. R. et al. Co-regulation of transcription by BRG1 and BRM, two mutually exclusive SWI/SNF ATPase subunits. **Epigenetics And Chromatin**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2017.

ROBINSON, D. et al. Integrative Clinical Genomics of Advanced Prostate Cancer. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 1215-1228, 2015.

RODRIGUES, R.; SALES, C. A. Aspectos epidemiológicos e diagnósticos do carcinoma prostático. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 6, n. 1, p. 131-140, 2013.

RUIZ, R. B.; HERNÁNDEZ, P. S. Diet and cancer: Risk factors and epidemiological evidence. **Maturitas**, v. 77, n. 3, p. 202-208, 2014.

RUSSELL, P. J.; KINGSLEY, E. A. Human Prostate Cancer Cell Lines. **Prostate Cancer Methods And Protocols**, p. 21-40, 2003.

SAHA, A.; WITTMAYER, J.; CAIRNS, B. R. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 6, p. 437-447, 2006.

SAINI, S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. **Cellular Oncology**, v. 39, n. 2, p. 97-106, 2016.

SARNOWSKA, E. et al. The Role of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes in Hormone Crosstalk. **Trends In Plant Science**, v. 21, n. 7, p. 594-608, 2016.

SARWAR, M. et al. Protein kinase A (PKA) pathway is functionally linked to androgen receptor (AR) in the progression of prostate cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 32, n. 1, p. 1-12, 2014.

SATO, L. S. **Padronização da metodologia de PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica da proteína dash de *Histoplasma CaPsulatum***. 2015. 74 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia-Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

SAVAS, S.; SKARDASI, G. The SWI/SNF complex subunit genes: Their functions, variations, and links to risk and survival outcomes in human cancers. **Critical Reviews In Oncology/Hematology**, v. 123, p. 114-131, 2018.

SCHAEFFER, M. et al. Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 57, p. 7180-7191, 2008.

SCHALKEN, J. Androgen Receptor Mediated Growth of Prostate (Cancer). **European Urology Supplements**, v. 4, n. 8, p. 4-11, 2005.

SCHUURMANS A. L et al. Regulation of growth of LNCaP human prostate tumor cells by growth factors and steroid hormones. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, v. 40, p. 193-197, 1991.

SCHWEIZER, M. T.; YU, E. Y. Persistent androgen receptor addiction in castration-resistant prostate cancer. **Journal Of Hematology And Oncology**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2015.

SENA, J. A.; WANG, L.; HU, C. BRG1 and BRM Chromatin-Remodeling Complexes Regulate the Hypoxia Response by Acting as Coactivators for a Subset of Hypoxia-Inducible Transcription Factor Target Genes. **Molecular And Cellular Biology**, v. 33, n. 19, p. 3849-3863, 2013.

SHAIN, A. H.; POLLACK, J. R. The Spectrum of SWI/SNF Mutations, Ubiquitous in Human Cancers. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2013.

SHARIFI, N. et al. HER2 gene amplification in patients with prostate cancer: Evaluating a CISH-based method. **Oncology Letters**, v. 12, n. 6, p. 4651-4658, 2016.

SHARP, A. et al. Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer. **Journal Of Clinical Investigation**, p.1-39, 2018.

SHEIKH, M. H.; SOLITO, E. Annexin A1: Uncovering the Many Talents of an Old Protein. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 3-20, 2018.

SIGNORETTI, S. et al. Her- 2 neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 23, p. 1918-1925, 2000.

SKULTE, K. et al. Chromatin remodeler mutations in human cancers: epigenetic implications. **Epigenomics**, v. 6, n. 4, p. 397-414, 2014.

SMOLLE, M. et al. Current Insights into Long Non-Coding RNAs (LncRNAs) in Prostate Cancer. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 473-5, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA – SBU. **Câncer de próstata**. Disponível em: <<http://sbu-sp.org.br/publico/doencas/cancer-de-prostata-3/>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

STEFFENSEN K. D. et al. Protein levels and gene expressions of the epidermal growth factor receptors, HER1, HER2, HER3 and HER4 in benign and malignant ovarian tumors. **International Journal of Oncology**, v. 33, n. 1, p. 195-204, 2008.

SUN, S. et al. Castration resistance in human prostate cancer is conferred by a frequently occurring androgen receptor splice variant. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 120, n. 8, p. 2715-2730, 2010.

SUN, X. et al. Arid1a Has Context-Dependent Oncogenic and Tumor Suppressor Functions in Liver Cancer. **Cancer Cell**, v. 32, n. 5, p. 574-589, 2017.

TAI, S. et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. **The Prostate**, v. 71, n. 15, p. 1668-1679, 2011.

TAILLE, A. et al. Factors predicting progression to castrate-resistant prostate cancer in patients with advanced prostate cancer receiving long-term androgen-deprivation therapy. **BJU International**, v. 119, n. 1, p. 74-81, 2016.

TAKAO, C. et al. Downregulation of ARID1A, a component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, in breast cancer. **Journal Of Cancer**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2017.

TAKEDA, T. et al. ARID1A gene mutation in ovarian and endometrial cancers (Review). **Oncology Reports**, v. 35, n. 2, p. 607-613, 2016.

TOIVANEN, R.; SHEN, M. M. Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. **Development**, v. 144, n. 8, p. 1382-1398, 2017.

TOMIOKA, A. et al. Nadir PSA level and time to nadir PSA are prognostic factors in patients with metastatic prostate cancer. **Bmc Urology**, v. 14, n. 1, p. 1-6, 2014.

TONON, T. C. A.; SCHOFFEN, J. P. F. Câncer de próstata: uma revisão da literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 3, p. 403-410, 2009.

UROLOGY CARE FOUNDATION. **Hormone therapy**. Disponível em: <<http://www.urologyhealth.org/urologic-conditions/advanced-prostate-cancer/treatment/hormone-therapy>>. Acesso em: 05 set. 2018.

VELONAS, V. M. et al. Current Status of Biomarkers for Prostate Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 11034-11060, 2013.

VOLPATO, L. K. **Expressão da anexina A1, seu receptor FPR2/ALX e citocinas inflamatórias na endometriose peritoneal e no peritônio saudável**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Palhoça, 2017.

WADOSKY, K. M.; KOOCHEKPOUR, S. Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. **Oncotarget**, v. 8, n. 11, p. 18550-18576, 2017.

WALLBERG, et al. Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 6, p. 2004-2013, 2000.

WANG, D. et al. Decreased Expression of the ARID1A Gene Is Associated with Poor Prognosis in Primary Gastric Cancer. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. e40364, 2012.

WANG, K. et al. Recent advances on the progressive mechanism and therapy in castration-resistant prostate cancer. **Oncotargets And Therapy**, v. 11, p. 3167-3178, 2018.

WANG, K. et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. **Nature Genetics**, v. 46, n. 6, p. 573-582, 2014.

WANG, S. et al. Expression of Androgen Receptor Variant 7 (AR-V7) in Circulated Tumor Cells and Correlation with Drug Resistance of Prostate Cancer Cells. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 7051-7056, 2018.

WANG, X. et al. Validation of internal reference genes for relative quantitation studies of gene expression in human laryngeal cancer. **Peerj**, v. 4, e2763, 2016.

WEBBER, M. M.; BELLO, D.; QUADER, S. Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. **The Prostate**, v. 30, n. 1, p. 58-64, 1997.

WEI, X. Clinicopathologic and prognostic relevance of ARID1A protein loss in colorectal cancer. **World Journal Of Gastroenterology**, v. 20, n. 48, p. 18404-18413, 2014.

WEINER, A. B.; KUNDU, S. D. Prostate Cancer: A Contemporary Approach to Treatment and Outcomes. **Medical Clinics Of North America**, v. 102, n. 2, p. 215-229, 2018.

WHITEMAN, D. C.; WILSON, L. F. The fractions of cancer attributable to modifiable factors: A global review. **Cancer Epidemiology**, v. 44, p. 203-221, 2016.

WIEGAND, K. C. et al. ARID1A/BAF250a as a prognostic marker for gastric carcinoma: a study of 2 cohorts. **Human Pathology**, v. 45, n. 6, p. 1258-1268, 2014.

WILLIAMSON, C. T. et al. ATR inhibitors as a synthetic lethal therapy for tumours deficient in ARID1A. **Nature Communications**, v. 7, p. 1-13, 2016.

WILSKER, D. et al. The DNA-binding properties of the ARID-containing subunits of yeast and mammalian SWI/SNF complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 4, p. 1345-1353, 2004.

WODEWOTZKY, T. I. **Padronização da técnica de PCR em tempo-real na avaliação da pluripotência de células-tronco mesenquimais caninas** 2010. 29 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 26 ago. 2018.

WU, R.; WANG, T.; SHIH, I. The emerging roles of ARID1A in tumor suppression. **Cancer Biology And Therapy**, v. 15, n. 6, p. 655-664, 2014.

WU, Y.; SARKISSYAN, M.; VADGAMA, J. V. Epigenetics in Breast and Prostate Cancer. **Methods In Molecular Biology**, p. 425-466, 2014.

YAN, H. et al. Reduced expression of the chromatin remodeling gene ARID1A enhances gastric cancer cell migration and invasion via downregulation of E-cadherin transcription. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 4, p. 867-876, 2013.

YEH S. et al. From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. **PNAS**, v. 96, n. 10, p. 5458-5463, 1999.

YOKOYAMA, Y. et al. Decreased ARID1A expression is correlated with chemoresistance in epithelial ovarian cancer. **Journal Of Gynecologic Oncology**, v. 25, n. 1, p. 58-63, 2014.

ZHANG, L. et al. Loss of ARID1A Expression Correlates With Tumor Differentiation and Tumor Progression Stage in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Technology In Cancer Research And Treatment**, v. 17, p. 1-10, 2018.

ZHANG, X. et al. Androgen Receptor Variants Occur Frequently in Castration Resistant Prostate Cancer Metastases. **Plos One**, v. 6, n. 11, e27970, 2011.

ZHAO, J. et al. The Clinicopathologic Significance of BAF250a (ARID1A) Expression in Hepatocellular Carcinoma. **Pathology & Oncology Research**, v. 22, n. 3, p. 453-459, 2015.

ZHOU, C. Y. et al. Mechanisms of ATP-Dependent Chromatin Remodeling Motors. **Annual Review Of Biophysics**, v. 45, n. 1, p. 153-181, 2016.