

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

Alexandre Videira

Efeito do lincRNA *PVT1* associado ao potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2) e ao receptor de andrógeno (AR) sobre a expressão gênica em larga escala em células LNCaP de câncer de próstata

Versão corrigida da tese

São Paulo

02/04/2019

Alexandre Videira

Efeito do lincRNA *PVT1* associado ao potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2) e ao receptor de andrógeno (AR) sobre a expressão gênica em larga escala em células LNCaP de câncer de próstata

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Dr. Sergio Verjovski-Almeida

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

V652e Videira, Alexandre
Efeito do lincRNA PVT1 associado ao potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2) e ao receptor de andrógeno (AR) sobre a expressão gênica em larga escala em células LNCaP de câncer de próstata / Alexandre Videira. - São Paulo, 2019.
122 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Verjovski-Almeida, Sergio

1. Expressão gênica. 2. Epigenética. 3. Biologia molecular. 4. lincRNA. I. T. II. Verjovski-Almeida, Sergio, orientador.

À minha família, que sempre me apoiou. Dedico de maneira especial à minha mãe Zilda Ribeiro Videira, à minha irmã Bruna Helena Videira e à minha tia Maria Aparecida de Oliveira que viabilizaram a minha jornada e sempre estiveram ao meu lado.

Agradecimentos

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a minha mãe Zilda, a minha irmã Bruna e a minha tia Maria, que acompanharam a minha jornada ao longo desses últimos quatro anos e meio. Esse período foi muito desafiador e proporcionou-me imenso amadurecimento profissional e pessoal. Sem o apoio incondicional da minha família, tudo teria sido bem mais difícil.

Ao professor Sergio Verjovski-Almeida, pela orientação no e oportunidade do doutorado.

Agradeço à FAPESP e à CAPES que através do convênio FAPESP/CAPES me concederam a bolsa de doutorado do processo número 2015/00324-6, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o que me possibilitou apoio financeiro para a realização do projeto.

Ao CNPq pelo apoio financeiro no início do projeto, que gerou a oportunidade para que este projeto fosse executado.

Agradeço à USP e ao Instituto Butantã pela admissão, pela estrutura laboratorial e intelectual durante todos esses anos.

Agradeço imensamente ao Felipe pelo trabalho em conjunto desde o início até fim do projeto; pelas intermináveis discussões, auxílios e dicas sobre os experimentos e pelas análises realizadas dos dados de microarranjo.

Agradeço imensamente a Ana Paula por tornar a minha vida acadêmica mais fácil e menos burocrática.

Agradeço imensamente ao David Pires, pelas conversas, conselhos, dicas, auxílios e compartilhamento de sonhos e aflições.

Agradeço aos meus colegas e amigos de laboratório: Adriana, Ana Ayupe, André, Daisy, David, David Pires, Dinar, Érica, Gilbert, João, Leandro, Letícia, Lucas, Lucas Silva, Murilo, Raphael e Sandra pelos ensinamentos, incentivos, ideias, discussões produtivas nos seminários, risadas, cafés e cervejas.

Á Katia e ao Yuri pela ajuda nas análises dos dados de microarranjo.

Agradeço à Rafaela e ao professor Hernandes Faustino por cederem as células LNCaP em um momento crucial para o projeto.

Agradeço aos meus amigos de república: Cássio, Érika, Lucas, Rômulo, Nicolas e Karent pela companhia, conselhos e conversas ao longo desses quatro anos.

Por fim, agradeço à secretaria de Pós-Graduação e a Comissão de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica), pelo suporte constante e pelo gerenciamento do Programa de Pós-Graduação.

Resumo

Videira, A. **Efeito do lincRNA *PVT1* associado ao potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2) e ao receptor de andrógeno (AR) sobre a expressão gênica em larga escala em células LNCaP de câncer de próstata.** 2019. 122p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O lincRNA *PVT1* (*Plasmacytoma Variant Translocation 1*) é um RNA longo não codificador de proteínas (ncRNA) descrito como um oncogene sendo superexpresso em vários tipos de cânceres. LincRNA *PVT1* está localizado na região genômica 8q24, também conhecida como 'gene desert'. O nível de expressão do lincRNA *PVT1* está associado ao aumento do risco de câncer de próstata (PCa) e está correlacionado com os níveis de expressão do receptor de andrógeno (AR). No entanto, o mecanismo do envolvimento do lincRNA *PVT1* com o AR no desenvolvimento de câncer de próstata ainda não está bem esclarecido. Aqui, nós testamos a hipótese que a formação do complexo AR-EZH2-*PVT1* participa na regulação da expressão gênica em câncer de próstata, nas células LNCaP. A imunoprecipitação de ribonucleoproteínas seguida de PCR quantitativo (RIP-qPCR) revelou que o lincRNA *PVT1* está associado fisicamente ao AR (12% do *input*) e à metiltransferase EZH2, proteína componente do complexo repressor Polycomb 2 (36% do *input*) sob condições suplementadas com andrógeno (+R1881). O lincRNA *PVT1* também está associado fisicamente ao AR (10% de *input*) e à EZH2 (42% de *input*) em condições de privação de andrógeno (-R1881). Assim, a associação física entre lincRNA *PVT1*, AR e EZH2 é independente do hormônio andrógeno. Usando uma abordagem de estudo em larga-escala de perda e ganho de função, nossos resultados mostraram que o silenciamento do lincRNA *PVT1* em células LNCaP na presença de andrógeno restaura a expressão parcialmente, totalmente ou causa superexpressão de 160 genes que tiveram a expressão inibida por andrógeno. Entre esses genes, destacamos genes envolvidos na regulação da diferenciação celular, em componentes da junção célula-célula, na inibição da migração e invasão celular e no desencadeamento da via apoptótica. Imunoprecipitação da cromatina seguida de PCR quantitativo (ChIP-qPCR), em cultura de células LNCaP suplementada com andrógeno sob silenciamento do lincRNA *PVT1*, mostrou aumento significativo na ocupação pela marca de histona ativadora H3K27Ac do promotor do gene *NOV*, um dos genes que tiveram sua expressão aumentada com o silenciamento de *PVT1*. O ChIP-qPCR também mostrou, após o

silenciamento do lincRNA *PVT1*, um aumento significativo da marca H3K27me3 na região *enhancer* do gene *NOV*, uma característica de *enhancers poised* (prontos para ativação). Em conclusão, nós fornecemos a primeira evidência experimental para um mecanismo de ação do oncogene lincRNA *PVT1* em células de câncer de próstata e demonstramos que sua ação inibidora da expressão afeta genes alvo que facilitam a proliferação e migração de células do câncer de próstata, sugerindo que o lincRNA *PVT1* é um novo agente no complexo mecanismo de repressão transcricional envolvendo um RNA silenciador, o receptor de andrógeno (AR) e o potenciador *de Zeste* homólogo 2 (EZH2) no remodelamento da cromatina em células LNCaP.

Palavras-chave: lincRNA *PVT1*, receptor de andrógeno (AR), potenciador de *Zeste* homólogo 2 (EZH2), câncer de próstata.

Abstract

Videira, A. **Effect of lincRNA *PVT1* associated with Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) and with androgen receptor (AR) on the large-scale gene expression in LNCaP prostate cancer cells.** 2019. 122p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Long non-coding RNA (lincRNA) plasmacytoma variant translocation 1 (*PVT1*) is an oncogene known to be overexpressed in various types of cancer. *PVT1* lincRNA is located in the well-known cancer-related genomic region 8q24, also known as 'gene desert'. *PVT1* lincRNA level of expression is associated with increased prostate cancer (PCa) risk and is correlated with androgen receptor (AR) expression levels. However, the mechanism of *PVT1* and AR involvement in the development of prostate cancer is still unclear. Here, we tested the hypothesis that formation of the complex AR-EZH2-*PVT1* participates in the regulation of gene expression in prostate cancer, in LNCaP cells. Ribonucleoprotein immunoprecipitation followed by quantitative PCR (RIP-qPCR) revealed that *PVT1* lincRNA binds both the AR (12 % of *PVT1* input) and the methyltransferase EZH2 from the Polycomb repressive complex 2 (36 % of input) under androgen-supplemented conditions (+R1881). *PVT1* also binds both AR (10 % of input) and EZH2 (42 % of input) under androgen-deprived conditions (-R1881). Thus, *PVT1* binding to AR and EZH2 is independent of the androgen hormone. Using a large-scale loss and gain of function approach, our results show that *PVT1* knockdown (KD) in LNCaP in the presence of androgen restores the expression partially, fully or causes overexpression of 160 genes that are inhibited by androgen. Among these genes, we highlight genes involved in regulation of cell differentiation, in components of cell-cell junction, in inhibition of cell migration and invasion and in triggering of the apoptotic pathway. Chromatin immunoprecipitation followed by quantitative PCR (ChIP-qPCR) with LNCaP cells in androgen-supplemented cultures under *PVT1* lincRNA knockdown showed a significant increase in occupancy by the histone activation mark H3K27Ac of the promoter region of the *NOV* gene, one of the genes that had an increased expression upon *PVT1* silencing. ChIP-qPCR also showed a significant increase upon *PVT1* lincRNA silencing of the H3K27me3 histone mark in the enhancer region of the *NOV* gene, a distinct feature of poised enhancers. In conclusion, we provide first experimental evidence for a mechanism of action of *PVT1* lincRNA oncogene in prostate cancer cells, and show that its inhibitory action affects target

genes that facilitate proliferation and migration of prostate cancer cells, thus suggesting *PVT1* lincRNA as a novel lincRNA player in the complex mechanism of transcriptional repression involving a silencer RNA, the androgen receptor (AR) and the Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) in chromatin remodeling in LNCaP cells.

Keywords: *PVT1* lincRNA, androgen receptor (AR), Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2), prostate cancer.

Lista de abreviaturas e siglas

ACTB:	Beta-actina
AF-1:	Motivo de ativação independente de ligante
AF-2:	Motivo de ativação dependente de ligante
AR:	Receptor de andrógeno
ARE:	Androgen Responsive Element, elemento responsivo ao andrógeno
ASO:	<u>Antisense oligonucleotide</u>
BPH:	Hiperplasia prostática benigna
cDNA:	DNA complementar
ChIP:	Imunoprecipitação da cromatina
CRPC:	Câncer de próstata resistente à castração
DBD:	Domínio de ligação ao DNA
DHT:	Dihidrotestosterona
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
EMT:	Transição epitelial-mesenquimal
ENCODE:	Encyclopedia of DNA Elements
EZH2:	Enhancer of Zeste homolog 2, Potenciador de Zeste homólogo 2
GAPDH:	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
H3K27Ac:	Acetilação da lisina 27 da histona 3
H3K27me3:	Trimetilação da lisina 27 da histona 3
H3K4me3:	Trimetilação da lisina 4 da histona 3
HOTAIR:	Hox Transcript Antisense RNA
HR:	Hinge region, Região de dobradiça
Hsp:	Proteínas de choque térmico
IgG:	Imunoglobulina G
kb:	Kilobases
LBD:	Domínio de ligação ao ligante

lincRNA:	Long intergenic non-coding RNA, RNA não codificador de proteínas longo intergênico
LNCaP:	<u>c</u> âncer de <u>p</u> róstata derivado de metastase em <u>l</u> info <u>n</u> odo
lncRNA:	Long non-coding RNA, RNA não codificador de proteínas longo
MALAT1:	Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1
mRNA:	RNA mensageiro
NES:	Sinal de exportação para o núcleo
NLS:	Sinal de localização nuclear
nt:	Nucleotídeos
NTD:	Domínio N-terminal
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase
PRC2:	Complexo repressivo <i>polycomb 2</i>
PSA:	Antígeno prostático específico
PVT1:	Plasmacytoma Variant Translocation 1
qPCR:	PCR quantitativa
RIP:	Imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos
RNA-seq:	Sequenciamento em larga escala de RNA
RNA:	Ácido ribonucleico
RNAi:	Interferência de RNA
RNAP II:	RNA polimerase II
RPMI:	Instituto Roswell Park Memorial
RT-qPCR:	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa
RT:	Reverse transcription, transcrição reversa
SUZ12:	Proteína Polycomb SUZ12
TSS:	Transcription start site, Sítio de início da transcrição

Lista de figuras

Figura 1: Zonas anatômicas da próstata.	16
Figura 2: Estrutura química do colesterol, testosterona, di-hidrotestosterona e R1881.	20
Figura 3: Representação da estrutura do gene do receptor de andrógeno (AR), do transcrito mRNA e da proteína.....	22
Figura 4: Esquema representativo do <i>locus</i> do lincRNA <i>PVT1</i> no genoma.	32
Figura 5: Hipótese sugerida neste projeto.....	37
Figura 6: Método de amplificação de cRNA e marcação com fluoróforos Cy3 e Cy5 para microarranjo com duas cores.	47
Figura 7: Normalização por quantil.....	49
Figura 8: Expressão de genes responsivos a andrógeno em cultura de células LNCaP.	58
Figura 9: LincRNA <i>PVT1</i> está associado ao receptor de andrógeno (AR) na presença e ausência de andrógeno.....	59
Figura 10: LincRNA <i>PVT1</i> está associado à proteína EZH2 na presença e ausência de andrógeno.	61
Figura 11: Mapa das regiões genômicas do transcrito lincRNA <i>PVT1</i> em que anelam os <i>gapmers</i> utilizados para o silenciamento da transcrição do lincRNA <i>PVT1</i>	63
Figura 12: Silenciamento da transcrição do lincRNA <i>MALAT1</i> , usado como controle positivo das condições de transfecção.	64
Figura 13: RT-qPCR para avaliar o silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i> em células LNCaP.	65
Figura 14: Genes responsivos a andrógeno em células LNCaP em cultura.....	67
Figura 15: Confirmação por RT-qPCR da mudança de expressão de um conjunto selecionado de genes, induzida pelo tratamento de células LNCaP com andrógeno (R1881).....	68
Figura 16: Genes afetados pelo silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i> em células LNCaP na condição desprovida de andrógeno.....	70
Figura 17: Genes afetados pelo silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i> em células LNCaP na condição suplementada com andrógeno.....	72
Figura 18: Diagrama de Venn comparando os genes cuja expressão foi afetada pelo silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i> em células LNCaP em cultura desprovida de ou suplementada com andrógeno.....	74
Figura 19: Diagrama de Venn comparando todos os genes inibidos por andrógeno contra os genes ativados pelo silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i> nas condições desprovida de ou suplementada com andrógeno.....	75
Figura 20: Genes com expressão aumentada pelo silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i> em células LNCaP na presença de andrógeno.....	76

Figura 21: Ontologias gênicas (GOs) significativamente enriquecidas entre os 160 genes com expressão diminuída por andrógeno e aumentada pelo silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i> na presença de andrógeno.....	78
Figura 22: Validação por RT-qPCR de genes em células LNCaP que apresentam inibição da transcrição por andrógeno de forma dose dependente (lado esquerdo) e validação do aumento da expressão após o silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i> (lado direito).	83
Figura 23: Expressão relativa dos genes AR, EZH2 e SUZ12 medida por RT-qPCR em células LNCaP após o silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i>	85
Figura 24: Grau de ocupação do promotor e do <i>enhancer</i> do gene <i>NOV</i> por diferentes marcas de histona em células LNCaP suplementadas com andrógeno, com e sem silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i>	90

Lista de tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de qPCR..... 40

Tabela 2: *Gapmers* (Exiqon/Qiagen) utilizados nos ensaios de silenciamento do lincRNA *PVT1*..... 46

Sumário

1. Introdução.....	15
1.1. A próstata.....	15
1.2. Câncer de próstata.....	17
1.3. Hormônio androgênico.....	18
1.4. Receptor de andrógeno.....	21
1.5. RNA longo não codificador (lncRNA).....	26
1.5.1. O lincRNA <i>PVT1</i>	31
2. Objetivos.....	37
2.1. Objetivo geral.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. Material e Métodos.....	38
3.1. Linhagem celular e condições de cultivo.....	38
3.2. Extração de RNA, purificação e tratamento com DNase.....	38
3.3. Quantificação e avaliação da qualidade do RNA.....	39
3.4. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (<i>Primers</i>).....	39
3.5. Transcrição reversa e síntese de cDNA.....	41
3.6. PCR quantitativa em tempo real.....	42
3.7. Imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos – RIP seguido de RT-qPCR.....	43
3.8. Silenciamento gênico com oligonucleotídeo antisense - ASO.....	44
3.9. Análise da expressão gênica em larga-escala em LNCaP sob silenciamento do lincRNA <i>PVT1</i>	46
3.10. Cluster hierárquico.....	51
3.11. Diagrama de Venn.....	52
3.12. Ontologia dos genes diferencialmente expressos.....	52
3.13. Estudo da dependência de dose do hormônio.....	52
3.14. Imunoprecipitação da cromatina – CHIP-qPCR.....	53
3.15. Estatística.....	55
4. Resultados e discussão.....	56
4.1. Imunoprecipitação de Ribonucleoproteínas seguida de qPCR dos RNAs co-Imunoprecipitados (RIP-qPCR).....	56
4.2. Alteração da expressão gênica em larga-escala em células LNCaP sob silenciamento da expressão do lincRNA <i>PVT1</i>	62
4.3. CHIP-qPCR para mapeamento das marcas epigenéticas presentes na região promotora de um gene regulado pelo silenciamento de <i>PVT1</i>	88
5. Conclusões.....	93
Referências.....	95
Apêndices.....	111

1. Introdução

1.1. A próstata

A próstata é uma glândula presente nos homens, localizada abaixo da bexiga e anexa a uretra prostática e ao ducto ejaculador (**Figura 1**) (Spalteholz and Spanner 2006, Paulsen and Waschke 2008). A principal função da próstata é ajudar na produção de sêmen, um fluido que carrega o esperma do testículo através da uretra até o pênis no momento da ejaculação (Spalteholz and Spanner 2006, Paulsen and Waschke 2008).

A secreção prostática é ligeiramente alcalina, o que aumenta a mobilidade dos espermatozoides e auxilia na fertilização, por neutralizar as secreções ácidas do canal deferente e da vagina. Coletivamente, as secreções combinadas das glândulas acessórias sexuais masculinas representam 90 % do volume do sêmen, e os espermatozoides formam os 10 % restantes (Koeppen and Stanton 2009, Costanzo 2011, Aires 2015).

Anatomicamente, a próstata pode ser dividida em 4 zonas: central, transicional, anterior e periférica (**Figura 1**). A zona periférica concentra o maior número de casos registrados de câncer de próstata. O entendimento sobre a zona na qual o câncer de próstata é predominante é essencial para o diagnóstico, o acompanhamento da progressão e recorrência da doença por meio de níveis de antígeno prostático específico (PSA, visto posteriormente no texto) ou biopsia (McNeal 1981).

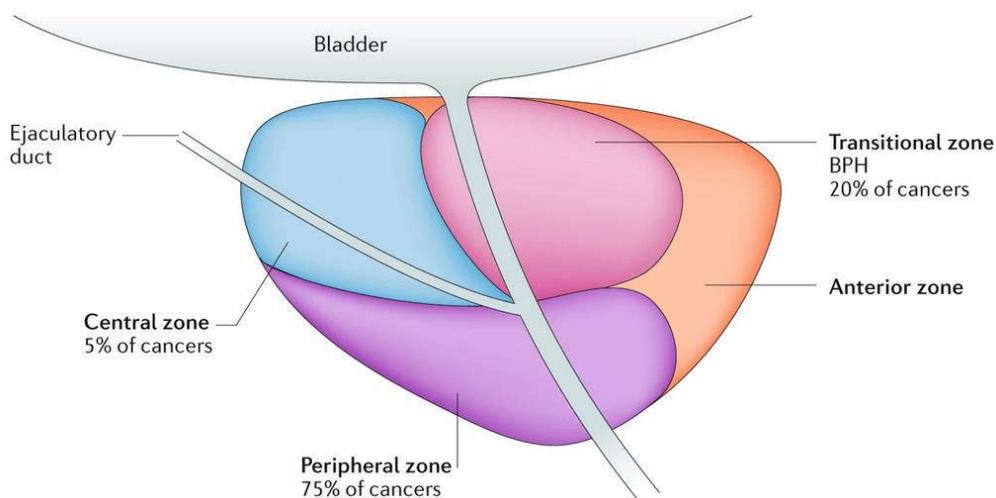


Figura 1: Zonas anatômicas da próstata.

O entendimento da anatomia da próstata, em particular as zonas nas quais predominam as diferentes doenças prostáticas, é fundamental para o controle da doença. Carcinomas quase sempre se desenvolvem na zona periférica, que ocupa 70% da glândula, enquanto a hiperplasia nodular (*benign prostatic hypertrophy* – BPH) tende a ser um processo que ocorre na zona de transição (Humphrey 2004).

A biópsia é realizada, geralmente, com a retirada por meio de uma agulha de uma amostra do tecido da próstata. Então, um patologista analisa a aparência histológica do material coletado, mais especificamente, a extensão da diferenciação glandular e o padrão de crescimento do estroma, atribuindo a cada amostra um valor referente ao índice de Gleason (Humphrey 2004). Em 1966, Donald Gleason desenvolveu um sistema de índice para determinar a extensão da diferenciação glandular e o padrão de crescimento do estroma (Gleason 1966) e tornou-se um fator de prognóstico para o acompanhamento da progressão do câncer de próstata (Sathianathen, Konety et al. 2018). Subsequentes modificações foram realizadas com o intuito de garantir reprodutibilidade com a padronização e a interpretação das características estruturais (Delahunt, Miller et al. 2012, Epstein, Egevad et al. 2016).

O índice é baseado na aparência histológica do tecido do câncer de próstata; para isso, o material para a realização da biópsia é coletado em duas partes diferentes do tumor e

é atribuído valor de 1 a 5 para cada uma delas. Esse valor é atribuído de forma crescente de acordo com a gravidade do câncer de próstata, o valor 1 é dado às células com forma bem diferenciada, enquanto o valor 5 é atribuído às células com a forma pouco diferenciada. Em seguida, os dois valores são somados e, assim, é encontrado o índice de Gleason (Humphrey 2004).

Novos métodos de diagnóstico surgem conforme há o desenvolvimento de novas tecnologias; por exemplo, técnicas de sequenciamento do DNA ou do transcriptoma estão em evidência. Como o câncer é um conjunto de doenças, a expectativa é que no futuro cada paciente receba um tratamento mais personalizado, explorando o conjunto de mutações do carcinoma encontrado especificamente naquele paciente (Helfand, Catalona et al. 2015).

1.2. Câncer de próstata

O câncer de próstata (PCa) é o segundo tipo de câncer mais diagnosticado em homens no mundo. A taxa de incidência é maior em países desenvolvidos comparada a países em desenvolvimento, o que parece estar correlacionado a capacidade de diagnóstico e registro desses países (Torre, Bray et al. 2015, Bray, Ferlay et al. 2018). Em relação à mortalidade, o PCa cai para a quinta posição, devido ao diagnóstico precoce do câncer (Torre, Bray et al. 2015, Bray, Ferlay et al. 2018). No Brasil, o PCa segue na segunda posição em número de diagnósticos, atrás apenas do câncer de pele não melanoma (INCA 2019). Alguns fatores de risco estão associados ao PCa e contribuem para o surgimento e desenvolvimento do câncer, como a idade, obesidade, histórico familiar, etnia e inatividade física (Leitzmann and Rohrmann 2012, Torre, Bray et al. 2015, Dickerman, Ahearn et al. 2017).

O desenvolvimento e a progressão do PCa são altamente dependentes do receptor de andrógeno (Debes and Tindall 2002, Zhou, Bolton et al. 2015). O tratamento contra o PCa consiste na diminuição da atividade do receptor de andrógeno (AR). A primeira medida nesse sentido é a privação do hormônio andrógeno através da castração química ou administração de antagonistas. Dessa forma, o receptor de andrógeno perde a sua atividade, o câncer para de progredir e desencadeia a morte celular (Feldman and Feldman 2001, Zhou, Bolton et al. 2015). Contudo, com o passar dos anos, o câncer pode recorrer em uma forma mais agressiva e independente do hormônio andrógeno, denominada câncer de próstata resistente à castração (CRPC). Não há tratamento efetivo para a forma mais agressiva e os pacientes podem ir a óbito devido à metástase do CRPC (Feldman and Feldman 2001, Lamont and Tindall 2011).

Mecanismos pelos quais o receptor de andrógeno pode restaurar a sua atividade envolvem o aumento da síntese de andrógeno intratumoral, aumento da expressão dos coativadores ou mutações no receptor de andrógeno (Yuan and Balk 2009). As mutações podem ativar o receptor de andrógeno de diversas maneiras diferentes: aumentar a sensibilidade do receptor de andrógeno a baixas concentrações de hormônio; reduzir a especificidade na região ligadora de hormônio, permitindo a ativação do receptor por outros hormônios ou antagonistas; ativação por quinase sem a presença de hormônio, ligação independente de hormônio; bloqueio do sinal de apoptose (Feldman and Feldman 2001).

1.3. Hormônio androgênico

No homem, as principais fontes de hormônios androgênicos são a glândula adrenal e o testículo (Koeppen and Stanton 2009, Costanzo 2011, Aires 2015). Em ambos os locais de síntese, a molécula precursora é o colesterol. Os hormônios androgênicos são fundamentais

para a diferenciação sexual, o amadurecimento sexual e a fertilidade masculina, sendo que o mais abundante na circulação é a testosterona. A testosterona é produzida nas células de Leydig, nos testículos, e é secretada no fluído dos túbulos seminíferos e nos capilares intersticiais, de onde atinge a circulação sistêmica para posteriormente exercer seu efeito endócrino (Koeppen and Stanton 2009, Costanzo 2011, Aires 2015).

A testosterona secretada na circulação periférica liga-se rapidamente a proteínas séricas. Aproximadamente 98 % da testosterona circulante estão complexadas às proteínas globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) e à albumina. Cerca de apenas 2 % da testosterona circulante ficam disponíveis na forma livre e são capturadas pelas células-alvo e, à medida que isso ocorre, novas moléculas do hormônio se desprendem das proteínas ligadoras e recompõem o estoque livre de testosterona livre, atingindo um equilíbrio. Nos tecidos alvos, a testosterona é convertida na sua forma mais ativa a di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 α -redutase (**Figura 2**) (Koeppen and Stanton 2009, Costanzo 2011, Aires 2015).

A testosterona e a di-hidrotestosterona (DHT) exercem os seus efeitos por meio da ligação ao receptor de andrógeno (AR), que, por conseguinte, regula a expressão gênica nas células da próstata (ROY, 1998).

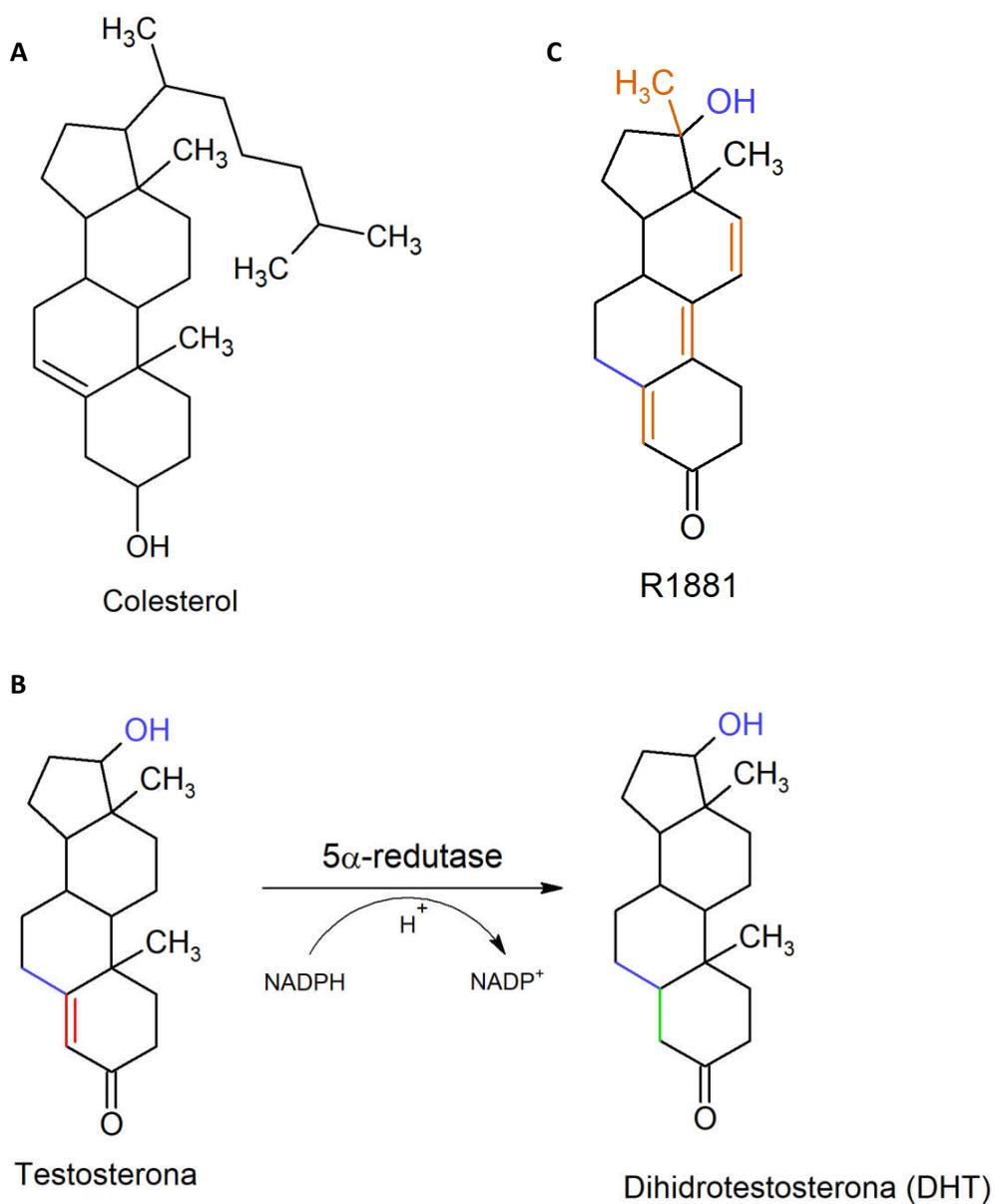


Figura 2: Estrutura química do colesterol, testosterona, di-hidrotestosterona e R1881.

No sentido anti-horário. A. Molécula de colesterol obtido via alimentação e precursor da testosterona, produzida nas glândulas adrenais. B. Conversão de testosterona para di-hidrotestosterona pela enzima 5 α -reductase, expressa apenas na próstata. C. Molécula de R1881 (Metiltrienolona) análogo à dihidrotestosterona utilizada neste projeto, por ser mais estável do que a dihidrotestosterona. As cores representam as diferenças na estrutura química referente à molécula de colesterol.

1.4. Receptor de andrógeno

O andrógeno exerce o seu efeito biológico através do receptor de andrógeno (AR). O AR é um membro da superfamília de receptores nucleares do tipo I, que são ativados por um hormônio específico, neste caso, o andrógeno e o seu derivado mais potente, a Dihidrotestosterona (DHT) (Lu, Wardell et al. 2006, Uo, Plymate et al. 2017).

O gene para o receptor de andrógeno está localizado no cromossomo X, na posição q11-12. O *splicing* canônico produz um transcrito com 8 éxons (**Figura 3**), sendo que o éxon 1 codifica o domínio N-terminal (NTD), que representa aproximadamente 60 % da proteína e inclui a região com função de ativação independente de ligante (AF-1) e o domínio FXXFL. Os éxons 2 e 3 codificam o domínio de ligação ao DNA (DBD). A extremidade 5' do éxon 4 codifica a região de dobradiça (HR). A partir da extremidade 3' do éxon 4 até o éxon 8 é codificado o domínio de ligação ao ligante (LBD), que inclui a região com ativação dependente de ligante (AF-2), sinal de localização nuclear (NLS) e sinal de exportação para o núcleo (NES) (Uo, Plymate et al. 2017).

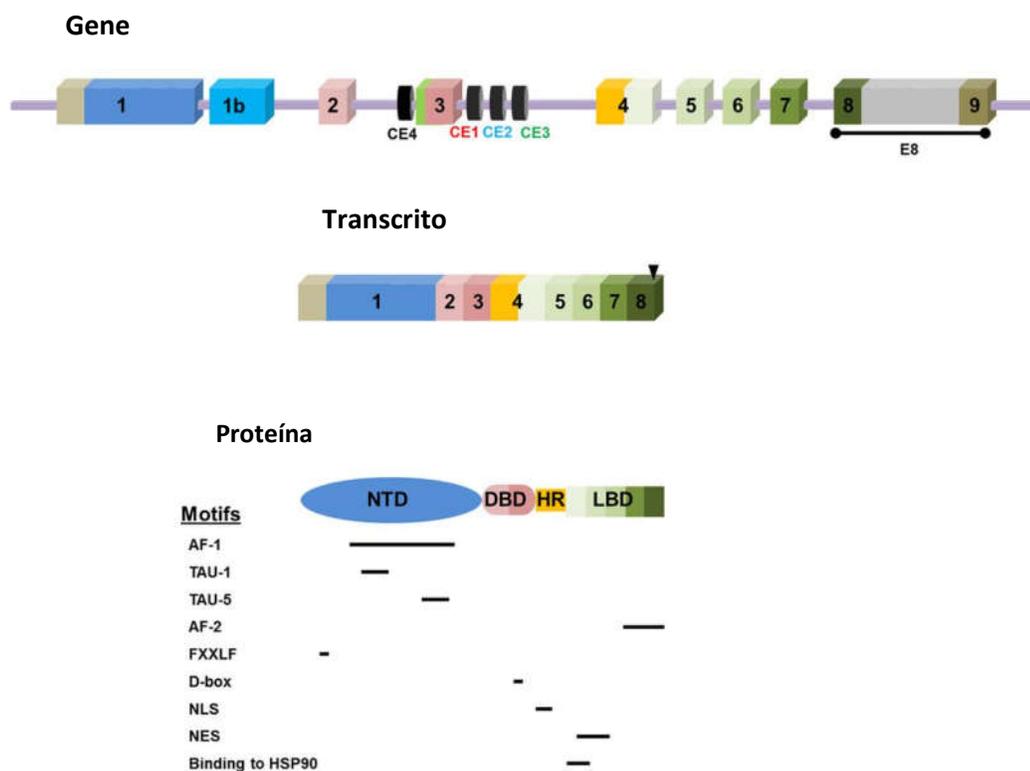


Figura 3: Representação da estrutura do gene do receptor de andrógeno (AR), do transcrito mRNA e da proteína.

O *locus* do gene do receptor de andrógeno está situado em Xq12. A proteína do AR (GenBank nº NP_000035.2) é traduzida a partir do transcrito mRNA com *splicing* canônico (GenBank nº NM_000044.3) e possui quatro domínios principais, bem como motivos funcionais definíveis (consulte o texto para obter mais detalhes). As cores correspondentes foram usadas para os éxons no genoma, bem como no transcrito e as regiões na proteína correspondentes. A posição do códon de parada é indicada por ponta de seta. NTD, domínio N-terminal; AF-1, região com função de ativação independente de ligante; DBD, domínio de ligação ao DNA; HR, região de dobradiça (*hinge region*); LBD, domínio de ligação ao ligante; AF-2, região com ativação dependente de ligante; NLS, sinal de localização nuclear; NES, sinal de exportação para o núcleo. Modificado de Uo, Plymate et al. (2017).

Na ausência do ativador DHT, o receptor de andrógeno está localizado no citoplasma, complexado a chaperonas (HSP90, principalmente). A di-hidrotestosterona (DHT) se liga na região ligante do receptor, LBD, ocorre uma modificação conformacional, liberando as chaperonas associadas, a região NES perde a atividade e ocorre a translocação para o núcleo. Dentro do núcleo, ocorre a homodimerização mediada pela região D-box, formando

a estrutura DBD-DBD que se liga aos trechos de DNA genômico com a sequência de nucleotídeos canônica conhecida como elemento responsivo a andrógeno (ARE). Na presença do ligante DHT o motivo FXXFL do AR interage com a região AF-2. Como pode ser observado pela descrição acima, todos esses domínios estruturais permitem uma regulação estrita do receptor de andrógeno pelo hormônio andrógeno (Uo, Plymate et al. 2017).

Mudanças nesses domínios podem tornar o AR constitutivamente ativo e tornar-se independente do hormônio ligante. Mutações no receptor de andrógeno geram domínios não funcionais ou receptores truncados, que levam à ativação do receptor independente de andrógeno, o que leva ao agravamento do câncer de próstata (Feldman and Feldman 2001, Yuan and Balk 2009, Lamont and Tindall 2011, Uo, Plymate et al. 2017).

A ligação adicional do AR a um conjunto de fatores de transcrição é essencial para o controle da ativação ou inibição da transcrição gênica em células de próstata. O conjunto de fatores de transcrição ativadores é denominado coativadores, enquanto que o conjunto de fatores de transcrição que inibem a transcrição é denominado corepressores, que podem recrutar modificadores de proteínas a fim de inibir ou ativar a transcrição (Heinlein and Chang 2002). Esses conjuntos podem mudar de acordo com o gene alvo ou de acordo com o estágio do ciclo celular (Wang, Li et al. 2009, Cai, He et al. 2011, Wu, Zhang et al. 2011, Jin, Kim et al. 2013, Murthy, Wu et al. 2013, Coutinho, Day et al. 2016, Culig 2016, Zhao, Fong et al. 2016). Com a descoberta dos RNAs longos não codificadores, descritos mais abaixo nesta introdução, os fatores que influenciam a transcrição gênica também passaram a incluí-los (Davidson and Britten 1979, Consortium, Birney et al. 2007, Mercer, Dinger et al. 2009, Consortium 2012, Rinn and Chang 2012, Cheetham, Gruhl et al. 2013, Iyer, Niknafs et al. 2015). Com relação ao AR, já há estudos demonstrando a associação do receptor de

andrógeno aos RNA longos não codificadores *HOTAIR*, *PCGEM*, *PRCNR1* (Yang, Lin et al. 2013, Zhang, Zhao et al. 2015) e nosso grupo mostrou recentemente que o AR se liga a um conjunto de algumas centenas de outros lncRNAs (daSilva, Beckedorff et al. 2018).

As combinações específicas de cofatores associados a AR e recrutados para AREs fornecem um mecanismo para expressão gênica tecido específica e ligante específica. Embora os subconjuntos de cofatores que fundamentam a inibição ou a ativação da transcrição gênica ainda não tenham sido totalmente definidos, pesquisadores já descobriram diversos genes alvos responsivos a andrógeno (Zhao, Yu et al. 2012, Murthy, Wu et al. 2013, McNair, Urbanucci et al. 2017).

Dentre esses genes, destaca-se o antígeno prostático específico (PSA), que gera a principal proteína produzida pela próstata (Riegman, Vlietstra et al. 1991). Sua função é liquefazer o sêmen, promover a motilidade do esperma e dissolver o muco cervical (Balk, Ko et al. 2003). O PSA está presente em baixas concentrações no sangue e o fato de ter a transcrição ativada por AR tornou o PSA um biomarcador do câncer de próstata. Dessa forma, a quantidade de proteína PSA é monitorada clinicamente a partir do sangue, para detectar estágios iniciais da doença, eficácia das intervenções terapêuticas e detectar tumores recorrentes após terapia (Nash and Melezinek 2000, Ryan, Smith et al. 2006). Entretanto, o aumento do nível de concentração do PSA também está correlacionado a irritação e a infecção na próstata, além de hiperplasia prostática benigna (BPH). Adicionalmente, estudos demonstraram que em populações de homens, a faixa de variação do nível de PSA aumenta com a idade. Assim, o exame de PSA exige melhor interpretação com o entendimento da situação clínica do paciente. Atualmente, o nível de PSA ainda é

uma importante ferramenta de monitoramento do desenvolvimento e recorrência do câncer de próstata, apesar de não ser acurado (Pezaro, Woo et al. 2014).

O ciclo celular apresenta mecanismos de controle em todas as etapas do processo, os chamados pontos de verificação. Alguma falha nesse mecanismo pode dar origem a diversas doenças, tais como câncer (Balk and Knudsen 2008). Estudos sobre a correlação entre AR e ciclo celular revelaram a atuação do AR como regulador da progressão do ciclo celular da fase G1 para S. O AR atua na indução de sinais que promovem a atividade de quinase dependente de ciclina G1 (CDK), por meio do aumento da quantidade da proteína ciclina D, via aumento da tradução dependente de mTOR (Xu, Chen et al. 2006, Balk and Knudsen 2008). Como resultado, induz a fosforilação do supressor de tumor de retinoblastoma (RB), inativando-o, o que libera a proteína E2F e assim induz a proliferação andrógeno-dependente (Balk and Knudsen 2008). Portanto, o AR atua como um mitógeno que promove a ruptura da atividade no ponto de verificação G1/S-CDK de controles intracelulares negativos, que impediam a progressão do ciclo celular.

Além da capacidade do AR em estimular a proliferação celular e o crescimento do tumor, o AR também apresenta a capacidade de inibir a apoptose. O silenciamento da transcrição de AR via oligonucleotídeo antisense ou siRNA resultaram na supressão da proliferação celular e na ativação da apoptose em células LNCaP (Eder, Culig et al. 2000, Amirghofran, Monabati et al. 2004, Liao, Tang et al. 2005, Niu, Chang et al. 2010).

Desse modo, o receptor de andrógeno (AR) é um efector crítico no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. A dependência de AR em tumores é explorada em tratamento contra o câncer de próstata, de modo que a primeira intervenção terapêutica é

provocar a perda de função do AR, por meio da redução do ligante, uso de antagonistas ou castração química (Balk and Knudsen 2008, George and Moul 2012). Essa estratégia induz um conjunto de respostas reduzindo a divisão celular ou o aumento da apoptose nas células cancerosas. No entanto, tumores recorrentes e incuráveis acabam por surgir como resultado da função restaurada do AR, originando os tumores independentes de hormônio andrógeno (Feldman and Feldman 2001, Balk 2002, Balk and Knudsen 2008, Espiritu, Liu et al. 2018, Sathianathen, Konety et al. 2018).

Essas observações enfatizam a importância do AR no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. Portanto, é necessário entender os mecanismos pelos quais o AR controla a proliferação celular em células de próstata, de modo a levar a uma maior compreensão de sua contribuição na transcrição gênica, e a caracterizar possíveis novos alvos terapêuticos contra o câncer de próstata.

1.5. RNA longo não codificador (lncRNA)

Os ácidos nucleicos foram inicialmente descobertos por Friedrich Miescher em 1869 (Dahm 2005) e, em 1939, Caspersson e Schultz sugeriram que o ácido ribonucleico estava envolvido na síntese de proteínas (Caspersson and Schultz 1939). Duas décadas depois, Francis Crick e colaboradores postularam que o RNA é um intermediário entre a sequência de DNA do núcleo das células e a proteína codificada, sendo essa última a principal protagonista das funções celulares (Crick, Barnett et al. 1961).

O número de proteínas codificadas pelos genes e a relação entre a complexidade dos organismos e o seu conteúdo celular remonta a um paradoxo na biologia molecular (Taft, Pheasant et al. 2007). A definição de complexidade em biologia é, por si só, uma questão de

debate, contudo, pode-se considerar para tal definição a combinação de número de metabólitos, número de células de diferentes tipos, e o grau de organização celular. De maneira paradoxal, as análises de sequenciamento do genoma demonstraram que há um aumento considerável do número de sequências transcritas não codificadoras de proteínas conforme aumenta a complexidade do organismo (Taft, Pheasant et al. 2007).

Estudos em escala genômica do transcriptoma revelaram que existe um amplo número de RNAs não codificadores de proteínas (ncRNA), tornando aparente que uma porção significativa do transcriptoma tem pouca ou nenhuma capacidade de codificação de proteínas (Davidson and Britten 1979, Consortium, Birney et al. 2007, Mercer, Dinger et al. 2009, Consortium 2012, Rinn and Chang 2012, Cheetham, Gruhl et al. 2013, Iyer, Niknafs et al. 2015). A conclusão é que a maior parte do genoma humano (~75 %) é ativamente transcrita, fenômeno conhecido como transcrição pervasiva (Consortium, Birney et al. 2007, Nakaya, Amaral et al. 2007, Mercer, Dinger et al. 2009, Consortium 2012). O aumento concomitante do conteúdo de RNAs não codificadores de proteínas e da complexidade do organismo dá base à proposição de que as inovações evolutivas e a expansão dos RNAs não codificadores regulatórios foram fundamentais para a programação genética em eucariotos (Mercer, Dinger et al. 2009).

O aumento da sensibilidade de *tiling arrays*, que são microarranjos com sondas que cobrem todo o genoma humano e foram usados para detectar a transcrição nos *loci* dos genes conhecidos e fora deles, proporcionou uma via de entendimento mais detalhada do genoma, revelando que RNAs não codificadores de proteínas estão muito mais presentes nas células do que RNA codificadores, e que a diversidade de transcritos não codificadores fora anteriormente negligenciada (Kapranov, Cheng et al. 2007, Iyer, Niknafs et al. 2015).

Baseado no tamanho do transcrito, esses RNAs podem ser agrupados em duas classes: curtos e longos. RNAs curtos não codificadores (<200 nucleotídeos) incluem siRNA, piRNA e miRNA, enquanto que RNAs não codificadores longos (lncRNAs) (>200 nucleotídeos) representam uma outra classe de RNAs (Mercer, Dinger et al. 2009, Kung, Colognori et al. 2013, Zhang, Chen et al. 2013). RNAs longos não codificadores (lncRNAs) compartilham características semelhantes à de mRNAs, podendo ser transcritos pela RNA polimerase II, poliadenilados e também podem apresentar complexos padrões de *splicing* (Wu, Kim et al. 2008, Ponting, Oliver et al. 2009, Cheetham, Gruhl et al. 2013). Análises de expressão de lncRNAs em múltiplos órgãos mostraram que, geralmente, os lncRNAs apresentam baixos níveis de transcrição e apresentam um padrão de expressão tecido específica comparado a mRNAs codificadores de proteínas (Derrien, Johnson et al. 2012, Washietl, Kellis et al. 2014). Em um primeiro momento, a classificação do transcrito pelo tamanho é arbitrária, no entanto, essa é uma classificação inicial, e à medida que as funções moleculares dos RNAs não codificadores forem desvendadas uma nova classificação pode surgir em substituição à primeira.

Estudos recentes demonstram a surpreendente complexidade do transcriptoma humano. lncRNAs podem estar sobrepostos com, ou intercalados entre, múltiplas regiões codificadoras e não codificadoras do DNA no genoma humano. Além disso, são encontrados na orientação *sense* e *antisense* referente à orientação no genoma do gene codificador da proteína em um mesmo *locus*. Essa complexidade mudou o entendimento de uma organização linear para um modelo modular, em que há a possibilidade de várias sequências serem transcritas em um *locus* gênico e darem origem a uma ampla série de RNAs *sense* e *antisense*, codificadores e não codificadores de proteínas (Mercer, Dinger et al. 2009).

Uma análise baseada na comparação de conservação de múltiplas sequências sugere que as estruturas secundárias associadas a domínios sejam ativamente mantidas ao longo do curso da evolução (Derrien, Johnson et al. 2012). A estrutura secundária do RNA pode restringir a variação da sequência do lncRNA, de modo que, os polimorfismos são depletados em regiões de pareamento Watson-Crick e tendem a ser neutras com a finalidade de manter a estabilidade estrutural (Pegueroles and Gabaldon 2016).

RNAs longos não codificadores despertaram atenção da comunidade científica devido ao vasto papel em vias celulares de regulação e estruturais em importantes processos biológicos, podendo atuar em diversos mecanismos moleculares (Wang, Song et al. 2011, Kung, Colognori et al. 2013, Marchese, Raimondi et al. 2017). LncRNAs estão envolvidos em uma variedade de processos no desenvolvimento normal das células e no aparecimento de doenças, no entanto os mecanismos pelos quais eles agem ainda são pouco conhecidos (Kung, Colognori et al. 2013). Em sua mais recente atualização (Janeiro de 2015), a base de dados lncRNADB (<http://www.lncrnadb.org>) cataloga 156 lncRNAs humanos com uma função putativa, o que representa uma pequena minoria dos milhares de lncRNAs anotados (Ransohoff, Wei et al. 2018). Em amostras de pacientes com câncer de próstata, nosso grupo mostrou em 2004 que os níveis de expressão de um conjunto de RNAs não-codificadores intrônicos antissenso estava correlacionado com o grau de diferenciação do tumor de próstata (Reis, Nakaya et al. 2004). Em células de próstata, há um conjunto relativamente pequeno, mas em constante crescimento, de lncRNAs com caracterização funcional (Mitobe, Takayama et al. 2018, Das, Feng et al. 2019). Estudos recentes revelaram funções importantes de alguns lncRNAs, como: regulador da transcrição gênica, atuação como *enhancer like*, estabilizador de mRNA, organizador de complexos com multiproteínas,

modulador do processo de *splicing*. Essas funções trazem à tona o importante papel do lncRNA na fisiologia celular, atuando no controle do crescimento, divisão e diferenciação celular, e exercendo papel crucial no desenvolvimento de tumor maligno, o que demonstra potencial aplicação em diagnóstico e tratamento contra o câncer (Rinn and Chang 2012, Cheetham, Gruhl et al. 2013, Geisler and Coller 2013, Zhang, Chen et al. 2013). No entanto, ainda há inúmeros mecanismos moleculares a serem detalhados. Esse esforço fornecerá novas compreensões sobre a complexa rede de regulação de genes envolvendo lncRNAs, e a caracterização de seus genes e modos de ação permitirá o seu uso em novas estratégias para diagnóstico, monitoramento da progressão do tumor e na terapia contra câncer (Cheetham, Gruhl et al. 2013, Zhang, Chen et al. 2013, Fang and Fullwood 2016, Balas and Johnson 2018).

Um dos lncRNAs mais estudados serve como exemplo de mediador na modificação da cromatina durante a compensação de dosagem do cromossomo X em mamíferos (Wutz 2011). A compensação de dosagem refere-se ao processo pelo qual o nível de expressão genética dos dois cromossomos X em células de fêmeas é feito para equiparar a expressão de um único cromossomo X em células masculinas. O lncRNA *Xist* é expresso a partir de um dos dois cromossomos X em células de fêmeas e resulta na alteração da estrutura da cromatina desse cromossomo, silenciando a transcrição de genes (Wutz 2011). O lncRNA *Xist* age em *cis*, interagindo com as proteínas do complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2) através do domínio estruturado de *Xist* denominado *Repeat A*, o que resulta no recrutamento do complexo PRC2 para diversos *loci* do cromossomo X e na trimetilação da lisina 27 na histona 3 (H3K27me3) nesses *loci*. Dessa forma, impede o acesso da RNA polimerase ao DNA impedindo a transcrição gênica em uma das cópias do cromossomo X (Zhao, Sun et al. 2008).

LncRNAs também podem agir em *trans*. Com funções moleculares semelhantes, o lncRNA *HOTAIR* interage com PRC2 e modula a trimetilação da lisina 27 na histona 3 em diferentes regiões do genoma, silenciando diversos genes em outros cromossomos, agindo, portanto em *trans* (Rinn, Kertesz et al. 2007, Tsai, Manor et al. 2010).

Yang, Lin et al. (2013) descreveram a associação entre o lincRNA *PRNCR1* com a cauda C-terminal do AR, que por sua vez associa-se a DOT1L, que metila a cauda N-terminal do AR e recruta o lincRNA *PCGEM1* para se ligar a essa região do AR. Zhang, Zhao et al. (2015) identificaram a interação do lncRNA *HOTAIR* com o AR, na região N-terminal (NTD) da proteína receptor de andrógeno (AR), para bloquear a interação da ubiquitina ligase MDM2 ao domínio N-terminal, o que evita a ubiquitinação do AR e a degradação da proteína. Dessa forma, o *HOTAIR* guia a atividade andrógeno-independente em células de câncer de próstata resistentes à castração (CRPC) (Zhang, Zhao et al. 2015).

1.5.1. O lincRNA *PVT1*

O lincRNA *PVT1* é um RNA intergênico longo não codificador localizado no *locus* 8q24 (**Figura 4**). Essa região do cromossomo 8 contém o *locus* de um único gene codificador de proteínas, o proto-oncogene *MYC*, e foi inicialmente descrita como *gene desert*, devido a sua longa extensão (cerca de 1 Mb de cada lado do gene *MYC*) sem nenhum outro gene codificador de proteínas. Posteriormente, com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento em larga escala, verificou-se a existência de um grande número de genes não codificadores de proteínas nessa região (Bawa, Zackaria et al. 2015), e foi documentada a sua interação física com outras regiões do genoma em estudos de conformação da cromatina 4C de associação genômica ampla (GWAS) (Meyer, Maia et al. 2011, Du, Yuan et

al. 2015). Assim, o papel funcional da região 8q24 na transcrição gênica ganhou destaque com a descoberta do envolvimento do *locus* na transcrição gênica em cânceres como de próstata, mama e colorretal (Haiman, Patterson et al. 2007, Ghousaini, Song et al. 2008, Al Olama, Kote-Jarai et al. 2009, Eeles, Olama et al. 2013, Cai, Kim et al. 2016, Cui, You et al. 2016, Lu, Luo et al. 2017, Xiao, Feng et al. 2018).

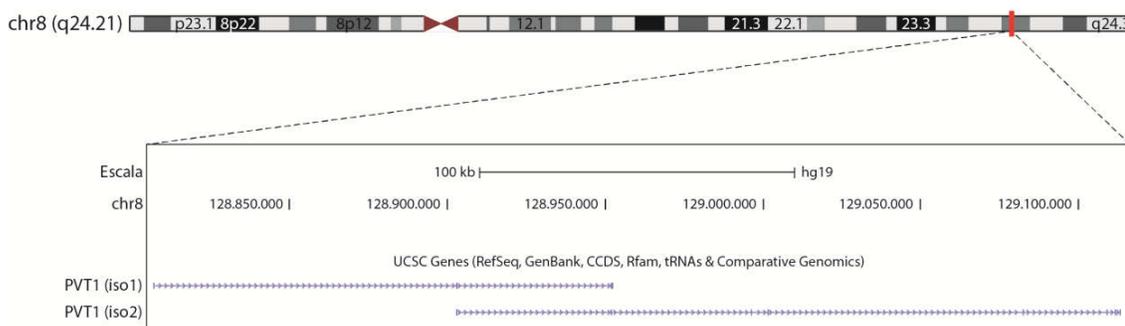


Figura 4: Esquema representativo do *locus* do lincRNA *PVT1* no genoma.

Mapa do cromossomo 8 humano e as duas isoformas do lincRNA *PVT1* utilizadas neste trabalho (*Transcript ID* PVT1:12 e PVT1:23 obtidos de <https://lncipedia.org/> (Volders, Anckaert et al. 2019)).

O lincRNA *PVT1* (*Plasmacytoma Variant Translocation 1*) é um homólogo ao gene de translocação variante de plasmocitoma de camundongo (*Pvt1*). Esse gene foi inicialmente descoberto em camundongos como frequentemente envolvido em uma translocação variante em plasmocitomas (Webb, Adams et al. 1984, Cory, Graham et al. 1985). Em humanos, o lincRNA *PVT1* foi inicialmente identificado como um *locus* coamplificado com *MYC* em linfomas de Burkitt e considerado um ativador de *MYC* (Graham and Adams 1986, Shtivelman and Bishop 1990, Huppi and Siwarski 1994). Estudos subsequentes corroboram a amplificação do número de cópias genômicas de *PVT1* em diversos tipos de câncer em camundongos e humanos, e confirmam a classificação de oncogene do lincRNA *PVT1*

(Villeneuve, Rassart et al. 1986, Guan, Kuo et al. 2007, Haverty, Hon et al. 2009, Barsotti, Beckerman et al. 2012, Chapman, Tidswell et al. 2012, Paci, Colombo et al. 2014, Wang, Yuan et al. 2014), sendo que esta amplificação do número de cópias é um dos fatores responsáveis pelo aumento da expressão de *PVT1* em câncer.

Recentemente foi descrito um complexo mecanismo de regulação da transcrição de *PVT1* (Cho, Xu et al. 2018), que envolve a participação de quatro regiões *enhancers* intragênicas do *locus PVT1*, e a interação destas regiões tanto com o promotor de *PVT1* quanto com o promotor do gene *MYC*, situado a 53 kb acima do *locus* de *PVT1*. Os autores mostraram que em uma situação na qual estas regiões *enhancers* formam um *loop* de DNA genômico com o promotor de *PVT1* e ativam a transcrição desse gene, a transcrição do proto-oncogene *MYC* está diminuída (Cho, Xu et al. 2018). Nesta situação o promotor de *PVT1* atua como uma barreira no DNA, que delimita a ação dos *enhancers* apenas no *locus* de *PVT1*, e a região promotora age como um supressor de tumor por impedir a ativação do proto-oncogene *MYC* (Cho, Xu et al. 2018). A eliminação do promotor de *PVT1* modifica o *loop* de DNA e os *enhancers* passam a ativar a expressão de *MYC* (Cho, Xu et al. 2018). Este é um novo mecanismo de ação de *enhancers*, que pode ter diversas implicações na modulação fina da transcrição do gene *MYC*, e também pode estar presente em outros *loci* genômicos (Marchese and Huarte 2018, Parolia, Cieslik et al. 2018).

LincRNA *PVT1* apresenta a expressão aumentada em diversos tipos de cânceres, incluindo câncer de mama (Guan, Kuo et al. 2007, Zhang, Zhu et al. 2014, Tang, Li et al. 2018) e câncer de ovário (Guan, Kuo et al. 2007), os dois primeiros tipos de câncer nos quais ele foi detectado, junto com linfoma de Burkitt (Graham and Adams 1986, Shtivelman and Bishop 1990), e mais recentemente em diversos outros tipos, tais como carcinoma hepatocelular

(Ding, Yang et al. 2015, Yan, Yang et al. 2015), câncer cervical (Zhang, Zhang et al. 2016, Gao, Zhao et al. 2017), carcinoma de células renais (Wu, Wang et al. 2016), câncer de pulmão (Yang, Zang et al. 2014, Wan, Sun et al. 2016), câncer de tireoide (Zhou, Chen et al. 2016), carcinoma colorretal (Takahashi, Sawada et al. 2014), glioma (Zhang, Yang et al. 2019), câncer de ovário (Liu, Liu et al. 2015, Chen, Du et al. 2018), câncer gástrico (Cao, Wu et al. 2013, Yuan, Li et al. 2016, Zhao, Du et al. 2018), câncer de bexiga (Tian, Cao et al. 2019), leucemia promielocítica aguda (Zeng, Yu et al. 2015) e o câncer de próstata, que é o objeto de nosso estudo (Bawa, Zackaria et al. 2015, Ilboudo, Chouhan et al. 2015, Yang, Li et al. 2017).

Chang e colaboradores (Chang, Cui et al. 2018) reportaram a atividade do lincRNA *PVT1* em câncer metastático de próstata independente de andrógeno (CRPC). Os autores descreveram a superexpressão do lincRNA *PVT1* em CRPC e o efeito esponja exercido pelo lincRNA *PVT1*, que se parecia com e “absorve” o mir186-5p impedindo-o de alvejar o mRNA *TWIST1*, alterando assim o controle pós-transcricional do gene *TWIST1*. A proteína correspondente a esse gene é uma proteína relacionada à via de transição epitelial-mesenquimal (EMT). EMT é o processo que converte células epiteliais em células mesenquimais ativas, que resulta em atividades invasiva e migratória das células. Esse processo já foi descrito em células tumorais. Desse modo, os autores descreveram o efeito do lincRNA *PVT1* sobre a proliferação, invasão e metástase em PCa, modulando EMT (Chang, Cui et al. 2018). Wan e colaboradores (Wan, Wu et al. 2018) também identificaram a redução da proliferação e migração celular em células de câncer de próstata, causada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* que promoveu a redução da fosforilação da proteína p38, que está envolvida na proliferação e migração em células tumorais (Wan, Wu et al. 2018).

O lincRNA *PVT1* já foi detectado como fisicamente associado a proteínas do complexo repressor Polycomb 2 (PRC2) por meio de imunoprecipitação de ribonucleoproteínas, SUZ12 e EZH2, seguido de análise de abundância dos RNAs co-imunoprecipitados usando *microarrays* (RIP-Chip) em células de câncer cervical (HeLa) (Khalil, Guttman et al. 2009). Deve-se notar que o lincRNA *PVT1* não foi mencionado explicitamente no trabalho de Khalil, Guttman et al. (2009), porque os autores optaram por validar por RIP-qPCR apenas cinco lincRNAs (*lincGARS*, *lincDR1*, *lincMLKN1*, *lincSFPQ* e *TUG1*) entre os que foram detectados por RIP-Chip como ligados ao PRC2 em pelo menos duas das três linhagens de células testadas, o câncer cervical (HeLa), os fibroblastos de pulmão (hLF) e os fibroblastos de pé (hFF), sendo que o lincRNA *PVT1* foi detectado como ligado ao PRC2 apenas em células HeLa. Os autores observaram que 24 % dos lincRNAs (114 de 469) expressos em pelo menos 1 dos 3 tipos celulares foram detectados como fisicamente associados com PRC2 (Khalil, Guttman et al. 2009).

O “core” do complexo repressor Polycomb 2 (PRC2) contém quatro proteínas, dentre as quais a EZH2, a enzima metiltransferase que catalisa a tri-metilação na lisina 27 da histona 3 (H3K27), gerando a forma H3K27me3 que contribuiu para a compactação da cromatina, o que impede o acesso de fatores de transcrição e, conseqüentemente, reprime a transcrição gênica (Margueron and Reinberg 2011). Dessa forma, PRC2 é capaz de regular a expressão gênica através do modelamento da estrutura da cromatina (Margueron and Reinberg 2011).

O AR foi inicialmente reportado como um fator de ativação transcricional, que induz a expressão de um conjunto de genes específicos na próstata. No entanto, o AR apresenta a capacidade de inibir a expressão de outro conjunto de genes, em paralelo à sua capacidade em ativar (Zhao, Yu et al. 2012). Essa capacidade de inibir a transcrição de certos conjuntos

de genes em células LNCaP está relacionada a elementos responsivos a andrógeno (ARE) e à cooperação com a EZH2, uma proteína do complexo repressor Polycomb 2 (PRC2) (Zhao, Yu et al. 2012). Em análise de imunoprecipitação de cromatina seguida de sequenciamento em larga-escala do DNA co-imunoprecipitado (ChIP-seq), foi mostrado que o receptor de andrógeno (AR) e a marca de histona H3K27me3 compartilharam menos de 2 % dos sítios de ligação ao DNA em células LNCaP (células de câncer de próstata dependente de andrógeno) e 13 % em células VCaP (células de câncer de próstata independente de andrógeno), o que pode indicar que a mudança do programa de compactação da cromatina é um dos efeitos da progressão do câncer de próstata (Yu, Yu et al. 2010).

Dados recentes de nosso grupo, de imunoprecipitação de ribonucleoproteínas seguido de sequenciamento em larga escala dos RNAs co-imunoprecipitados (RIP-seq) usando anticorpo anti-AR, revelaram a existência de 619 lincRNAs fisicamente associados ao AR em células LNCaP, e dentre esses lincRNAs está o lincRNA *PVT1* (daSilva, Beckedorff et al. 2018).

Como pode ser observado, o lincRNA *PVT1* é objeto de estudo em diversos tipos de cânceres, inclusive câncer de próstata, e apresenta diversas funções a depender da célula e do estágio tumoral. Contudo, ainda é necessário explorar mais essas funções a fim de elucidar o papel do lincRNA *PVT1* no desenvolvimento e progressão do câncer de próstata, principalmente à luz de nossos dados recentes de que este lincRNA está associado ao receptor de andrógeno.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Caracterizar o possível papel do lincRNA *PVT1* associado ao receptor de andrógeno (AR) na inibição da transcrição gênica em células de câncer de próstata LNCaP (**Figura 5**).

2.2. Objetivos específicos

- Confirmar a interação física entre o lincRNA *PVT1*, o receptor de andrógeno (AR) e as proteínas do complexo Polycomb EZH2 e SUZ12 em células de câncer de próstata LNCaP;
- Identificar em células LNCaP em cultura quais são os genes com expressão inibida por andrógeno e que apresentam expressão parcialmente ou totalmente restaurada após o silenciamento do lincRNA *PVT1*;
- Correlacionar o *locus* genômico de um gene identificado acima com marcas epigenéticas e presença de AR e EZH2 por CHIP-qPCR.

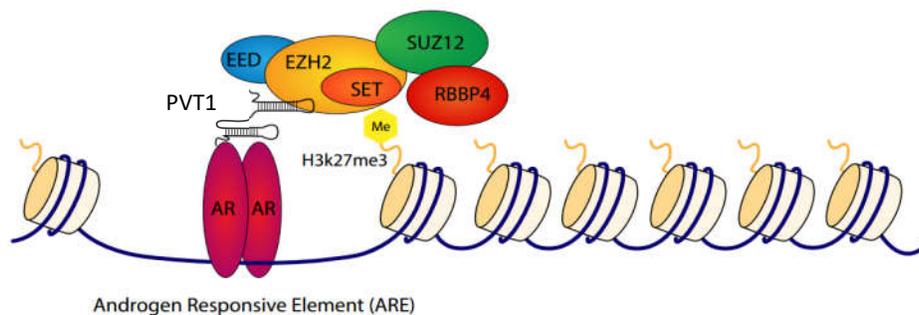


Figura 5: Hipótese sugerida neste projeto.

O lincRNA *PVT1* como membro do complexo AR-EZH2-*PVT1*, e participando do mecanismo de inibição da transcrição gênica induzida por andrógeno. A figura mostra o receptor de andrógeno (AR) e o complexo repressor da transcrição PRC2, o qual se sabe pelos dados da literatura que interagem (ver Introdução), e acrescenta o lincRNA *PVT1* que poderia ser necessário para a ligação do complexo PRC2 ao AR. O recrutamento do PRC2 para certas regiões do genoma, onde o AR-*PVT1* estaria ligado, promoveria a tri-metilação da histona H3 lisina 27 (H3K27me3), que causaria a compactação da cromatina e a inibição da transcrição do gene daquele *locus*, promovida pelo andrógeno. AR = dímero do receptor de andrógeno ligado ao hormônio e interagindo com o DNA genômico em uma região que contém a sequência conservada denominada "Elemento Responsivo ao Andrógeno" (ARE); as quatro proteínas que compõem o "core" do complexo repressor Polycomb 2 (PRC2) estão mostradas (EED, SUZ12, RBBP4 e EZH2), sendo que para essa última o domínio SET está indicado.

3. Material e Métodos

3.1. Linhagem celular e condições de cultivo

Para a realização deste trabalho, foi utilizada a linhagem celular humana de carcinoma de próstata (LNCaP) adquirida originalmente da ATCC (*American Type Culture Collection*) e cultivada à 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂ em meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco), suplementado com Soro Fetal Bovino normal (RPMI-SFB-N) (Vitrocell) 10 %, 4,5 g/L de glicose, 1,5 g/L de hidrogenocarbonato de sódio, 2,4 g/L de HEPES, 1 % de piruvato de sódio e com antibiótico penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL). A amostra de LNCaP que usamos crescia nestas condições com um tempo de dobramento celular de aproximadamente 36 h. Para a manutenção das células em cultura, ao atingirem aproximadamente 80 % da densidade de saturação as células foram lavadas com solução salina PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2). As células foram coletadas com solução de tripsina 0,1 % (Cultilab) e transferidas para o recipiente seguinte com meio RPMI. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo com 10 % de DMSO (dimetilsulfóxido) (Sigma) e armazenadas em freezer a -80 °C ou no nitrogênio líquido a -196 °C.

3.2. Extração de RNA, purificação e tratamento com DNase

Para o experimento de RIP-RT qPCR (item 3.7) foi adicionado ao imunoprecipitado TRIzol reagent (ThermoFisher). Em seguida, o RNA foi submetido a uma etapa de purificação e tratamento com DNase I utilizando RNeasy Micro kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA purificado foi armazenado a -80 °C.

Para os experimentos de silenciamento do lincRNA *PVT1* (item Silenciamento gênico com oligonucleotídeo antisense - ASO3.8) e estudo da dependência de dose do hormônio (item 3.13) as células foram coletadas após o tratamento diretamente com TRIzol reagent (ThermoFisher). Em seguida, o RNA foi submetido a uma etapa de purificação e tratamento com DNase I utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA purificado foi armazenado a -80 °C.

3.3. Quantificação e avaliação da qualidade do RNA

As amostras foram quantificadas por sua densidade óptica a 260 nm, e sua pureza atestada pela razão 260/280 nm. As medidas foram realizadas no espectrofotômetro NanoDROP (ThermoFisher).

O RNA foi analisado quanto à sua integridade utilizando-se o equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies), que realiza uma eletroforese capilar de alta tensão. A integridade das amostras foi avaliada com o programa 2100 Expert (Agilent Technologies). Este programa atribui um valor de integridade de RNA (RNA Integrity Number, RIN), que permite uma estimativa da integridade por meio da análise das intensidades relativas das bandas dos RNAs ribossômicos 18S e 28S. Apenas amostras que tinham uma boa integridade (RIN > 8) foram utilizadas em todos os experimentos.

3.4. Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*Primers*)

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nos ensaios de PCR e PCR quantitativo foram desenhados com o uso do programa Primer3 (versão 4.1.0) (Koressaar and Remm 2007, Untergasser, Cutcutache et al. 2012) e estão descritos na **Tabela 1**.

Para o LincRNA *PVT1*, os iniciadores anelam em 2 éxons diferentes, os exons 2 e 3 da isoforma 1, que se sobrepõem aos éxons 1 e 2 da isoforma 2, como demonstrado na **Figura 4** (Transcript ID PVT1:12 e PVT1:23 obtido de <https://Incipedia.org/> (Volders, Anckaert et al. 2019)). Dessa forma, o PCR amplifica e mede simultaneamente as duas isoformas de *PVT1*. Para os demais transcritos, os iniciadores foram coletados a partir de artigos de referência ou desenhados pelo próprio autor.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para reação de qPCR.

Alvo	Nome dos oligonucleotídeos iniciadores	Sequência 5' - 3'
RT-qPCR		
ACTB	actb_forward	CTTCCTCCTGGGCATGG
	actb_reverse	AGACAGCACTGTGTTGGCGTA
AJUBA	ajuba_forward	GGACCGGGATTATCACTTTGAG
	ajuba_reverse	CAACCATGGCAGAGCAAGTG
AR	ar_iso1_forward	TCAAGGGAGGTTACACCAAAGG
	ar_iso1_reverse	GAGACAGGGTAGACGGCAGTTC
	ar_iso2_forward	GCACCTTATGTCCTCCCTTCAG
	ar_iso2_reverse	CTGTGAACATGCCCAAAGAAG
BMF	bmf_forward	TACTCAAGCGGGACCTTCTTTC
	bmf_reverse	TCACCATCACAGACACATCAGC
DRAIC	draic_forward	TGAACTCAACTCCTGAGAAGGAC
	draic_reverse	CGCTCTCAGACTCTTCAGTTCTCC
EZH2	ezh2_forward	AGTGATAGGGAAGCAGGGACTG
	ezh2_reverse	GGAGTTCAATATTTGGCTTCATC
FAS	fas_forward	AAGGCTTTGTTCGAAAGAATGG
	fas_reverse	GATGCCAATTACGAAGCAGTTG
FASN	fasn_forward	AGGATCACAGGGACAACCTG
	fasn_reverse	ACTCCACAGGTGGGAACAAG
GAPDH	gapdh_forward	CTCTCTGCTCCTCTGTTCGA
	gapdh_reverse	ACGACCAAATCCGTTGACTCC
HOTAIR	hotair_forward	GGTAGAAAAAGCAACCACGAAGC
	hotair_reverse	ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTGCC
HRK	hrk_forward	GCACTTCGAGAAGGAAGTGGAG
	hrk_reverse	TCTGTTTCTGCAGCTGGATTC
IFIT2	ifit2_forward	CGGTTAAAGTGTGGAGGAAACC
	ifit2_reverse	CAGTTGTCCAGACGGTAGCTTG
MALAT1	malat1_forward	TGGGGGAGTTTCGTA CTGAGG
	malat1_reverse	TCTCCAGGACTTGGCAGTCTG
NDRG1	ndrg1_forward	ACCTGCTACAACCCCTCTT
	ndrg1_reverse	TGATCCATGGAGGGGTACAT
NOV	nov_forward	GAACCGTCAATGTGAGATGCTG
	nov_reverse	GTTCTTGAAGTGCAGGTGGATG
OPRK1	oprk1_forward	ATCAATATCTGCATCTGGCTGCT
	oprk1_reverse	TAGTCATCATCTGGAACTGCAA
PCGEM	pcgem_forward	ATCATGAGGCATTTTCAGAGTGC

	pcgem_reverse	AAGGCACCTTTGTTTTCTCCAG
PRCN1	prcn1_forward	TGGAAAGGTGTCAGTGAGCAAG
	prcn1_reverse	AATATCAGCCCTTGAATCTGG
PSA	psa_forward	GATGCTGTGAAGGTCATGGA
	psa_reverse	TGGAGGTCCACACTGAAG
PVT1	pvt1_forward	TGGAATGTAAGACCCCGACTCT
	pvt1_reverse	GATGGCTGTATGTGCCAAGGT
SFPQ1	sfpq1_iso1_forward	TCGTA CTGTTAGGCCCTTGG
	sfpq1_iso1_reverse	AACCTTGCATGAAGAGACC
	sfpq1_iso2_forward	AAAACCTTGCCAGAAGATCCA
	sfpq1_iso2_reverse	CCCTTTGCTGTTTTCCATTC
SI	si_forward	TTTTGGCAGCCTTATCCAAG
	si_reverse	CAATCAGAGAGATTTCCAATCCA
SUZ12	suz12_forward	TGACTCGTCCAGGAAGAAGAGAG
	suz12_reverse	CAAATGTCTTTTCCCCATCCTC
TMPRSS2	tmprss2_forward	CTGGTGGCTGATAGGGGAT
	tmprss2_reverse	GTCTGCCCTCATTTGTCTGAT
TNFRSF21	tnfrsf21_forward	TTCCTCTTGGCCTTGCTCTTAG
	tnfrsf21_reverse	TGTCATCAAAGATAGGCTGCAAG
U1	u1_forward	CCCCACTACCACAAATTATGCAG
	u1_reverse	AAACGAAGGTGGTTTTTCTCAGG
ChIP-qPCR		
KIAA0066	kiaa0066_forward	CTAGGAGGGTGGAGGTAGGG
	kiaa0066_reverse	GCCCCAACAGGAGTAATGA
NOV	nov_enhancer_forward	ATGCACGTGCGTGTAACAG
	nov_enhancer_reverse	CACAAGGTTTCTGGGTAGGG
	nov_promotor_forward	GCTGAGTGGTTTCTCCTTGTCT
	nov_promotor_reverse	ACACCAGACAGCATGAGCAG
PSA	psa_enhancer_forward	GCCTGGATCTGAGAGAGATATCATC
	psa_enhancer_reverse	ACACCTTTTTTTTTCTGGATTGTTG
	psa_promotor_forward	CCTAGATGAAGTCTCCATGAGCTACA
	psa_promotor_reverse	GGGAGGGAGAGCTAGCACTTG

3.5. Transcrição reversa e síntese de cDNA

No experimento de imunoprecipitação de ribonucleoproteínas (RIP) seguido de RT-qPCR, para a transcrição reversa (RT) e síntese de cDNA fita simples foi utilizado 10 µL de amostra de RNA extraído do imunoprecipitado. Nos demais experimentos, para a transcrição reversa e síntese de cDNA fita simples foi utilizado 1 µg de RNA total de cada condição experimental. Cada amostra foi transcrita com o kit SuperScript IV First Strand Synthesis Mix (Invitrogen), utilizando oligonucleotídeos iniciadores oligo-dT(20) ou hexâmeros randômicos, segundo as recomendações do fabricante.

3.6. PCR quantitativa em tempo real

As reações da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foram feitas em triplicata técnica e em volume total de 10 μ L para cada réplica contendo: 5 μ L de SYBR Green I Master Mix (Roche), 2,5 μ L de cDNA da transcrição reversa (diluído 1:5 a 1:7) e 2,5 μ L de oligonucleotídeos iniciadores *Forward* e *Reverse* (2,0 μ M) específicos para cada gene (item 3.4). A reação foi realizada no equipamento LightCycler 480 II (Roche). Os parâmetros da reação foram: pré-incubação 95 °C durante 10 min, amplificação 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 10 segundos, 72 °C durante 8 a 10 segundos por 40 ciclos, *melting curve* 95 °C durante 5 segundos, 65 °C durante 1 min, seguido do aumento da temperatura até 97 °C (Ramp rate °C/s de 0,11 segundos) com aquisição contínua da fluorescência.

O ciclo da PCR no qual a intensidade de fluorescência do SYBR Green, incorporado à dupla fita de DNA amplificado, é detectada determina o Ct do gene (C– ciclo referência). Esse Ct é uma medida relativa da quantidade inicial de moléculas de transcrito. Para tornar as medidas de expressão comparáveis entre as amostras usa-se como referência o Ct de um ou mais genes constitutivos ou que não tenha sua expressão alterada nas diferentes condições de estudo.

Nos experimentos de silenciamento do lincRNA *PVT1* (item 3.8), de dependência de dose de hormônio (item 3.13) e de validação de genes que tiveram a sua expressão afetada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* foi utilizada a média geométrica do Ct dos genes constitutivos *GAPDH* e *ACTB*. Nos experimentos de RIP (item 3.7) e ChIP (item 3.14) foi utilizada a medida da quantidade inicial (*input*) do alvo presente na amostra como normalizador.

Calcula-se o delta-Ct (ΔCt) pela diferença entre a média das triplicatas (réplicas técnicas) do Ct do gene em análise e o Ct médio do normalizador. A partir dos valores de ΔCt calcula-se o valor de delta-delta-Ct ($\Delta\Delta Ct$) que consiste na subtração do ΔCt obtido nas diferentes condições testadas (tratado e controle). A diferença de expressão relativa do gene em estudo, *fold change*, é calculada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A significância estatística da diferença de expressão dos transcritos testados por qPCR entre condições distintas (tratado e controle) foi medida utilizando o teste-t de Student, considerando-se como limiar de significância o p-valor < 0,05. Neste teste, foram considerados os valores médios de ΔCt de cada condição, referentes à pelo menos 3 réplicas.

3.7. Imunoprecipitação de complexos ribonucleoproteicos – RIP seguido de RT-qPCR

As células LNCaP foram cultivadas em frascos de cultura celular (Sarstedt) com superfície de crescimento de 175 cm². Quando a confluência atingiu aproximadamente 50 %, o meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino normal (Vitrocell) (RPMI-SFB-N) foi trocado duas vezes pelo meio de cultura RPMI suplementado com soro fetal bovino adsorvido com carvão ativado (Charcoal Stripped, Sigma) (RPMI-SFB-CA), uma troca a cada 24 horas, totalizando 48 horas de esgotamento de hormônios e demais moléculas apolares (que são removidas do soro pelo tratamento com carvão). Após essas 48 horas, o meio foi trocado novamente e foi adicionado 10 nM de R1881 (composto análogo ao andrógeno, Metiltrienolona, **Figura 2**), criando a condição “suplementado com andrógeno”, e em um controle paralelo o volume correspondente de etanol absoluto (utilizado para solubilizar o composto R1881) foi adicionado em uma cultura similar, criando a condição “desprovida de andrógeno”. A quantidade final de células foi estimada por

extrapolação com câmara de Neubauer a partir de frascos de cultivo paralelos a cada réplica. A quantidade de células utilizada foi de aproximadamente 2×10^7 para cada anticorpo.

Após 24 horas, os meios de cultura foram retirados e as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado. Por fim, foram adicionados aos frascos 10 mL de PBS gelado, as células foram coletadas com rodinho (*cell scraper*) e foram centrifugadas a 1500 rpm, por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram ressuspensas em igual volume de tampão de lise para RIP contendo inibidores de protease e de RNase, conforme instruções descritas no kit Magna RIP (Millipore). As etapas seguintes foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

Os anticorpos da Merck-Millipore utilizados foram anti-SUZ12 (03-179), anti-EZH2 (17-662), IgG de camundongo não imunizado (12-371), anti-AR (06-680) e IgG de coelho não imunizado (PP64B). Os RNAs co-immunoprecipitados foram extraídos com TRIzol (Invitrogen) seguido de purificação com MicroKit RNeasy kit (Qiagen, item 3.2). O RNA foi eluído em 25 µL de água DEPC e armazenado a -80 °C.

3.8. Silenciamento gênico com oligonucleotídeo antisense - ASO

O silenciamento do lincRNA *PVT1* foi feito com o uso de *Antisense LNA Gapmer* (Exiqon-Qiagen), que são oligonucleotídeos 16-mer de DNA fita-simples antisense (ASOs) com modificação nas suas extremidades 3' e 5' com *locked nucleic acids* (LNA) (Stein, Hansen et al. 2010), o que aumenta sua estabilidade e especificidade para o alvo de RNA contra o qual ele é desenhado; além dos LNAs, os *gapmers* possuem todas as ligações entre nucleotídeos do *backbone* modificadas para fosforotioato, que aumenta a resistência à degradação enzimática. O *gapmer* se hibridiza com seu RNA alvo, forma uma fita duplex

híbrida DNA:RNA que é reconhecida pela RNase H da célula, criando uma clivagem endonucleolítica na fita de RNA; os dois fragmentos de RNA gerados são degradados por exonucleases. O *Antisense LNA Gapmer* liberado pode então continuar guiando a degradação de outras cópias da fita de RNA alvo. A degradação produzida pela RNase H do RNA alvo complementar ao *gapmer* é independente da ação do complexo RISC, e por ser induzida por DNA fita-simples permite o silenciamento fita-específico, sem produzir atividade *off-target* causada pela ação do complexo RISC, o mecanismo de silenciamento induzido por RNA dupla-fita.

Para o silenciamento do lincRNA *PVT1*, as células LNCaP foram cultivadas em placas de 60 mm até atingirem a confluência de aproximadamente 50 %. O meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino normal (RPMI-SFB-N) foi trocado duas vezes pelo meio de cultura RPMI suplementado com soro fetal bovino adsorvido com carvão ativado (RPMI-SFB-CA), uma a cada 24 horas, totalizando 48 horas de escassez de hormônio. Em seguida, o meio foi substituído novamente por 5 mL de RPMI-SFB-CA, e foram adicionados *gapmers* complexados com lipofectamina 3000 (30,0 µL de lipofectamina para 300 pmol de *gapmer* randomizado (com sequência aleatória, Exiqon-Qiagen) do controle negativo, ou 300 pmol de *gapmer* contra *MALAT1* (controle positivo da transfecção e silenciamento, sugerido pela Exiqon-Qiagen), ou 300 pmol de um combinado dos *gapmers* *PVT1_2* e *PVT1_5* (150 pmol de cada) desenhados contra o lincRNA *PVT1* (**Tabela 2**). Após 24 horas, foi adicionado 1,0 nM de R1881 ao meio na placa (+R1881), ou no controle sem hormônio (– R1881) o volume correspondente de etanol, não havendo troca de meio de cultura. Após mais 24 horas, as células foram coletas com TRizol para extração de RNA (item 3.2). O tempo total de silenciamento foi de 48 horas, enquanto que o de estímulo com

R1881 foi de 24 horas. Foi adotada a tática de reduzir previamente o nível do lincRNA *PVT1* antes do estímulo com R1881 para minimizar o viés da ação conjunta de um possível lincRNA *PVT1* remanescente com AR ligado ao andrógeno.

Tabela 2: Gappers (Exiqon/Qiagen) utilizados nos ensaios de silenciamento do lincRNA *PVT1*.

Nome do Gapper (16mer LNA-modified ASO)	Nº do catálogo	Sequência [#]
Randomizado (controle negativo A)	LG00000002	
MALAT1 (controle positivo)	LG00000003	
lincRNA <i>PVT1_2</i>	339511 LG00177218-DDA	+A*+G*+T*G*T*C*C*T*G*G*C*A*G*+T*+A*+A
lincRNA <i>PVT1_5</i>	339511 LG00177207-DDA	+A*+T*+C*G*T*A*A*T*G*G*G*T*T*+G*+A*+A

O asterisco indica uma ligação fosforotioato no *backbone* do oligonucleotídeo, e o sinal “+” indica um *locked nucleic acid* (LNA) em lugar do nucleotídeo comum.

3.9. Análise da expressão gênica em larga-escala em LNCaP sob silenciamento do lincRNA

PVT1

Para medir a expressão gênica em larga-escala foi utilizado o microarranjo humano da Agilent SurePrint G3 Human gene Expression v3 (8 x 60k, G4851C). Quatro réplicas biológicas de cada condição foram obtidas. O RNA total (200 ng) extraído de cada réplica biológica, proveniente de culturas de células LNCaP processadas como descrito no item 3.8, foi convertido a cRNA com os fluoróforos Cy3 ou Cy5 por meio do *Low Input Quick Amp Labeling Two Color kit* (Agilent). Desse modo, foram geradas duas réplicas técnicas com inversão dos fluoróforos Cy3 e Cy5 para cada condição estudada. A hibridização foi realizada de acordo com as instruções da Agilent para microarranjo *two-color* com *dye-swap* para réplicas técnicas. A **figura 6** demonstra as etapas acima descritas. As lâminas foram escaneadas no *SureScan Microarray Scanner* (Agilent) com resolução de 2 µm. O *software Feature Extraction* (Agilent) foi utilizado para calcular a intensidade de cada *spot* nas imagens de cada microarranjo escaneado. As sondas para os genes presentes no

microarranjo estão anotadas com as coordenadas da versão hg 19 do genoma humano, que pode ser visualizado no UCSC Genome Browser (Kuhn, Karolchik et al. 2009).

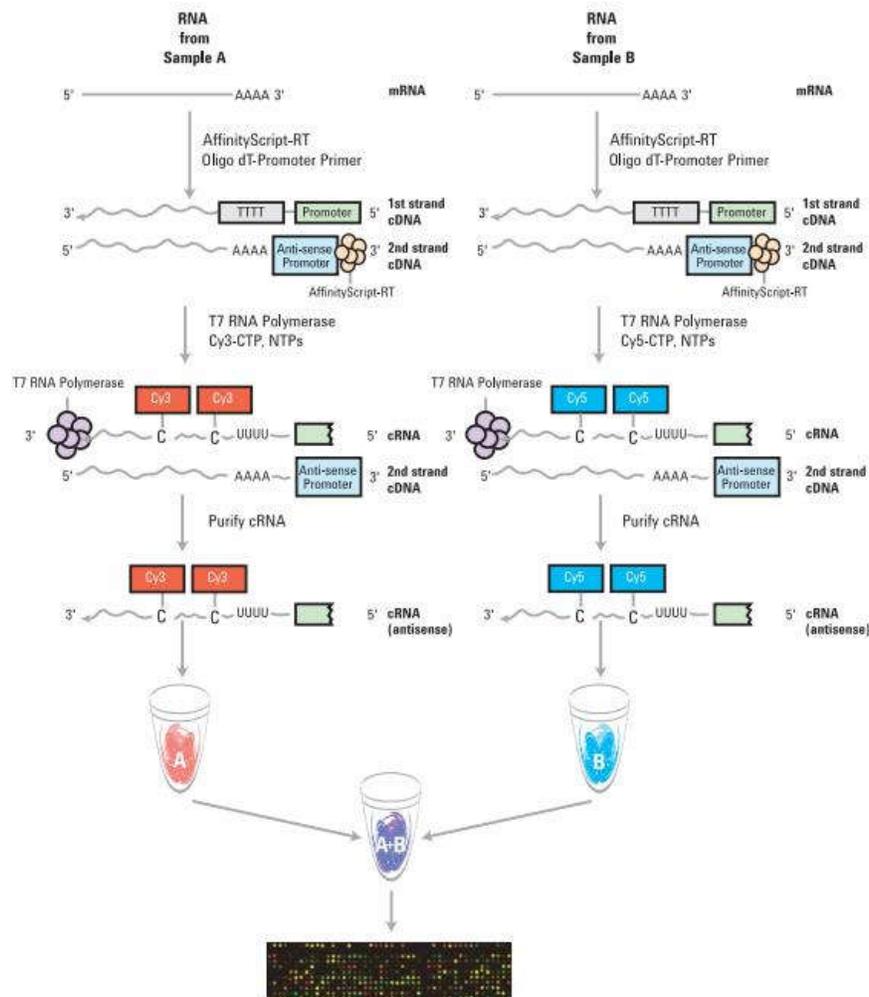


Figura 6: Método de amplificação de cRNA e marcação com fluoróforos Cy3 e Cy5 para microarranjo com duas cores.

Reproduzido do protocolo *Two-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis*, página 18, figura 2, Agilent.

A análise dos genes diferencialmente expressos foi realizada pelo parceiro do projeto Felipe Cesar Beckedorff (Universidade de Miami, Miami, EUA), conforme descrito em detalhes a seguir.

Foi utilizada a *flag ISPosAndSignif* para realizar a filtragem inicial das sondas com sinal de baixa intensidade, de acordo com os critérios do *software Feature Extraction (FE, Agilent)*. Essa *flag* assinala os *spots* dos genes expressos, ou seja, que estão com intensidade significativamente acima do sinal de *background* do *array*, por meio de um teste t (usando todos os *pixels* da imagem de cada *spot*). Aplicamos um filtro para excluir todos os genes que não foram detectados como expressos (ou seja, cujo sinal do *spot* no microarranjo estava abaixo do corte do filtro) nas quatro réplicas de pelo menos uma das duas condições experimentais comparadas. Além disso, foram excluídos os *spots* dos diversos controles positivos e negativos da lâmina.

Com o objetivo de tornar os *arrays* comparáveis entre si e de reduzir vieses experimentais, os valores de intensidade de cada transcrito do *array* foram normalizados para uma mesma escala, pelo método de quantil (Bolstad, Irizarry et al. 2003). Nesse método, os valores de intensidade de cada transcrito são plotados em uma tabela de forma que cada linha represente um transcrito e cada coluna represente um microarranjo diferente (um experimento). Então, para cada microarranjo os valores de intensidade de cada transcrito são ordenados de forma crescente, criando um ranking. Em seguida, é calculada a média de cada linha entre todos os microarranjos, não importando o transcrito, e os valores originais de cada célula de uma mesma linha em todas as colunas são substituídos pela média daquela linha. Por fim, cada coluna da tabela é reordenada pelo nome do transcrito (voltando para a ordem original), de tal modo que cada linha volte a representar o mesmo transcrito em todas as colunas (**Figura 7**). Dessa forma, é mais relevante a posição relativa da intensidade do transcrito no ranking do que a sua intensidade

absoluta. Com esse critério, podem-se comparar diferentes experimentos com faixas de intensidade do sinal diferentes entre os diversos *arrays*.

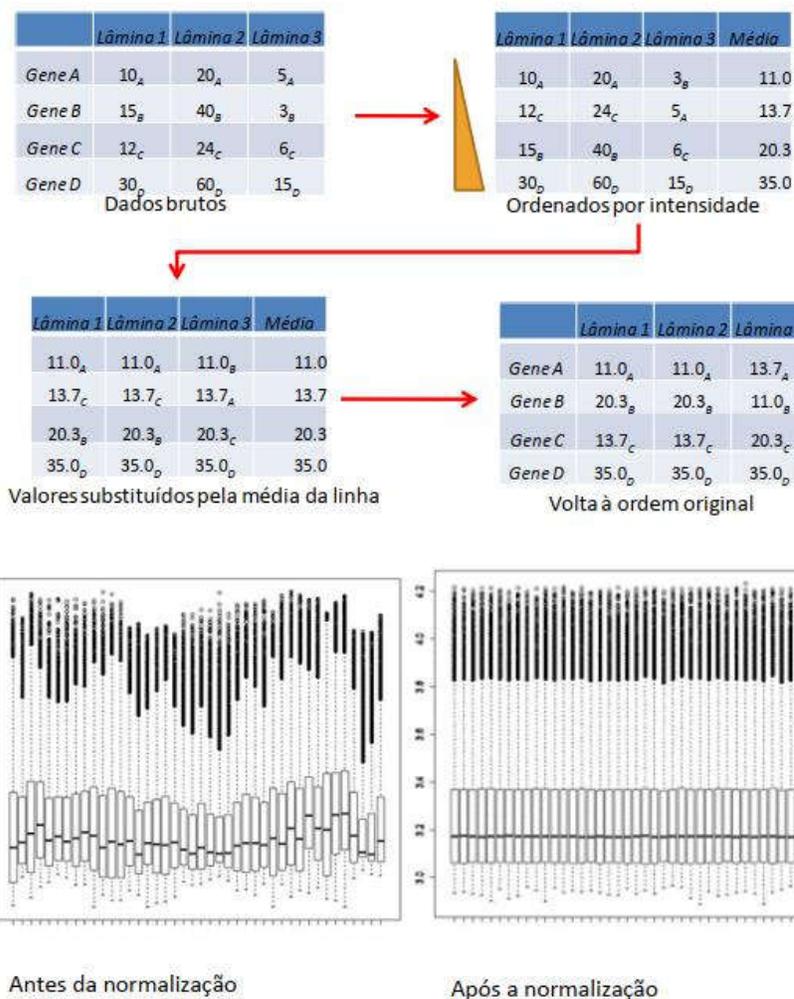


Figura 7: Normalização por quantil.

A. Diagrama mostrando como é realizada a normalização: os valores brutos de intensidade de cada amostra são ordenados independentemente. Em seguida, é calculado o valor médio para cada posição do ranking. Esse valor substitui o valor para uma determinada posição no ranking, para todas as amostras. **B.** Distribuição logarítmica das médias geométricas dos valores de cada spot (*Feature Extraction Processes Signal*) antes e após a normalização por quantil. O gráfico mostra um *boxplot* dos valores de intensidade antes e após a normalização por quantil. A caixa em cada coluna delimita o primeiro e o terceiro quantil do conjunto de valores de cada amostra. A linha tracejada indica a distribuição de 98 percentil do conjunto de valores. Valores acima ou abaixo de três vezes a distância interquartílica, são marcados com pontos. Reproduzido de Moreira (2010).

Em seguida foi calculada a razão \log_2 entre as intensidades de cada transcrito em cada *array* das seguintes amostras (onde KD *PVT1* significa knockdown ou silenciamento do lincRNA *PVT1* usando *gapmers* contra lincRNA *PVT1*, e randomizado significa o controle negativo, usando *gapmer* com sequência aleatória):

- **-R1881**, *Gapmer* randomizado/**+R1881**, *Gapmer* randomizado, para medir o efeito do hormônio R1881 sobre a expressão dos genes;
- **-R1881**, *Gapmer* randomizado/**-R1881**, *Gapmer PVT1*, para medir o efeito da diminuição de *PVT1* sobre a expressão dos genes na ausência de andrógeno;
- **+R1881**, *Gapmer* randomizado/**+R1881**, *GapmerPVT1*, para medir o efeito da diminuição de *PVT1* sobre a expressão dos genes na presença de andrógeno.

A partir destes dados foi possível usar o teste estatístico *Significance Analysis of Microarray (SAM)* (Tusher, Tibshirani et al. 2001) para comparar as quatro réplicas de cada condição experimental e identificar os genes significativamente diferencialmente expressos, que definimos como aqueles com q-valor $\leq 0,01$ (ou seja, com uma *False Discovery Rate* FDR $\leq 1\%$). A *False Discovery Rate* é definida como a proporção esperada de falsos positivos entre todos os genes considerados significativos (Benjamini and Hochberg 1995), e o q-valor é uma correção do p-valor aplicada quando se faz múltiplos testes de significância simultâneos, como no caso dos milhares de genes em um microarranjo. O teste estatístico SAM foi aplicado usando-se todo o conjunto de genes expressos detectados no microarranjo, para não diminuir o q-valor calculado e não causar uma super-estimativa do número de genes significativamente diferencialmente expressos, o que pode ocorrer se o filtro de *fold change* for aplicado e os genes com *fold change* abaixo do limite de corte forem eliminados **antes** do teste estatístico (Larsson, Wahlestedt et al. 2005). Em seguida foi

aplicado o filtro de *fold change* e foram considerados como significativamente diferencialmente expressos os genes com $q\text{-valor} \leq 0,01$ e *fold change*: $fc < 2^{-1}$ e $fc > 2^{+1}$. Para os genes que estavam representados no microarranjo com múltiplas sondas ao longo do gene foi usada a média de intensidade entre todas as sondas que correspondem ao transcrito e que apresentaram mudança significativa ($q\text{-valor} \leq 0,01$ e *fold change*: $fc < 2^{-1}$ e $fc > 2^{+1}$) para representar a intensidade da expressão do gene.

3.10. Cluster hierárquico

Para visualizar os dados em relação à média de expressão do transcrito, apenas os dados dos genes significativamente diferencialmente expressos com $q\text{-valor} \leq 0,01$ e com mudança de expressão (*fold-change*, *fc*) dentro da faixa $fc < 2^{-1}$ e $fc > 2^{+1}$ foram submetidos a agrupamento hierárquico não supervisionado. As comparações das amostras foram:

- **-R1881**, *Gapmer* randomizado x **+R1881**, *Gapmer* randomizado;
- **+R1881**, *Gapmer* randomizado x **+R1881**, *Gapmer PVT1*;
- **-R1881**, *Gapmer* randomizado x **-R1881**, *Gapmer PVT1*;
- **-R1881**, *Gapmer* randomizado x **+R1881**, *Gapmer* randomizado x **+R1881**, *Gapmer PVT1*.

Para isso, foi calculado o *z-score* de cada transcrito entre as diversas condições comparadas, e plotado em um gráfico em que o *z-score* é representado com uma escala de cores que é proporcional ao número de desvios abaixo ou acima da média (zero) numa faixa entre -2 e +2, utilizando-se o programa Spotfire (TIBCO).

3.11. Diagrama de Venn

As comparações do item 3.10 resultaram em listas de genes diferencialmente expressos entre diferentes condições experimentais. A partir dessas listas foram buscados os genes presentes na intersecção entre as diferentes condições, e o resultado foi mostrado com um diagrama de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). As interseções mostradas foram as seguintes: genes ativados com o silenciamento do lincRNA *PVT1* nas condições desprovida de ou suplementada com andrógeno; genes inibidos com o silenciamento do lincRNA *PVT1* nas condições desprovida de ou suplementada com andrógeno; e genes inibidos por andrógeno e ativados com o silenciamento do lincRNA *PVT1* nas condições desprovidas de ou suplementadas com andrógeno.

3.12. Ontologia dos genes diferencialmente expressos

O conjunto dos genes presentes na intersecção entre inibidos por andrógeno e ativados com o silenciamento do lincRNA *PVT1* foram submetidos à análise de ontologia de genes (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) para encontrar as ontologias estatisticamente enriquecidas.

3.13. Estudo da dependência de dose do hormônio

As células LNCaP foram cultivadas em placas de 60 mm até atingirem a confluência de aproximadamente 50 %. O meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de RPMI-SFB-N foi trocado pelo meio de cultura RPMI-SFB-CA, a cada 24 horas, totalizando 48 horas de escassez de hormônio. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e o meio foi trocado novamente por RPMI-SFB-CA, nesse momento, foi adicionado 0,1, 1,0 ou 10,0 nM de R1881, criando as condições “suplementados com andrógeno”, e em paralelo o volume

correspondente de etanol absoluto foi adicionado no controle, criando a condição “desprovido de andrógeno”. Após 24 horas, as células foram coletadas com TRIzol (Invitrogen) e seguiu-se o procedimento descrito no item 3.2.

3.14. Imunoprecipitação da cromatina – CHIP-qPCR

Para o experimento de CHIP-qPCR, as células foram cultivadas em placas de cultura de 150 mm (Sarstedt) até a confluência de aproximadamente 50 %. Nesse ponto, as células foram lavadas com solução salina PBS e foi adicionado meio de cultura RPMI-SFB-CA, totalizando 48 horas de escassez de hormônio andrógeno. Após o tempo de depleção do hormônio, as células foram lavadas, o meio foi trocado novamente por RPMI-SFB-CA e foram adicionados os *gapmers* complexados a lipofectamina 3000 (30,0 µL de lipofectamina para 900 pmol de *gapmer* randomizado (controle negativo) ou 900 pmol de um combinado dos *gapmers* 2 e 5, 450 pmol de cada, contra lincRNA *PVT1*. Seguidas 24 horas, foi adicionado ao meio 10,0 nM R1881, criando a condição “suplementado com andrógeno”.

Duas placas foram usadas em paralelo para quantificar as células por extrapolação com contagem na câmara de Neubauer; as células passaram pelo mesmo tratamento descrito acima, exceto pela adição dos *gapmers*.

Após 24 horas, o meio de cultura RPMI-SFB-CA + 10,0 nM de R1881 + *gapmers* foi retirado e substituído por 20 mL de tampão de *crosslinking* (50 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 mM EGTA, pH 8,0) à temperatura ambiente. Logo, foi adicionado 550 µL de Formaldeído a 35 % durante 10 minutos para realizar a reação de *crosslinking* das proteínas com o DNA. Em seguida, foi adicionado 2 mL de glicina (125 mM) para parar a reação durante 5 minutos. Então, as células na placa foram lavadas duas vezes

com PBS gelado e foi adicionado 2 mL de PBS gelado suplementado com inibidor de protease, para em seguida as células serem coletadas com rodinho (*cell scraper*). Por fim, as células foram centrifugadas a 1500 RPM, a 4 °C, durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi colocado no nitrogênio líquido rapidamente e as amostras foram estocadas no freezer -80 °C até a etapa de imunoprecipitação da cromatina (descrita a seguir).

As células foram descongeladas no gelo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão de lise (Millipore) suplementado com inibidor de protease (Millipore) e mantido a 4 °C em rotação constante durante 30 minutos. Logo após as células foram centrifugadas à 1500 RPM, a 4 °C, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em tampão de lavagem do núcleo (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,5 mM EGTA, pH 8,0) suplementado com inibidor de protease (Millipore), agitado vigorosamente em vórtex e centrifugado novamente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 500 µL de tampão de fragmentação da cromatina (10 mM Tris, pH 8,1, 0,1 % SDS, 1 mM EDTA) suplementado com inibidor de protease (Millipore); em seguida, as amostras foram mantidas a 4 °C em rotação constante durante 30 minutos.

Então, a cromatina foi fragmentada com o uso do sonicador Covaris (Covaris S2) em tubo de 130 µL, nas condições: Duty Cycle 2 %, Intensity 3, Cycles per burst 200, Time 480 s.

As seis imunoprecipitações da cromatina foram realizadas com 60-80 µL da amostra sonicada mais 420-460 µL do tampão de Imunoprecipitação (17-10085, Millipore) *overnight* a 4 °C com rotação constante com 5 µg de cada um dos anticorpos: anti-AR (1710489,

Millipore), anti-EZH2 (17-662, Millipore), anti-H3K27Ac (07-360, Millipore), anti-H3K4me3 (04-745, Millipore), anti-H3K27me3 (07-449, Millipore) e anti-Pol II (05-623B, Millipore). A precipitação final dos anticorpos, as lavagens, a degradação das proteínas nos precipitados e a purificação dos fragmentos de DNA contidos no precipitado foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante do kit (Magna ChIP™ A/G, 17-1085, Millipore).

3.15. Estatística

A análise estatística de comparação de duas médias foi realizada com teste t para amostras independentes (não pareadas).

4. Resultados e discussão

4.1. Imunoprecipitação de Ribonucleoproteínas seguida de qPCR dos RNAs co-Imunoprecipitados (RIP-qPCR)

Em 2018, nosso grupo de pesquisa reportou a associação física do lincRNA *PVT1* ao receptor de andrógeno (AR) em células de câncer de próstata LNCaP, em um trabalho que revelou o enriquecimento de 619 lincRNAs (FDR < 10 %) na amostra anti-AR comparada com a amostra IgG de coelho não-imunizado em dados de RIP-seq (*Ribonucleoprotein Immuno Precipitation* seguida de sequenciamento em larga-escala dos RNAs co-imunoprecipitados) (daSilva, Beckedorff et al. 2018). Dados da literatura também revelaram por ChIP-Chip (*Chromatin Immuno Precipitation* seguida da medida dos RNAs co-imunoprecipitados usando *microarrays*) a associação do lincRNA *PVT1* às proteínas do complexo repressor de cromatina Polycomb 2 (PRC2) em células de câncer cervical (HeLa) (Khalil, Guttman et al. 2009).

Nossa primeira abordagem foi validar em células LNCaP a associação do lincRNA *PVT1* ao receptor de andrógeno e às proteínas do complexo repressor Polycomb 2, por meio da imunoprecipitação de ribonucleoproteínas (RIP) com anticorpos anti-AR, anti-EZH2 e anti-SUZ12, seguida da extração dos RNAs co-imunoprecipitados, transcrição reversa e qPCR com *primers* específicos para o lincRNA *PVT1* (RIP-qPCR).

Usamos células LNCaP nas condições de cultura suplementada com ou desprovida de R1881, e submetemos as células ao protocolo de RIP-qPCR usando os anticorpos anti-AR, anti-EZH2 e anti-SUZ12, bem como os seus correspondentes controles (soro de animal não-imunizado, IgG). O objetivo era validar o experimento de RIP-seq de nosso grupo, que havia

detectado a associação do lincRNA *PVT1* ao AR, além de confirmar os dados de experimentos da literatura com células HeLa, em que o lincRNA *PVT1* aparece associado às proteínas do complexo repressivo Polycomb 2, desta vez, em células de câncer de próstata LNCaP.

Como primeiro passo, a eficiência do tratamento das células LNCaP com andrógeno sintético R1881 (10 nM) foi testada por meio da medida com RT-qPCR da expressão dos genes *PSA*, *NDRG1*, *TMPRSS2*, *FASN*, *SI* e *OPRK1* conhecidamente responsivos a andrógeno (Zhao, Yu et al. 2012, Jin, Kim et al. 2013) (**Figura 8**). A fração do *input* de cada réplica dos experimentos de imunoprecipitação, antes da adição dos anticorpos, foi utilizada para verificar a eficiência do tratamento das células com andrógeno.

A **figura 8** mostra que todos os genes responsivos a andrógeno testados apresentaram o efeito esperado na expressão quando a condição suplementada com andrógeno (+R1881) é comparada à condição desprovida de andrógeno (–R1881). Como esperado, a expressão dos genes *PSA*, *NDRG1*, *TMPRSS2* e *FASN* foi significativamente aumentada pela adição de andrógeno, enquanto a expressão dos genes *SI* e *OPRK1* foi significativamente diminuída em células LNCaP suplementadas com R1881.

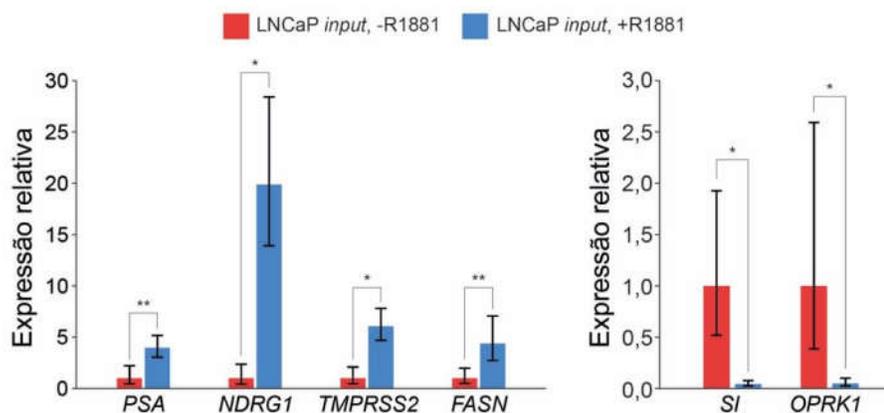


Figura 8: Expressão de genes responsivos a andrógeno em cultura de células LNCaP.

A expressão dos genes *PSA*, *NDRG1*, *TMPRSS2* e *FASN* sabidamente ativada por andrógeno, e dos genes *SI* e *OPRK1*, sabidamente reprimida por andrógeno conforme descrito na literatura (Zhao, Yu et al. 2012, Jin, Kim et al. 2013) foi medida por RT-qPCR usando *primers* específicos para cada gene indicado no eixo x, para verificar a eficiência do tratamento com andrógeno. Células LNCaP suplementadas com análogo de andrógeno (+R1881, barras azuis) ou células controle desprovidas de andrógeno (-R1881) foram testadas; uma alíquota de cada uma das quatro réplicas do *input* do experimento de RIP foi usada, antes da adição dos anticorpos. O gráfico mostra a média \pm s.e.m. A média geométrica da expressão de *GAPDH*, *ACTB* e *U1* foi usada como normalizador; como segundo normalizador foi usada a expressão de cada gene na condição desprovida de andrógeno (-R1881). * denota p-valor < 0,05 e ** denota p-valor < 0,10.

O próximo passo foi fazer a imunoprecipitação do receptor de andrógeno usando o anticorpo anti-AR e em paralelo usando um controle (IgG de coelho não-imunizado), com culturas de células LNCaP na condição suplementada com R1881 (+R1881) e também na condição desprovida de andrógeno (-R1881), e em seguida medir por qPCR o RNA ligado ao AR e co-imunoprecipitado pelo anticorpo. A **Figura 9** (barras verde e roxa) mostra que o lincRNA *PVT1* ligado ao receptor de andrógeno corresponde a aproximadamente 10 – 12 % do *PVT1 input* presente nas células, tanto na ausência (-R1881, barra roxa) quanto na presença de andrógeno (+R1881, barra verde). Vê-se também na **Figura 9** (barras laranja e rosa) que todos os lincRNAs medidos no precipitado são especificamente ligados ao AR, já que nenhum lincRNA foi medido no precipitado usando-se IgG (controle de animal não-imunizado).

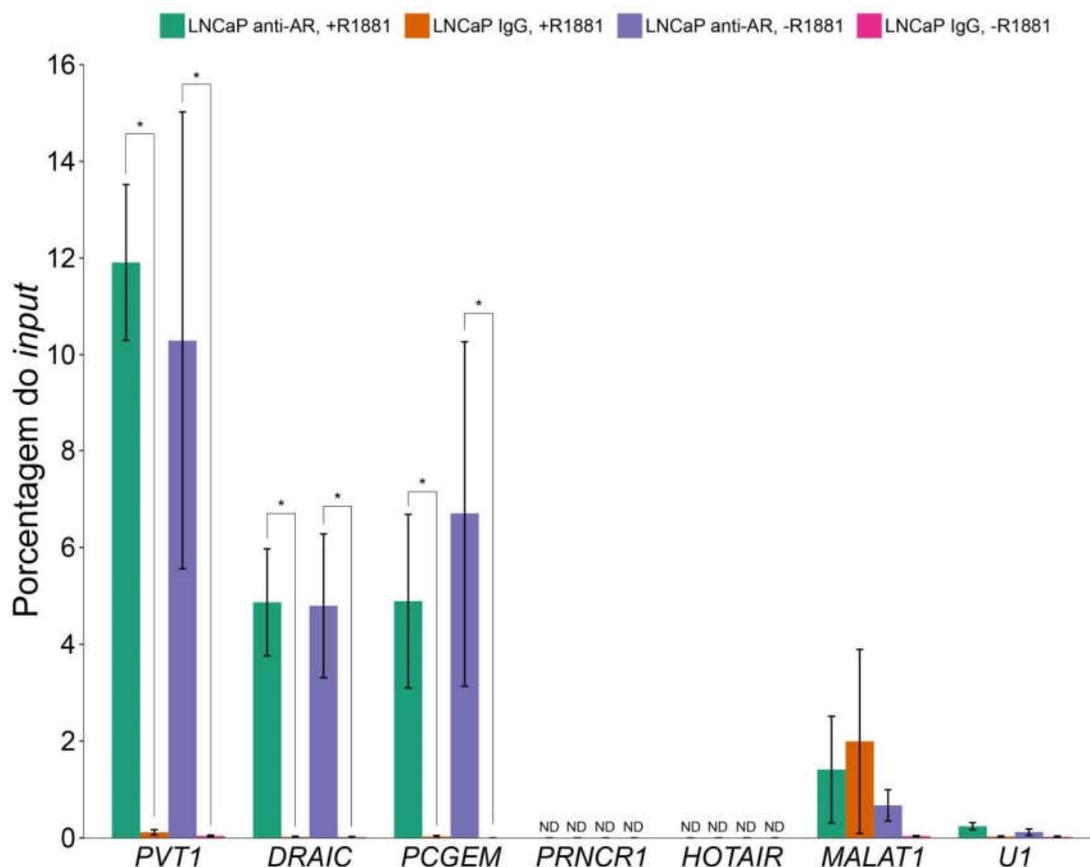


Figura 9: LincRNA *PVT1* está associado ao receptor de andrógeno (AR) na presença e ausência de andrógeno.

Células LNCaP em cultura foram suplementadas com 10,0 nM de R1881 (+R1881, barras verde e laranja) durante 48 horas, ou mantidas na condição desprovida de andrógeno (– R1881, barras roxo e rosa). Em seguida o receptor de andrógeno (AR) foi imunoprecipitado a partir de um lisado das células usando anticorpo anti-AR (barras verde e roxo), e em paralelo um controle com anticorpo não específico foi obtido (IgG; barras laranja e rosa). Os RNAs co-imunoprecipitados foram extraídos e usados para medir os genes indicados no eixo x, usando qPCR com *primers* específicos para: lincRNAs *PVT1* e *DRAIC* (alvos deste estudo), lincRNA *PCGEM* (controle positivo, sabidamente ligado ao AR (Yang, Lin et al. 2013)), *PRNCR1* e *HOTAIR* (controles positivos não detectados no *input* e no imunoprecipitado), lincRNA *MALAT1* e *U1* (controles negativos, não descritos como ligados ao AR). O gráfico mostra a abundância de cada gene no imunoprecipitado em relação à abundância total do mesmo gene presente em uma amostra do lisado não tratada com anticorpos, processada em paralelo (% *input*). Os dados mostram a média \pm s.e.m. de quatro réplicas biológicas. ND: não detectável. * denota p-valor < 0,05.

Para aumentar a confiança no ensaio de RIP-qPCR, nós também medimos a presença do lincRNA *DRAIC* no imunoprecipitado de AR; esse lincRNA é um supressor de tumor cuja

expressão diminui à medida que as células do câncer de próstata progridem de um estado dependente de andrógeno (AD) para um estado resistente à castração (CR) (Sakurai, Reon et al. 2015). Os dados de RIP-seq haviam mostrado que também o lincRNA *DRAIC* estava associado ao AR (daSilva, Beckedorff et al. 2018). Os dados da **Figura 9** confirmam que o lincRNA *DRAIC* está ligado ao receptor de andrógeno em aproximadamente 5 % do *input* em ambas as condições, suplementado com e desprovido de andrógeno (**Figura 9**).

O passo seguinte foi medir a ligação do lincRNA *PVT1* ao complexo repressor Polycomb 2 (PRC2) usando anticorpos para duas subunidades componentes do complexo, ou seja, anticorpos anti-EZH2 ou anti-SUZ12. Na presença de R1881 (+R1881) o lincRNA *PVT1* se liga à proteína EZH2 em aproximadamente 36 % em relação ao *input* (**Figura 10**, barra verde). A associação do lincRNA *PVT1* à EZH2 também pode ser observada na condição desprovida de R1881 (-R1881), situação em que o lincRNA *PVT1* se liga à proteína EZH2 em aproximadamente 42 % em relação ao *input* (**Figura 10**, barra roxa). Novamente, vê-se a ligação dos lincRNAs à EZH2, sendo que nenhum RNA foi detectado no ensaio com IgG controle (de animal não-imunizado) (**Figura 10**, barras laranja e amarelo).

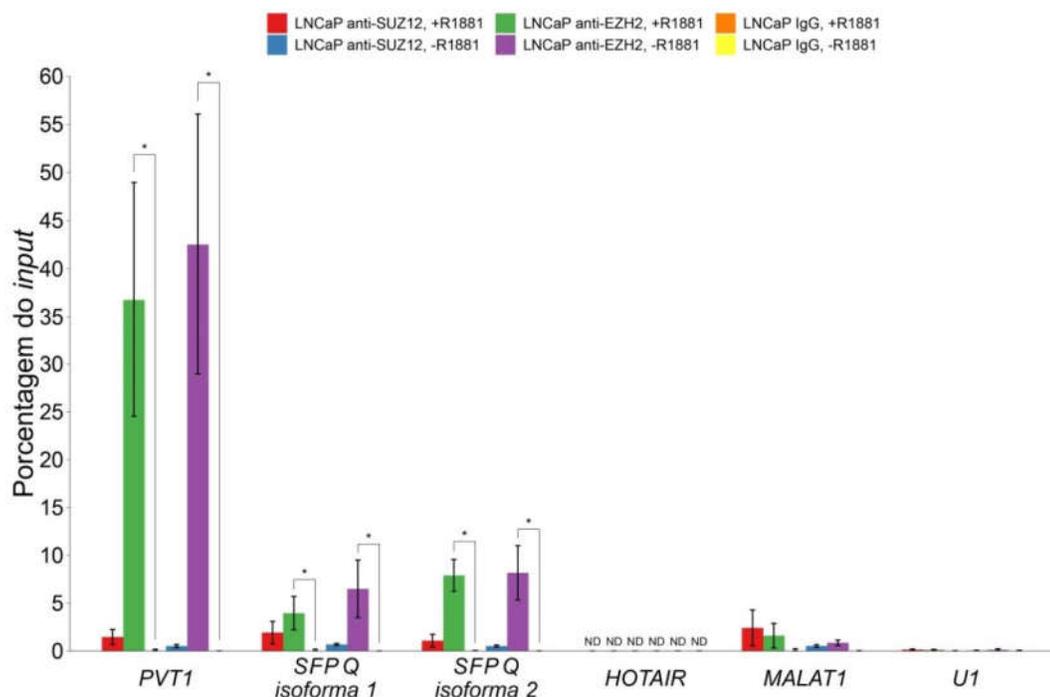


Figura 10: lincRNA *PVT1* está associado à proteína EZH2 na presença e ausência de andrógeno.

Células LNCaP em cultura foram tratadas com 10,0 nM de R1881 (+R1881, vermelho, verde e laranja) ou mantidas na condição desprovida de andrógeno (-R1881 azul, roxo e amarelo). As células foram lisadas e tratadas com anticorpo anti-EZH2 (verde e roxo), anti-SUZ12 (vermelho e azul) ou com anticorpos não específicos (IgG mouse; laranja e amarelo). Os complexos anticorpo-ligante foram precipitados, e o RNA co-imunoprecipitado foi extraído e usado em ensaios de qPCR para quantificar a presença dos genes indicados no eixo x: lincRNA *PVT1* (alvo), lincRNA *SFPQ* (controle positivo, dois conjuntos de *primers* foram usados para amplificar isoformas diferentes), *HOTAIR* não detectado no *input* e no imunoprecipitado, lincRNA *MALAT1* e *U1* (controles negativos). O gráfico mostra a abundância de cada gene no imunoprecipitado em relação à abundância total do mesmo gene presente em uma amostra do lisado não tratada com anticorpos, processada em paralelo (% *input*). Os dados mostram a média \pm s.e.m. de quatro réplicas biológicas. ND: não detectável. * denota p-valor < 0,05.

Como não foi possível detectar a associação do lincRNA *PVT1* e nem do controle positivo lincRNA *SFPQ* à proteína SUZ12 (Figura 10, barras vermelho e azul), supomos a existência de algum problema com o anticorpo; não foi possível repetir o ensaio a tempo para testarmos outro lote. Outra possibilidade é que nas condições de imunoprecipitação usadas em nossos experimentos, o complexo repressor Polycomb 2 não estava mantido completamente íntegro, e uma das subunidades, a proteína SUZ12, não estava unida à outra subunidade EZH2.

É interessante chamar a atenção para o fato de que não há diferença estatística na associação do lincRNA *PVT1* com AR em ambas as condições, suplementada com e desprovida de R1881, ou na associação do lincRNA *PVT1* com EZH2 em ambas as condições. Assim, nós podemos concluir que uma fração do lincRNA *PVT1* está associado ao AR e à proteína EZH2 do complexo repressivo Polycomb 2 independentemente do hormônio andrógeno (Figuras 9 e 10).

4.2. Alteração da expressão gênica em larga-escala em células LNCaP sob silenciamento da expressão do lincRNA *PVT1*

Para que o complexo repressor Polycomb 2 (PRC2) execute a sua função de remodelamento da cromatina, consequentemente inibindo a transcrição gênica, o PRC2 deve ser direcionado aos *loci* gênicos em um determinado momento durante o ciclo celular. No entanto, o PRC2 não apresenta domínios específicos de ligação às sequências do DNA capaz de guiá-lo. O envolvimento de fatores acessórios como lincRNAs e fatores de transcrição nesse processo é crucial para a regulação da expressão gênica por meio da epigenética (Lee 2012, Beckedorff, Amaral et al. 2013, Wang, Wang et al. 2017).

A alteração de qualquer fator envolvido na modificação da cromatina terá efeitos importantes sobre o padrão de expressão gênica global de uma célula. Desse modo, para identificar quais seriam os genes alvo possivelmente regulados pelo lincRNA *PVT1* interagindo com AR e EZH2 nas células da próstata, apliquei a estratégia de ganho e perda de função para verificar quais são os genes afetados pelo silenciamento da expressão gênica do lincRNA *PVT1* em células LNCaP em cultura suplementada com ou desprovida de andrógeno.

Para o silenciamento da transcrição do lincRNA *PVT1*, utilizei dois oligonucleotídeos antisenso (*antisense oligonucleotides*, ASOs) com sequências complementares a dois trechos diferentes do lincRNA *PVT1*. Os ASOs que usei são constituídos de um curto segmento de ácidos ribonucleicos flanqueado por *Locked Nucleic Acids (LNA)*, que conferem maior resistência à degradação e maior especificidade ao alvo (item 3.8). Após essa modificação, os ASOs recebem o nome de *gapmers*.

Os *gapmers* que utilizamos para silenciar a transcrição do lincRNA *PVT1* alvejam dois éxons diferentes de duas isoformas do *PVT1* descritas no genoma humano versão hg19 (**Figura 11**) (*Transcript ID* PVT1:12 e PVT1:23 obtido de <https://lncipedia.org/> (Volders, Anckaert et al. 2019)).

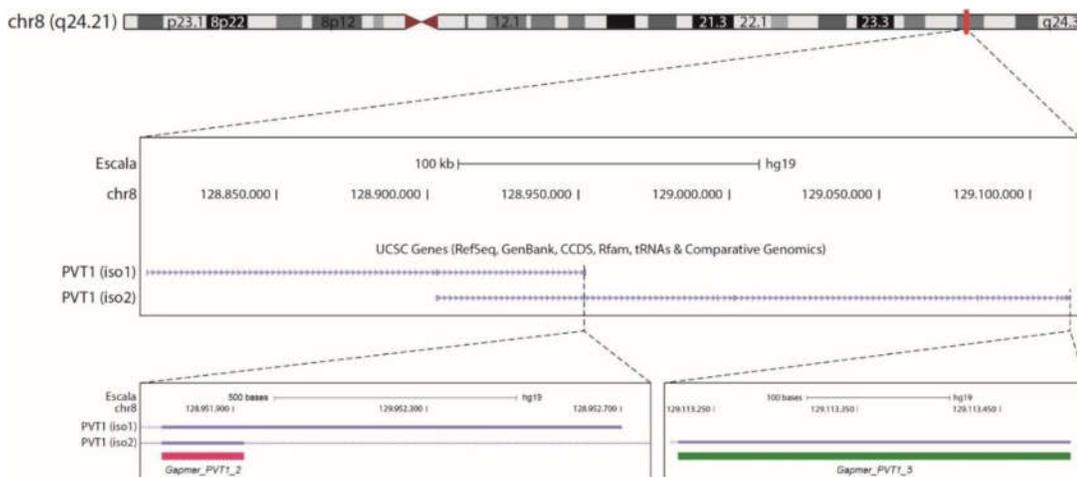


Figura 11: Mapa das regiões genômicas do transcrito lincRNA *PVT1* em que anelam os *gapmers* utilizados para o silenciamento da transcrição do lincRNA *PVT1*.

Cada um dos dois *gapmers* anela em um éxon de uma das duas isoformas do lincRNA *PVT1*, sendo que o *gapmer_PVT1_2* (vermelho) alveja o éxon 3' da isoforma 1 (*PVT1 iso1*, *Transcript ID* PVT1:12) e o éxon 2 da isoforma 2 (*PVT1 iso2*, *Transcript ID* PVT1:23) (painel inferior esquerdo), enquanto o *gapmer_PVT1_5* (verde) alveja o éxon 9 da isoforma 2 (*PVT1 iso2*) (painel inferior direito). Os *gapmers* são oligonucleotídeos 16-mer modificados com inserção de *Locked nucleic acids (LNA)* nas extremidades, para conferir maior estabilidade aos mesmos (veja Métodos).

Para avaliar a eficiência dos reagentes nas condições que foram usadas para a transfecção das células LNCaP com *gapmers*, foi realizado o silenciamento do lincRNA *MALAT1* com o *gapmer MALAT1*, um *gapmer* validado pelo fabricante como um controle positivo eficiente. Nas condições experimentais otimizadas em nosso ensaio (ver Métodos), em cultura de células LNCaP suplementada com andrógeno, a redução da expressão gênica do lincRNA *MALAT1* foi acima de 70 % comparado ao controle negativo (**Figura 12**), atestando, portanto, a eficiência das condições de transfecção que foram usadas.

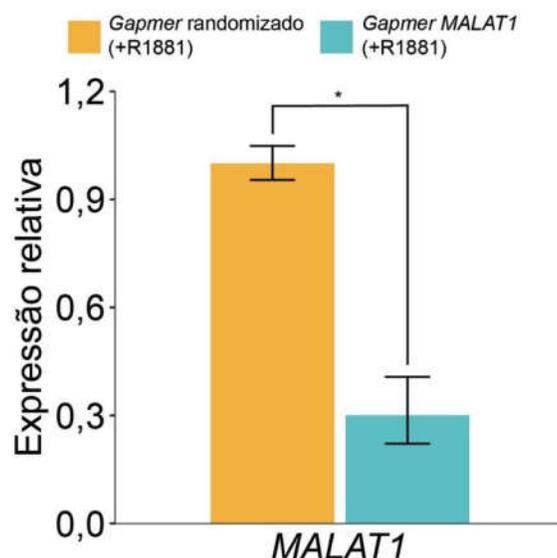


Figura 12: Silenciamento da transcrição do lincRNA *MALAT1*, usado como controle positivo das condições de transfecção.

Células LNCaP foram desprovidas de andrógeno por dois dias, seguido pela transfecção com lipofectamina 3000 + *gapmer* randomizado (laranja) ou lipofectamina 3000 + *gapmer* contra o lincRNA *MALAT1* (ciano), em meio suplementado com andrógeno (+R1881). Após 24 h de incubação, o RNA foi extraído e usado para medir por RT-qPCR o nível de expressão do lincRNA *MALAT1*. A expressão do lincRNA *MALAT1* foi normalizada pela média geométrica da expressão dos genes *GAPDH* e *ACTB*, usados como genes de referência endógenos invariantes. A expressão relativa mostrada no eixo Y refere-se à segunda normalização dos dados do qPCR, que foi realizada usando-se o valor médio da expressão do lincRNA *MALAT1* entre as réplicas da amostra tratada com *gapmer* randomizado, tomada como expressão unitária. Dados mostram a média \pm s.e.m. de quatro réplicas biológicas para o *gapmer* randomizado e três réplicas biológicas para o *gapmer MALAT1*. (*) denota $p < 0,05$ entre as amostras indicadas. teste-t de Student foi utilizado.

O próximo passo foi confirmar a eficiência do par de *gapmers* *PVT1* por nós desenhados para produzirem o silenciamento de nosso gene de interesse, o lincRNA *PVT1*. A **Figura 13** mostra que a redução da expressão do lincRNA *PVT1* nas células LNCaP em cultura tratadas com *gapmer* *PVT1* foi acima de 70 % quando comparada com a expressão de *PVT1* em células LNCaP tratadas com *gapmer* randomizado, tanto na condição suplementada com andrógeno (**Figura 13**, +R1881 direita) como na condição desprovida de andrógeno (**Figura 13**, -R1881 esquerda).

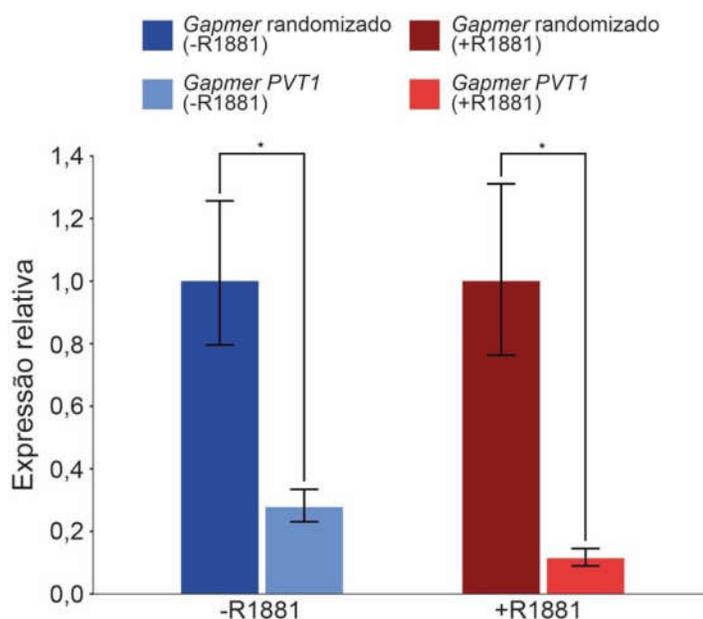


Figura 13: RT-qPCR para avaliar o silenciamento do lincRNA *PVT1* em células LNCaP.

O silenciamento foi eficiente tanto na condição desprovida de andrógeno (-R1881, azul, esquerda) quanto na condição suplementada com R1881 (+R1881, vermelho a direita). As células LNCaP foram exauridas de hormônio por dois dias, seguido pela transfecção com *gapmer* randomizado (azul escuro e vermelho escuro, controle negativo), ou com uma quantidade equimolar de um *pool* de *gapmers* contra o lincRNA *PVT1* (Gapmer_ *PVT1*_2 e Gapmer_ *PVT1*_5, figura 11) (azul claro e vermelho claro). As células foram então mantidas por 48 horas na condição desprovida de R1881 (-R1881, azul) ou suplementada com R1881 (+R1881, vermelho), e em seguida o RNA foi extraído e usado para medir o nível do lincRNA *PVT1* por RT-qPCR com *primers* específicos. A expressão do lincRNA *PVT1* foi normalizada pela média geométrica da expressão dos genes *GAPDH* e *ACTB*, usados como genes de referência endógenos invariantes. A expressão relativa mostrada no eixo Y refere-se à segunda normalização dos dados do qPCR, que foi realizada usando-se o valor médio da expressão do lincRNA *PVT1* entre as réplicas da amostra tratada com *gapmer* randomizado, tomada como expressão unitária. Dados mostram a média \pm s.e.m. de quatro réplicas biológicas. (*) denota $p < 0,05$ entre as amostras indicadas; teste-t de Student foi utilizado.

Com o nível de redução da expressão do lincRNA *PVT1* obtido em nossos ensaios (70 – 90 % de redução) já é possível esperar significativos efeitos no mecanismo de transcrição celular via modificação do epigenoma, e testar se efetivamente a nossa hipótese do envolvimento do lincRNA *PVT1* nesse processo está correta.

Após avaliar a integridade das amostras do RNA extraído, realizei a medida de expressão gênica em larga-escala nas células LNCaP tratadas com o *gapmer* randomizado ou com os *gapmers PVT1*, usando o microarranjo para todos os genes humanos da Agilent (SurePrint G3 Human gene Expression v3; 8 x 60k, G4851C).

A primeira análise de genes diferencialmente expressos foi realizada com as amostras de RNA extraído de células LNCaP tratadas com o *gapmer* randomizado (controle negativo), ou seja, uma situação em que a expressão do lincRNA *PVT1* não foi reduzida; para detectar o efeito do hormônio sobre a expressão gênica em larga-escala, comparamos a expressão de células mantidas em cultura na presença (+R1881) ou ausência (-R1881) de andrógeno. Vê-se na **Figura 14** que a adição de andrógeno (+R1881) promoveu a mudança de expressão de 2038 genes. Dentre os 2038 genes responsivos a andrógeno, 883 são ativados por andrógeno, enquanto 1155 são inibidos por andrógeno (**Figura 14 e Tabela A1, Apêndice 1**).

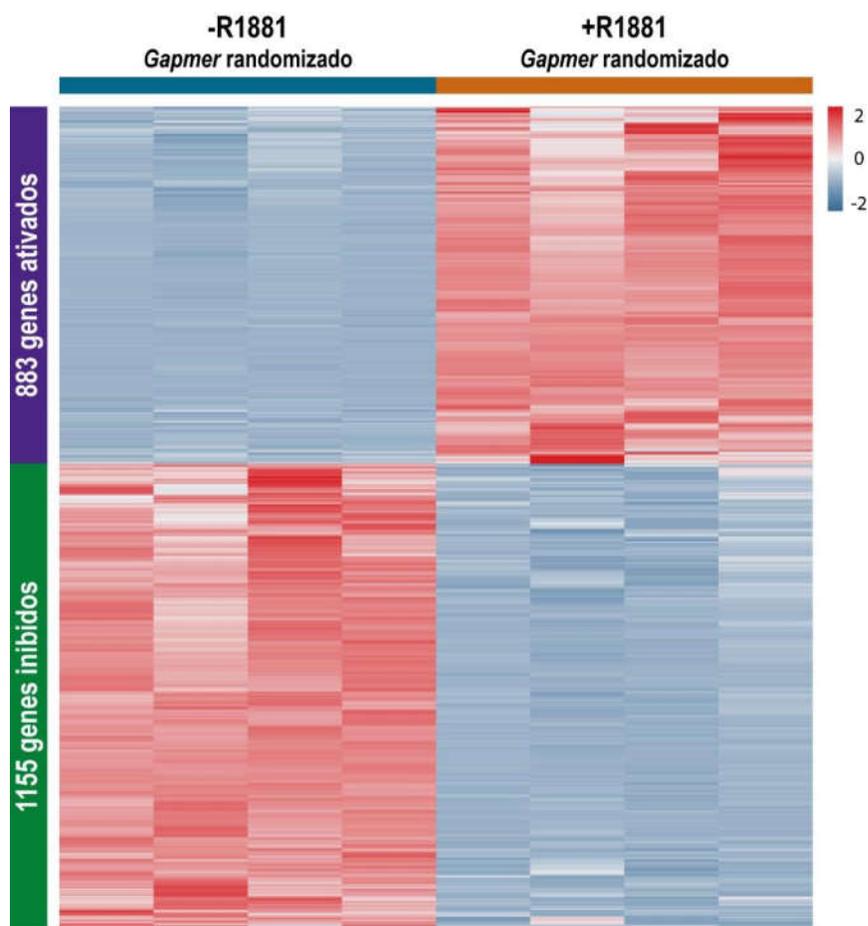


Figura 14: Genes responsivos a andrógeno em células LNCaP em cultura.

Cluster hierárquico mostrando os genes com expressão afetada pela adição de andrógeno (+R1881), em quatro réplicas (colunas) de células LNCaP em cultura tratadas com *gapmer* randomizado (*gapmer* controle negativo), que possuem níveis normais do lincRNA *PVT1*. Foram usadas culturas desprovidas de andrógeno (-R1881, esquerda) ou suplementadas com andrógeno (+R1881, direita). Um total de 883 genes são ativados por andrógeno (barra roxa lateral esquerda) e 1155 genes são inibidos por andrógeno (barra verde lateral esquerda). São mostrados os genes significativamente diferencialmente expressos ($q\text{-valor} < 0,01$, $fold\text{-change} > 2^{+1}$ ou $fold\text{-change} < 2^{-1}$). Para cada gene (uma linha) foi calculado o z-score, que representa o número de desvios padrão abaixo (azul) ou acima (vermelho) da média de expressão de cada gene; a escala de cores está mostrada ao alto à direita e varia de z-score -2 (azul) até +2 (vermelho).

Para confirmar o efeito do andrógeno medido nos microarranjos, eu fiz a medida por RT-qPCR de 7 genes selecionados, cuja expressão havia sido detectada no ensaio com microarranjos como aumentada (4 genes) ou diminuída (3 genes) na presença do hormônio, comparada com a expressão na ausência do andrógeno. Pode-se ver na **Figura 15** que todos os genes selecionados tiveram sua mudança de expressão confirmada no ensaio de RT-qPCR,

tanto os 4 genes cuja expressão foi aumentada com a adição do hormônio (**Figura 15**, painel superior), quanto os 3 genes cuja expressão foi diminuída com a adição do hormônio (**Figura 15**, painel inferior). Também incluímos a medida do lincRNA *PVT1*, e confirmamos que o andrógeno não afetou seu nível de expressão em células LNCaP em cultura (**Figura 15**).

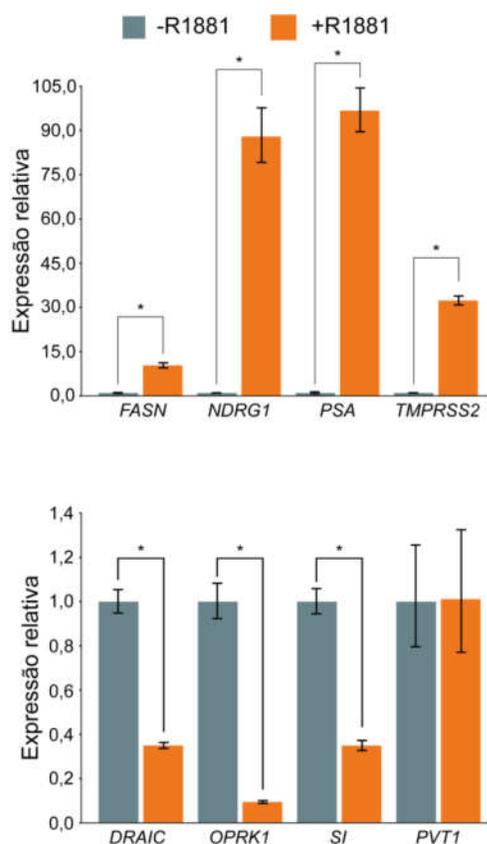


Figura 15: Confirmação por RT-qPCR da mudança de expressão de um conjunto selecionado de genes, induzida pelo tratamento de células LNCaP com andrógeno (R1881).

As amostras controles negativos do experimento de silenciamento do lincRNA *PVT1* (transfectadas com *gapmer* randomizado) foram utilizadas para confirmar a mudança de expressão induzida por andrógeno de um conjunto de genes selecionados. A expressão dos genes foi medida por RT-qPCR nas culturas desprovidas de andrógeno (– R1881, azul, esquerda) e nas culturas suplementadas com R1881 (+R1881, laranja, direita). Inicialmente as células LNCaP em cultura foram exauridas de hormônio por dois dias, seguido pela transfecção com *gapmer* randomizado (controle negativo do ensaio de *knockdown*); nestas condições o lincRNA *PVT1* é expresso em seus níveis normais. Em seguida o hormônio foi adicionado (+R1881, laranja, direita) ou as células foram mantidas na ausência de hormônio (– R1881, azul, esquerda), e as células foram mantidas incubadas por 24 h. O RNA foi extraído e usado para a medida da expressão, por RT-qPCR, dos genes indicados. A expressão dos genes foi normalizada pela média geométrica da expressão dos genes *GAPDH* e *ACTB*, usados como genes de referência endógenos invariantes. A expressão relativa mostrada no eixo Y refere-se à segunda normalização dos dados do qPCR, que foi realizada usando-se o valor médio entre as réplicas da expressão de cada transcrito na amostra na ausência de andrógeno, tomada como expressão unitária. Dados mostram a média \pm s.e.m. de quatro réplicas biológicas. (*) denota $p < 0,05$ entre as amostras indicadas; teste-t de Student foi utilizado.

O efeito do andrógeno (R1881) sobre a transcrição dos genes selecionados está de acordo com o relatado na literatura (Zhao, Yu et al. 2012, Jin, Kim et al. 2013, Sakurai, Reon et al. 2015). Portanto, o *gapmer* randomizado (controle negativo da transfecção) não teve efeito sobre a transcrição gênica a tal ponto que venha a comprometer a comparação da expressão de genes entre células LNCaP desprovidas de e suplementadas com andrógeno.

Em seguida, medimos o efeito do silenciamento do lincRNA *PVT1* sobre a transcrição gênica em larga-escala em células LNCaP em cultura mantidas na condição desprovida de andrógeno (– R1881). O ensaio revelou 832 genes diferencialmente expressos, sendo que 396 genes tiveram a expressão aumentada com o silenciamento do lincRNA *PVT1* e 436 genes tiveram a expressão diminuída com o silenciamento do lincRNA *PVT1* (**Figura 16**), quando comparado com a expressão em células não silenciadas (tratadas com o *gapmer* randomizado).

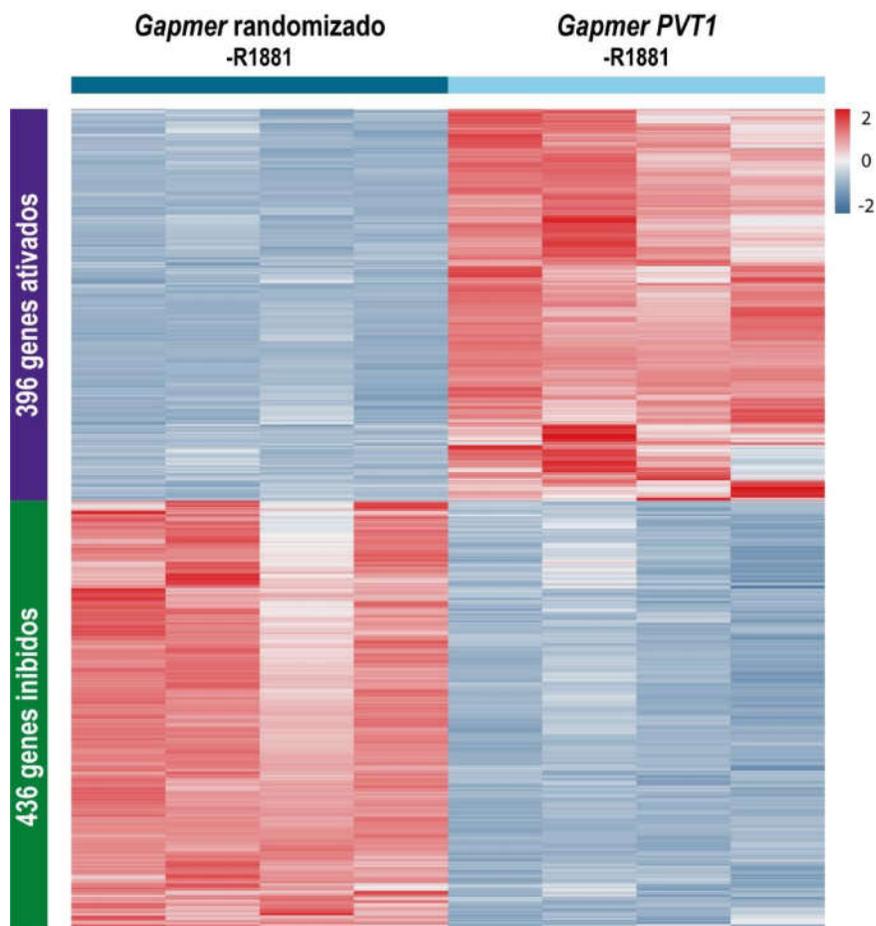


Figura 16: Genes afetados pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* em células LNCaP na condição desprovida de andrógeno.

A expressão gênica em larga-escala, usando microarranjos Agilent com sondas para genes humanos, foi medida com o RNA extraído de quatro réplicas biológicas de culturas de células LNCaP (uma em cada coluna) mantidas na ausência de andrógeno (– R1881) e tratadas com *gapmer PVT1* (direita) ou *gapmer* randomizado (esquerda), conforme indicado no alto dos painéis. Cluster hierárquico mostrando o total de 832 genes significativamente diferencialmente expressos (q -valor $< 0,01$, $fold-change > 2^{+1}$ ou $fold-change < 2^{-1}$), sendo 396 genes com a expressão aumentada pelo o silenciamento do lincRNA *PVT1* (barra roxa lateral esquerda) e 436 genes com a expressão diminuída (barra verde lateral esquerda). Para cada gene (uma linha) foi calculado o z-score, que representa o número de desvios padrão acima (vermelho) ou abaixo (azul) da média de expressão de cada gene; a escala de cores está ao alto à direita, e varia de z-score -2 (azul) até +2 (vermelho).

O aumento da expressão de 396 genes com o silenciamento do *PVT1* (Figura 16, barra roxa lateral esquerda) respalda a hipótese de que o lincRNA estaria envolvido no recrutamento do complexo repressor PRC2, que coloca a marca repressiva H3K27me3 nas histonas na região promotora dos genes alvo, sendo que a supressão de *PVT1* causaria uma

diminuição da marca e aumento da expressão dos genes. Por outro lado, vê-se que para um grande número de genes (436 genes) a expressão foi diminuída com o silenciamento do lincRNA *PVT1*, o que foge da hipótese sobre o mecanismo de ação do *PVT1* que nós nos propusemos a testar. Na realidade, esse efeito oposto sobre a expressão de genes sugere que o lincRNA *PVT1* possa ser um modulador bi-funcional da transcrição de genes que ligue outra enzima modificadora de histonas ainda não identificada, além de EZH2. Esse papel de um lincRNA agir como um *scaffold* para mais de uma enzima modificadora de histonas já foi descrito para o lincRNA *HOTAIR* (Tsai, Manor et al. 2010), que liga pelo menos dois complexos modificadores de histonas distintos: o domínio 5' do *HOTAIR* liga o complexo repressor Polycomb 2 (PRC2) que metila a H3 lisina 27, enquanto o domínio 3' desse lincRNA liga o complexo LSD1/CoREST/REST que desmetila a H3 lisina 4 (Tsai, Manor et al. 2010), e o lincRNA *HOTAIR* age para guiar uma combinação complexa e específica de modificações de histonas nos genes alvo. A identificação de proteínas parceiras do lincRNA *PVT1* que promovem a ativação da transcrição de genes alvo em células LNCaP, e que tiveram sua transcrição diminuída com o silenciamento do lincRNA *PVT1* (**Figura 16**, barra verde lateral esquerda) requer futuros experimentos para sua elucidação.

O próximo experimento visou medir o efeito do silenciamento do lincRNA *PVT1* em cultura de células LNCaP na condição suplementada com andrógeno (+R1881). O silenciamento provocou uma mudança na expressão de 1168 genes, sendo que novamente 658 genes tiveram sua expressão aumentada com o silenciamento de *PVT1*, enquanto que 510 tiveram sua expressão diminuída com o silenciamento (**Figura 17**), quando comparado com a expressão em células não silenciadas (tratadas com o *gapmer* randomizado).

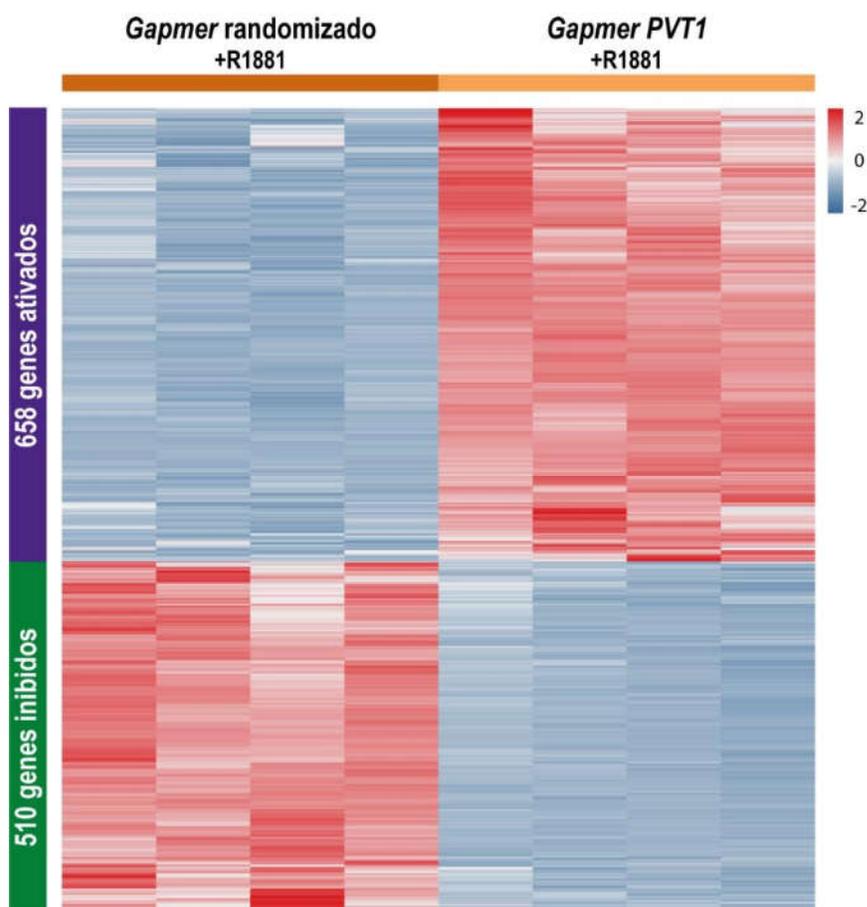


Figura 17: Genes afetados pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* em células LNCaP na condição suplementada com andrógeno.

A expressão gênica em larga-escala, usando microarranjos Agilent com sondas para todos os genes humanos, foi medida com o RNA extraído de culturas de células LNCaP mantidas na presença de andrógeno (+R1881) e tratadas com *gapmer PVT1* (direita) ou *gapmer* randômico (esquerda); quatro réplicas biológicas são mostradas em cada uma das quatro colunas. Cluster hierárquico mostrando o total de 1168 genes significativamente diferencialmente expressos ($q\text{-valor} < 0,01$, $\text{fold-change} > 2^{+1}$ ou $\text{fold-change} < 2^{-1}$), sendo que 658 genes ativados com o silenciamento do lincRNA *PVT1* (barra roxa lateral esquerda) e 510 genes inibidos com o silenciamento (barra verde lateral esquerda). Para cada gene (uma linha) foi calculado o z-score, que representa o número de desvios padrão acima (vermelho) ou abaixo (azul) da média de expressão de cada gene; a escala de cores está mostrada ao alto à direita, e varia de z-score -2 (azul) até +2 (vermelho).

O cruzamento da lista dos 396 genes com expressão aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* na ausência de andrógeno (**Figura 16**) com a lista dos 658 genes com expressão aumentada na presença de andrógeno (**Figura 17**) é mostrado na **Figura 18**. Pode-se observar na **Figura 18** que apenas 426 genes têm sua expressão aumentada pelo

silenciamento do lincRNA *PVT1* exclusivamente na presença de andrógeno. Por outro lado, 232 genes têm sua expressão aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* tanto na presença quanto na ausência de andrógeno; além disso 164 genes aumentam sua expressão pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* apenas na ausência de andrógeno. Esses dados sugerem que o efeito do silenciamento do lincRNA *PVT1* sobre esses 164 genes é independente do AR, o que reforça o fato de que existe um complexo mecanismo de ativação e inibição da transcrição gênica em câncer de próstata (Wang, Li et al. 2009, Cai, He et al. 2011, Wu, Zhang et al. 2011, Jin, Kim et al. 2013, Murthy, Wu et al. 2013, Coutinho, Day et al. 2016, Culig 2016, Zhao, Fong et al. 2016). Esta complexidade da regulação fica ainda mais evidente com a observação de que além de aumentar a transcrição de 822 genes (**Figura 18**, parte superior) o silenciamento do lincRNA *PVT1* promove a diminuição da expressão de um total de 714 genes na presença e/ou ausência de andrógeno (**Figura 18**, parte inferior), o que sugere que o lincRNA *PVT1* possa ser um modulador bi-funcional da transcrição de genes por mecanismos que ainda precisam ser explorados, como já discutido acima. A lista dos genes presentes em cada um dos sub-grupos identificados nesta análise está mostrada na **Tabela A2**.

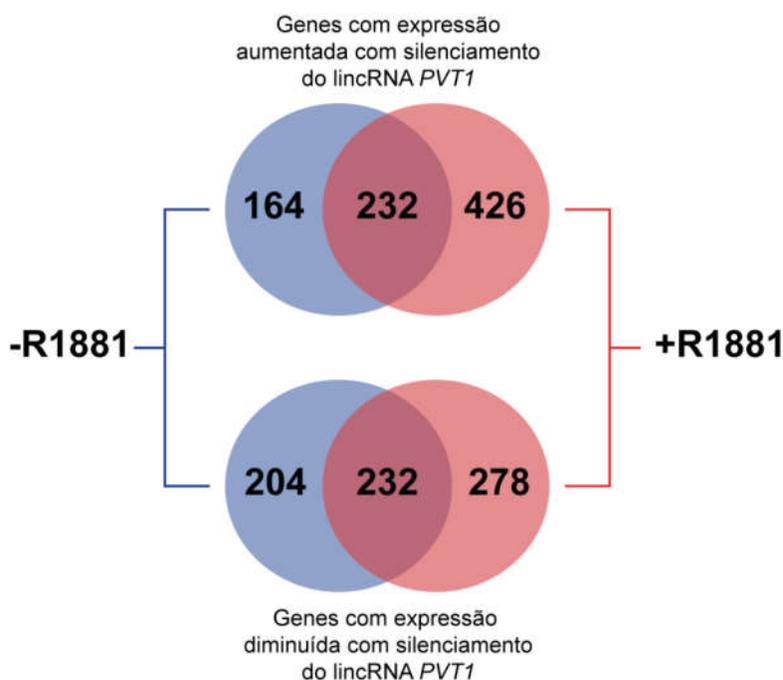


Figura 18: Diagrama de Venn comparando os genes cuja expressão foi afetada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* em células LNCaP em cultura desprovida de ou suplementada com andrógeno.

Na parte superior estão mostrados os genes com expressão significativamente aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* ($q\text{-valor} < 0,01$ e $fold\text{-change} > 2^1$) na condição desprovida de andrógeno (- R1881, azul à esquerda) em comparação com os genes com expressão significativamente aumentada na condição suplementada com andrógeno (+ R1881, vermelho à direita). O número de genes com expressão aumentada pelo silenciamento de *PVT1* em ambas as condições está mostrado na intersecção. Na parte inferior estão mostrados os genes com expressão significativamente diminuída pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* ($q\text{-valor} < 0,01$ e $fold\text{-change} < 2^{-1}$). O número de genes com expressão diminuída pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* em ambas as condições está mostrado na intersecção.

Com o objetivo de focarmos na hipótese de que em células LNCaP a diminuição da expressão de um conjunto de genes se daria pela ação do lincRNA *PVT1* em conjunto com o AR e a EZH2, resolvemos cruzar a lista dos 1155 genes com expressão diminuída em LNCaP na presença do andrógeno (**Figura 13**) com as listas dos genes com expressão aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* na ausência de andrógeno (**Figura 16**) ou na presença de andrógeno (**Figura 17**). O resultado deste cruzamento é mostrado no diagrama de Venn da **Figura 19**, onde se pode observar que existem 160 genes (126 + 34 genes) que tiveram

sua expressão diminuída pelo andrógeno e seus níveis de expressão aumentaram após o silenciamento do lincRNA *PVT1*. A lista dos genes presentes em cada um dos sub-grupos identificados nesta análise está mostrada na **Tabela A3**.

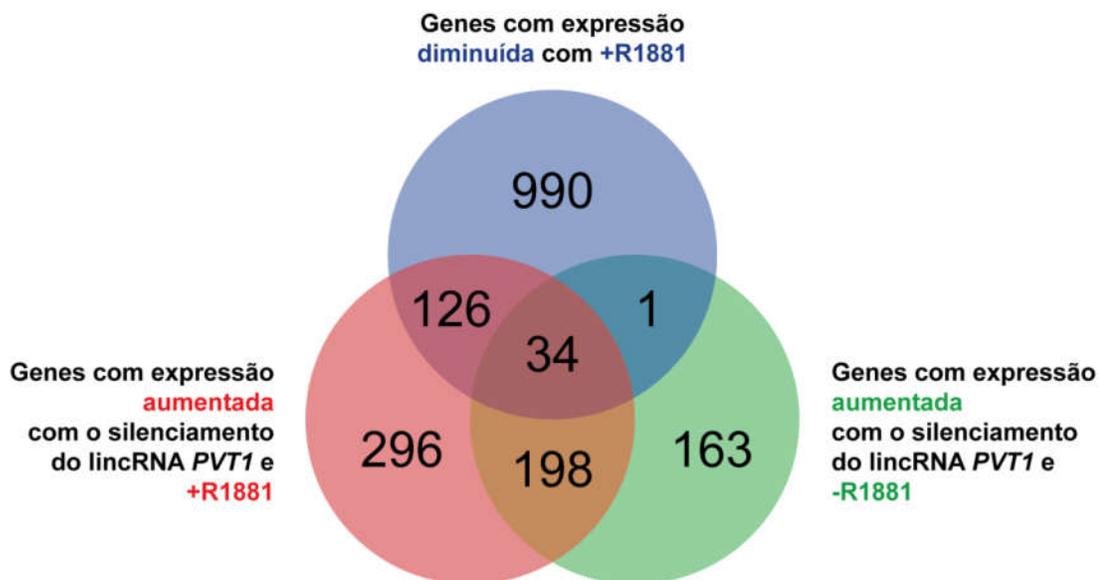


Figura 19: Diagrama de Venn comparando todos os genes inibidos por andrógeno contra os genes ativados pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* nas condições desprovida de ou suplementada com andrógeno.

Os genes negativamente responsivos a andrógeno (q -valor $< 0,01$ e $fold-change < 2^{-1}$) no círculo superior azul foram comparados com os genes cuja transcrição foi aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* (q -valor $< 0,01$ e $fold-change > 2^{+1}$) na condição de tratamento com andrógeno (+R1881) no círculo vermelho à esquerda, e na ausência de andrógeno (-R1881) no círculo verde à direita. O número de genes presentes nas diversas intersecções está mostrado na parte central.

O aumento da expressão deste conjunto de 160 genes pelo silenciamento do *PVT1* na presença de andrógeno está de acordo com a hipótese do envolvimento do *PVT1* em conjunto com o AR e a EZH2 para a diminuição da expressão gênica induzida pelo andrógeno. Por esta razão, resolvemos analisar em mais detalhes estes genes. O *heatmap* da **Figura 20** mostra a expressão dos 160 genes na ausência de andrógeno (**Figura 20**, quatro

colunas da esquerda), e a expressão desses genes após a adição de andrógeno (+R1881) antes do silenciamento do lincRNA (Figura 20, quatro colunas centrais) e após o silenciamento do lincRNA *PVT1* (Figura 20, quatro colunas da direita).

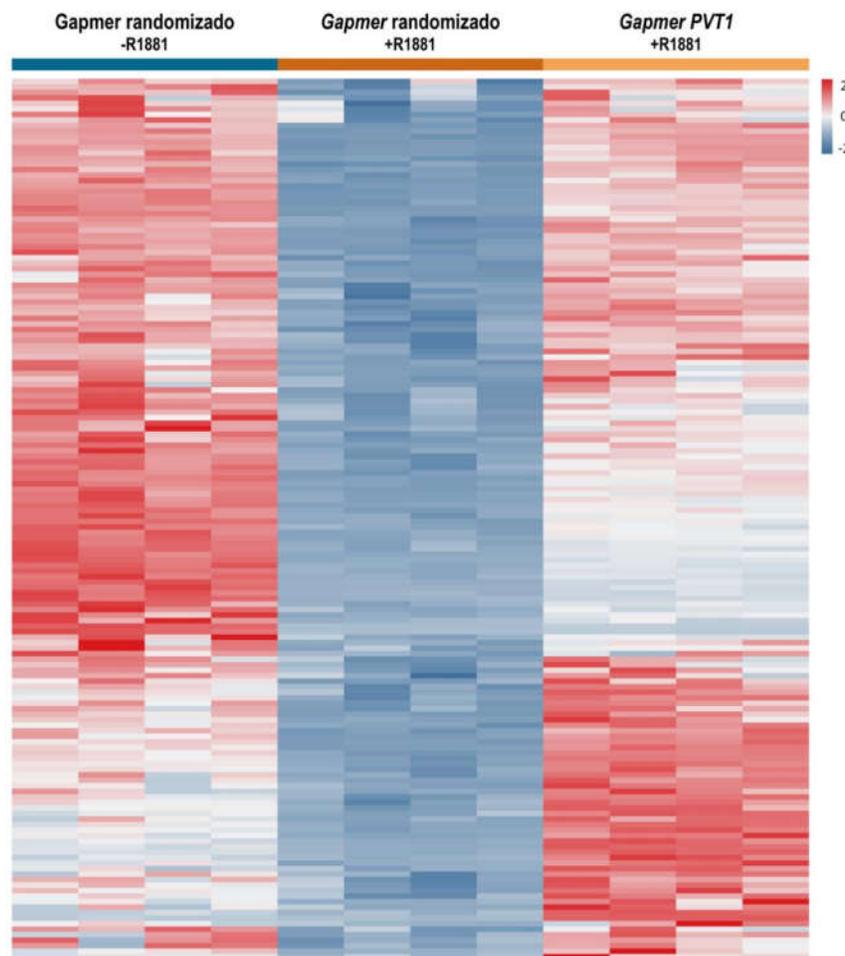


Figura 20: Genes com expressão aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* em células LNCaP na presença de andrógeno.

Cluster hierárquico mostrando que o silenciamento do lincRNA *PVT1* na presença de andrógeno (*gapmer PVT1*, +R1881 à direita) aumenta a expressão de genes que tem sua expressão inibida por andrógeno (*gapmer* randomizado, +R1881 ao centro). Cada uma das três condições de incubação das células LNCaP está descrita no topo da figura. As quatro réplicas de cada condição são apresentadas em 4 colunas e cada gene está mostrado em uma linha. São mostrados os 160 genes significativamente diferencialmente expressos ($q\text{-value} < 0,01$, $fold\text{-change} > 2^{+1}$ ou $fold\text{-change} < 2^{-1}$) encontrados na interseção das três condições de ensaio, conforme mostrado na comparação da Figura 19. Para cada gene foi calculado o z-score, que representa o número de desvios padrão acima (vermelho) ou abaixo (azul) da média de expressão de cada gene. A escala de cores está mostrada ao alto à direita e varia de z-score -2 (azul) até +2 (vermelho).

Vê-se na **Figura 20** que o silenciamento do lincRNA *PVT1* em células LNCaP resultou no aumento da expressão destes 160 genes, com um padrão de modificação da expressão que resultou no agrupamento dos genes em três conjuntos de diferentes. O primeiro grupo de genes (**Figura 20**, terço superior do *heatmap*) teve sua expressão totalmente restaurada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* na presença de andrógeno, até o nível de expressão que possuíam na ausência de andrógeno. O segundo grupo de genes (**Figura 20**, terço médio do *heatmap*) teve sua expressão aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* na presença de andrógeno, porém o aumento levou a uma restauração parcial do nível de expressão que possuíam na ausência de andrógeno. Por último, o terceiro grupo de genes (**Figura 20**, terço inferior do *heatmap*) teve sua expressão superativada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* na presença de andrógeno, levando a expressão até um nível mais alto do que possuíam na ausência de andrógeno.

A análise de enriquecimento de ontologias gênicas (GOs) dos 160 genes que tiveram sua expressão aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* em células LNCaP na presença de andrógeno (**Figura 21**) indicou o enriquecimento estatisticamente significativo de 21 GOs, entre esses, é importante destacar o enriquecimento de processos biológicos tais como “morte celular”, “regulação da morte celular” e “processo apoptótico”. Também estão enriquecidos os GOs de “regulação da comunicação celular” e “adesão celular em organismo único” (**Figura 21**). É importante notar que o aumento da expressão destes genes pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* indica que eles estariam com expressão reduzida nas células do câncer de próstata, em que há elevada expressão do lincRNA *PVT1*. A expressão diminuída de genes envolvidos com apoptose e com adesão celular em células que

expressam altos níveis de lincRNA *PVT1* favoreceria a proliferação e a malignidade do câncer de próstata.

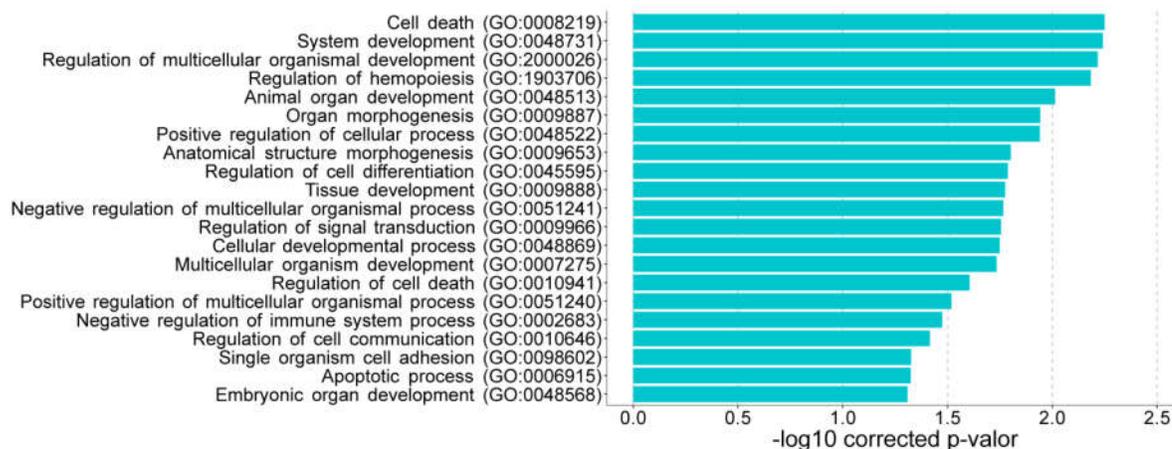


Figura 21: Ontologias gênicas (GOs) significativamente enriquecidas entre os 160 genes com expressão diminuída por andrógeno e aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* na presença de andrógeno.

O eixo x mostra o p-valor do teste estatístico de enriquecimento de cada ontologia gênica (GO), com a correção de Benjamini e Hochberg para testes múltiplos.

Destacamos, entre os genes que tiveram sua expressão aumentada após o silenciamento do lincRNA *PVT1*, os seguintes genes envolvidos com os processos de apoptose ou de adesão celular:

AJUBA: codifica uma proteína presente nos complexos adesivos de junção célula-célula. É conhecida por ser um regulador crucial de muitos processos celulares. Uma das funções importantes é fortalecer as junções célula-célula, ligando os receptores adesivos ao citoesqueleto de actina (Marie, Pratt et al. 2003, Langer, Feng et al. 2008, Nola, Daigaku et al. 2011). Jia, Gui et al. (2017) demonstraram que o AR regula e expressão de miR-193a-3p, que alveja *AJUBA*. Baixa expressão de *AJUBA* é observada em tumores metastáticos de

câncer de próstata e está correlacionada ao aumento da migração celular (Jia, Gui et al. 2017).

BMF: codifica uma proteína que contém um domínio de homologia BH3, que pertence à família de proteínas BCL2, exercendo a função pro-apotótica (Puthalakath, Villunger et al. 2001). Xu, Shimelis et al. (2009) reportaram a regulação da expressão de *BMF* por AR via ubiquitinação por RNF6.

DRAIC: este é o único lncRNA destacado em nossa lista. Já foi descrito que a sua expressão transcricional é inibida por AR e a análise funcional revelou que o silenciamento do *DRAIC* reprime a proliferação, migração e invasão celular em células LNCaP (Sakurai, Reon et al. 2015).

FAS: codifica uma proteína receptora da superfície celular que interage com o seu ligante natural FASL; ambos são membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) e FAS é responsável por iniciar a cascata de sinais de morte celular. A diminuição da expressão de *FAS* favorece a progressão maligna pela redução da apoptose. A proteína já foi descrita em câncer de próstata, incluindo células LNCaP e PC3 (Gao, Lee et al. 2005, Lima, Morais et al. 2008).

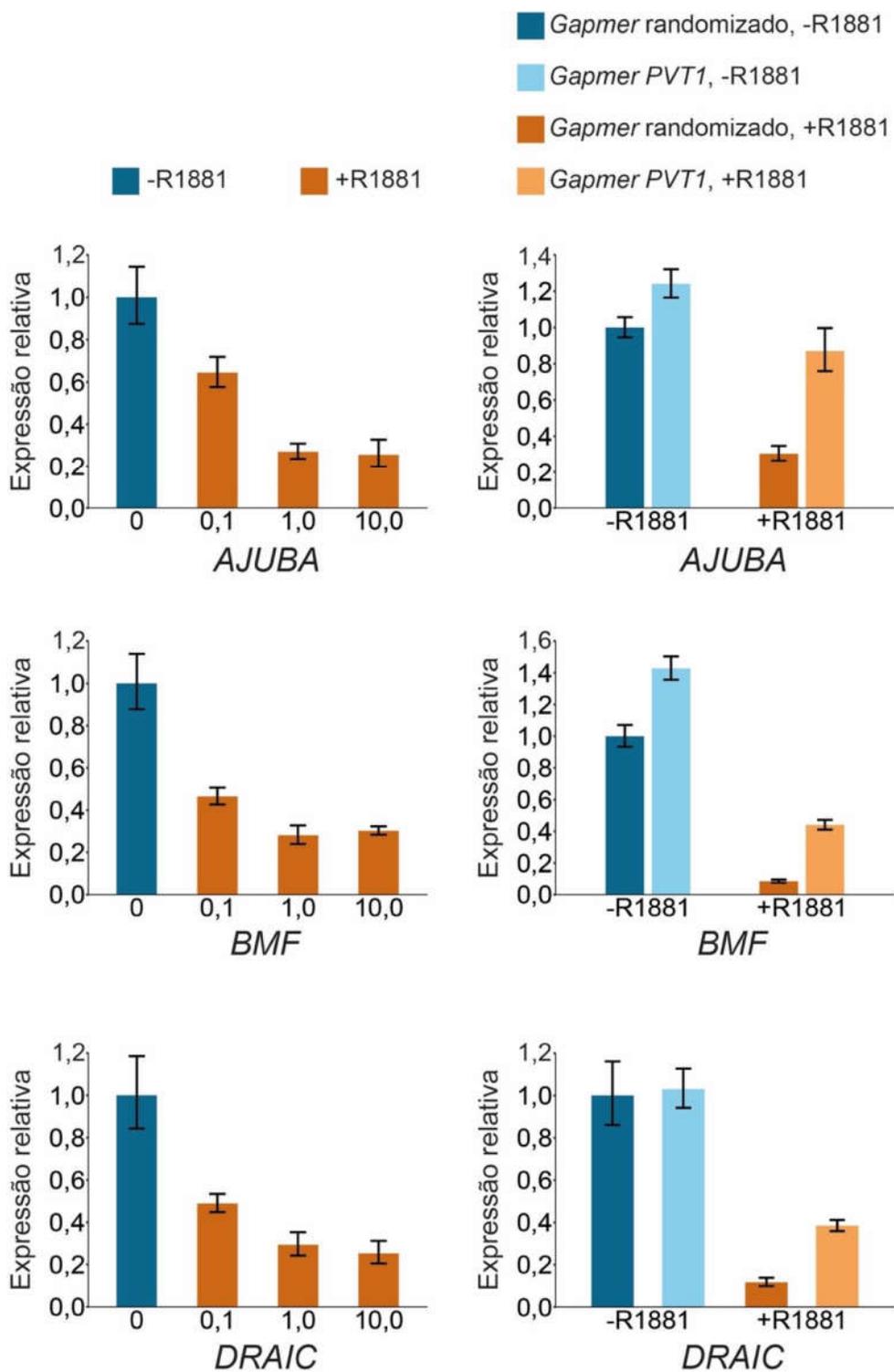
HRK: codifica uma proteína que regula a apoptose através da interação com proteínas repressoras da apoptose Bcl-2 e Bcl-XL. HRK é um importante componente na regulação da apoptose em células tumorais e a inativação de HRK leva a baixa atividade apoptótica, podendo ser relevante para a patogênese do câncer de próstata. A proteína já foi descrita em vários tipos de cânceres, incluindo o de próstata, e em células LNCaP (Nakamura, Shimada et al. 2008, Young, Garden et al. 2009).

IFIT2: a expressão de *IFIT2* também pode desencadear a morte celular através de uma via mitocondrial dependente de BCL2. A proteína já foi descrita em câncer gástrico e hepatocelular (Chen, Zhai et al. 2018, Kim, Lee et al. 2018).

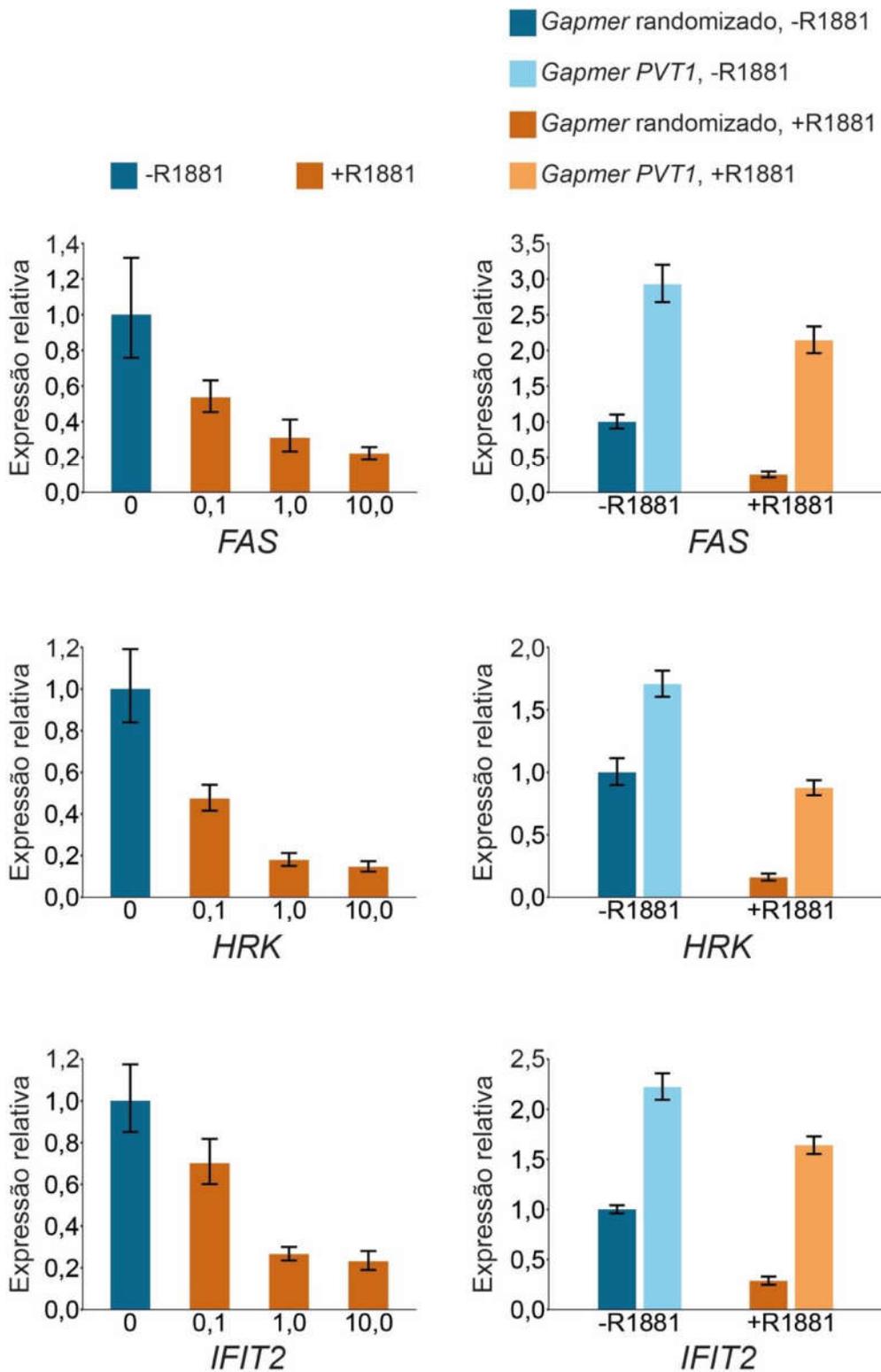
TNFRSF21: membro da superfamília do receptor de fator de necrose tumoral, mais um gene ativador de apoptose. Esse gene já foi descrito em câncer de bexiga (Pei, Mao et al. 2017).

NOV: codifica uma proteína secretada no espaço entre as células na matriz extracelular e é um gene supressor de tumor capaz de regular as integrinas para aumentar a adesão celular à matriz extracelular. *NOV* já foi descrito em vários tipos de cânceres, incluindo câncer de próstata (Zuo, Kohls et al. 2010, Wu, Runkle et al. 2014, Yeger and Perbal 2016).

A restauração da expressão de todos os genes acima citados causada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* na presença do andrógeno foi confirmada por RT-qPCR (**Figura 22**, painéis da direita). Esse dado está de acordo com a hipótese de que o *PVT1* está agindo na célula para inibir esses genes em conjunto com o AR. Como todos são genes supressores de tumor, seja ativando a via de apoptose ou promovendo a adesão celular, os dados estão de acordo com dados da literatura, que apontam o lincRNA *PVT1* como um oncogene. Além disso, a inibição da expressão desses mesmos genes pelo aumento da concentração de andrógeno na faixa de 0,1 até 10,0 nM também foi mensurada por RT-qPCR e confirmada (**Figura 22**, painéis da esquerda), atestando a inibição da expressão desses genes pelo AR em células LNCaP.



[Figura 22, parte 1: ver legenda na página 83]



[Figura 22, parte 2: ver legenda na página 83]

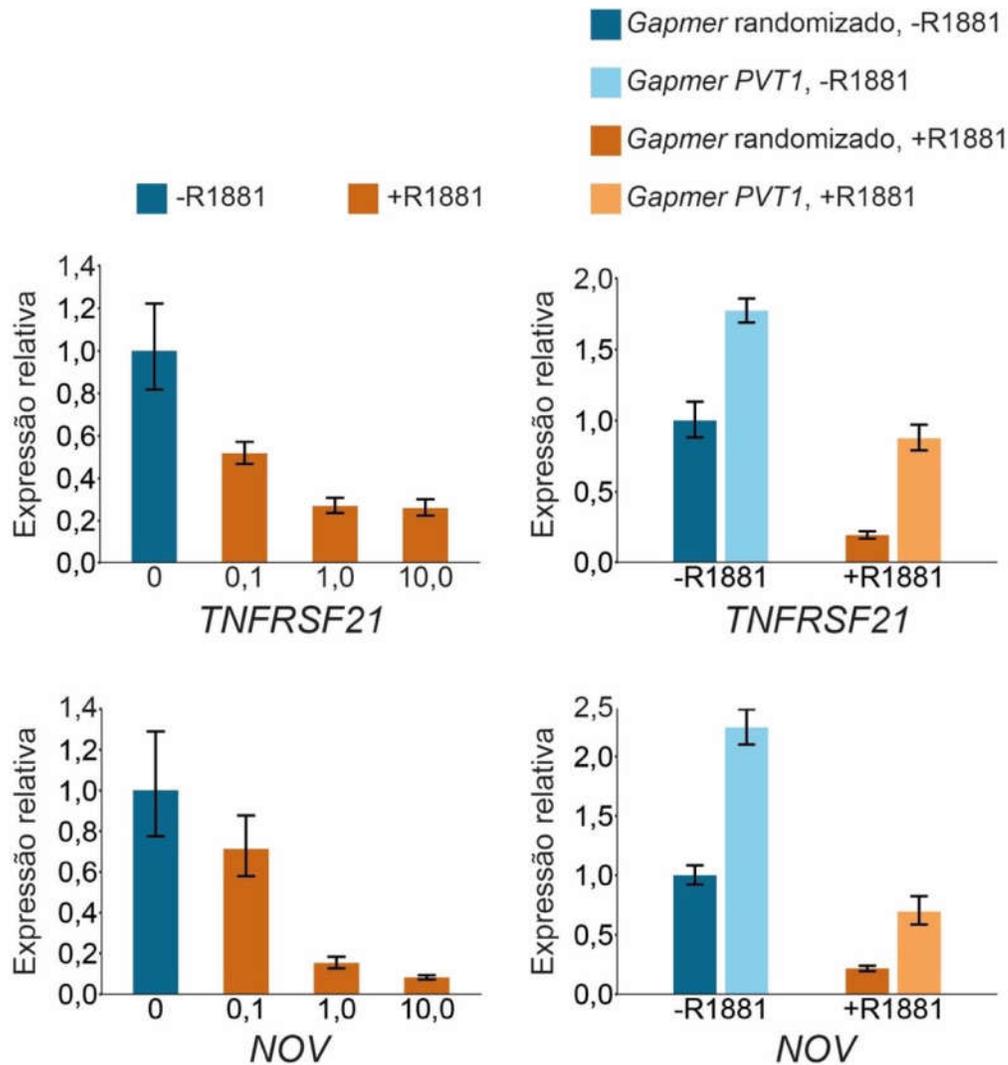


Figura 22: Validação por RT-qPCR de genes em células LNCaP que apresentam inibição da transcrição por andrógeno de forma dose dependente (lado esquerdo) e validação do aumento da expressão após o silenciamento do lincRNA *PVT1* (lado direito).

RT-qPCR dos genes descritos no texto e indicados no eixo x, confirmando a inibição de sua expressão por andrógeno na faixa de 0,1 a 10,0 nM (lado esquerdo) e o efeito do silenciamento do lincRNA *PVT1* sobre a expressão de cada gene (lado direito), mostrando que o silenciamento pode restaurar parcialmente, restaurar totalmente ou até superativar a expressão desses genes. Para os experimentos de inibição da transcrição por dose-dependência (lado esquerdo), ou do efeito do silenciamento do lincRNA *PVT1* sobre os genes descritos acima (lado direito), a expressão dos genes alvo foi normalizada pela média geométrica da expressão dos genes *GAPDH* e *ACTB*, usados como genes de referência endógenos invariantes. A expressão relativa mostrada no eixo Y refere-se à segunda normalização dos dados do qPCR, que foi realizada usando-se o valor médio da expressão de cada transcrito entre as réplicas da amostra na ausência de andrógeno (azul escuro), tomada como expressão unitária. Dados mostram a média \pm s.e.m. de três réplicas biológicas nos experimentos de dependência da dose de R1881, lado esquerdo; dados mostram a média \pm s.e.m. de quatro réplicas biológicas nos experimentos de silenciamento do lincRNA *PVT1*, lado direito.

Em paralelo medimos por RT-qPCR o nível de expressão do mRNA codificador do receptor de andrógeno (*AR*), e dos mRNAs codificadores dos genes *EZH2* e *SUZ12* do complexo repressor polycomb 2 (*PRC2*), nas células LNCaP submetidas ao silenciamento do lincRNA *PVT1* na ausência (-R1881) e na presença (+R1881) do andrógeno (**Figura 23**). Observamos que apenas a isoforma 2 do *AR* mostrou uma redução significativa de 30 % no nível de expressão em células LNCaP após o silenciamento do lincRNA *PVT1* na presença de andrógeno (**Figura 23**).

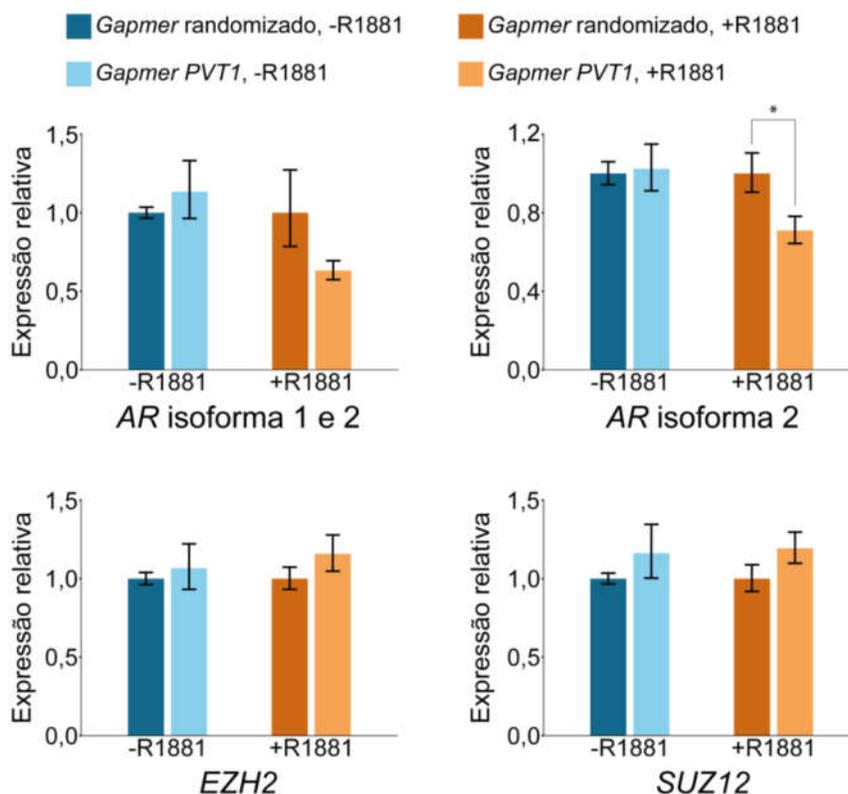


Figura 23: Expressão relativa dos genes AR, EZH2 e SUZ12 medida por RT-qPCR em células LNCaP após o silenciamento do lincRNA PVT1.

RT-qPCR dos genes envolvidos na hipótese do mecanismo de ação do lincRNA *PVT1*, testada neste trabalho, confirmando a ausência de efeito direto do silenciamento do lincRNA *PVT1* sobre a expressão destes genes. A expressão dos genes alvo foi normalizada pela média geométrica da expressão dos genes *GAPDH* e *ACTB*, usados como genes de referência endógenos invariantes. A expressão relativa mostrada no eixo Y refere-se à segunda normalização dos dados do qPCR, que foi realizada usando-se o valor médio da expressão da condição *gapmer* randomizado (controle negativo) em cada experimento na condição suplementada com (+R1881) ou desprovida de (-R1881) andrógeno. Dados mostram a média \pm s.e.m de quatro réplicas biológicas.

Há na literatura diversos trabalhos reportando, em vários tipos de câncer, a superexpressão e mecanismos moleculares em que o lincRNA *PVT1* está envolvido, incluindo: câncer de pulmão de pequenas células (CPCNP) (Yang, Zang et al. 2014, Wan, Sun et al. 2016), câncer do colo do útero (Zhang, Zhang et al. 2016, Gao, Zhao et al. 2017), carcinoma colorretal (Takahashi, Sawada et al. 2014), glioma (Zhang, Yang et al. 2019), câncer de ovário (Liu, Liu et al. 2015, Chen, Du et al. 2018), câncer gástrico (Cao, Wu et al. 2013, Yuan, Li et al. 2016, Zhao, Du et al. 2018), câncer de mama (Guan, Kuo et al. 2007,

Zhang, Zhu et al. 2014, Tang, Li et al. 2018), carcinoma hepatocelular (HCC) (Ding, Yang et al. 2015, Yan, Yang et al. 2015), carcinoma de células renais (Wu, Wang et al. 2016), câncer de bexiga (Tian, Cao et al. 2019), leucemia promielocítica aguda (Zeng, Yu et al. 2015), e câncer de tireoide (Zhou, Chen et al. 2016).

Dados da literatura reportaram a superexpressão do lincRNA *PVT1* em células de câncer de próstata e apontaram que o lincRNA *PVT1* pode ser um potencial biomarcador para câncer de próstata (Bawa, Zackaria et al. 2015, Ilboudo, Chouhan et al. 2015, Yang, Li et al. 2017).

Wan, Wu et al. (2018) observaram que o silenciamento da expressão do lincRNA *PVT1* inibiu a proliferação e a mobilidade de células de câncer de próstata *in vitro*, por meio da redução da fosforilação da p38, que é identificada como uma molécula associada à mitose, à modulação da proliferação e à migração de células cancerígenas (Bradham and McClay 2006, Xia, Zhang et al. 2015, Cheng, Gao et al. 2016).

Yang, Li et al. (2017) descreveram a superexpressão do lincRNA *PVT1* em células tumorais de próstata e a associaram ao estágio avançado do câncer em PCa. Além disso, descreveram o efeito do lincRNA *PVT1* sobre a apoptose, por meio do silenciamento do lincRNA *PVT1* e a subsequente ativação das caspases 3 e 9, resultando no aumento da morte celular. No entanto, os mecanismos de ativação das caspases ainda não estão completamente descritos (Yang, Li et al. 2017).

O receptor de andrógeno é amplamente descrito como fator de transcrição de ativação de genes específicos da próstata. No entanto, análises de larga escala relacionadas à expressão de genes e a ocupação física do AR ao longo do DNA genômico (*binding site*)

revelaram o AR agindo também como fator de transcrição inibidor de genes. Essa inibição é mediada por elementos responsivos a andrógeno (ARE) e articulada por EZH2, de tal modo a remodelar a cromatina, deixando-a mais compacta, e conseqüentemente impedindo a interação de fatores de transcrição de ativação com a molécula de DNA (Zhao, Yu et al. 2012). Os genes alvos dessa interação estão envolvidos na diferenciação celular e na supressão tumoral, como nós também pudemos observar em nossos dados (**Figura 21**).

Wu, Runkle et al. (2014) reportaram a inibição da transcrição do gene *NOV* por AR. O AR ocupa o *enhancer* do gene *NOV*, uma região genômica intergênica que fica 63 kilobases acima do início da transcrição do gene, e promove um *looping* de DNA, aproximando o *enhancer* da região promotora do gene *NOV*, no sítio de início da transcrição (Wu, Runkle et al. 2014). Então, AR recruta a enzima metiltransferase modificadora de histonas EZH2, proteína pertencente ao complexo repressor Polycomb 2 (PRC2), que catalisa subsequentemente a trimetilação da histona H3 na lisina 27 em torno do promotor de *NOV*, levando a inibição da expressão via silenciamento epigenético (Wu, Runkle et al. 2014).

Após observar a interação física do lincRNA *PVT1* ao AR e a EZH2 (**Figuras 9 e 10**), o efeito do silenciamento do lincRNA *PVT1* sobre a expressão do gene *NOV* (**Figura 22**) e verificar na literatura a inibição da expressão do gene *NOV* através da interação do AR com a EZH2, eu decidi realizar CHIP-qPCR nos sítios descritos por Wu, Runkle et al. (2014) na tentativa de entender o mecanismo pelo qual o lincRNA *PVT1* inibe a transcrição do gene *NOV*.

4.3. CHIP-qPCR para mapeamento das marcas epigenéticas presentes na região promotora de um gene regulado pelo silenciamento de *PVT1*

É intrigante a função diametralmente oposta do AR em ser capaz de ativar ou inibir a transcrição gênica. Já foi demonstrado que o AR e a EZH2 podem agir cooperativamente para remodelar a cromatina e inibir a transcrição (Zhao, Yu et al. 2012), e nossos dados apontam que o lincRNA *PVT1* participa deste programa de regulação em células LNCaP, contribuindo para a diminuição da transcrição de um conjunto de genes na presença de andrógeno. Portanto, decidimos perguntar se a presença ou ausência do lincRNA *PVT1* afetaria a ocupação pelo AR e pela EZH2 da região promotora de algum gene cuja expressão é diminuída pelo andrógeno.

Para responder esta pergunta, escolhi o gene *NOV* para medir por CHIP-qPCR a presença do AR, do EZH2 e da Pol II, além das marcas de histona H3K4me3, H3K27Ac e H3K27me3 no DNA genômico na região do promotor e do *enhancer* do gene *NOV* sob estímulo de andrógeno. Escolhi esse gene, pois já descrito que a expressão de *NOV* em câncer de próstata é diretamente inibida pelo receptor de andrógeno (AR) e pela EZH2 (Wu, Runkle et al. 2014), e este é um dos genes cuja expressão é aumentada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* (**Figura 22**).

A análise do CHIP-qPCR (**Figura 24**) revela que após o silenciamento do lincRNA *PVT1* ocorreu o enriquecimento da marca de histona H3K27Ac no promotor do gene *NOV* ($p < 0,05$) (**Figura 24B**), situado no sítio de início da transcrição (TSS) do gene. A marca de histona H3K27Ac é associada com maior ativação da transcrição gênica, localizando-se principalmente nas regiões em torno do TSS dos genes humanos (Wang, Zang et al. 2008). O

aumento da marca H3K27Ac, está de acordo com a ativação da transcrição de *NOV* que ocorre quando o lincRNA *PVT1* é silenciado (**Figura 22**).

Após o silenciamento do lincRNA *PVT1* também ocorreu o enriquecimento significativo da marca de histona H3K27me3, que é associada com uma inibição da transcrição gênica, na região de *enhancer* do gene *NOV* (**Figura 24A**), indicando que houve uma remodelação mais complexa do *locus*.

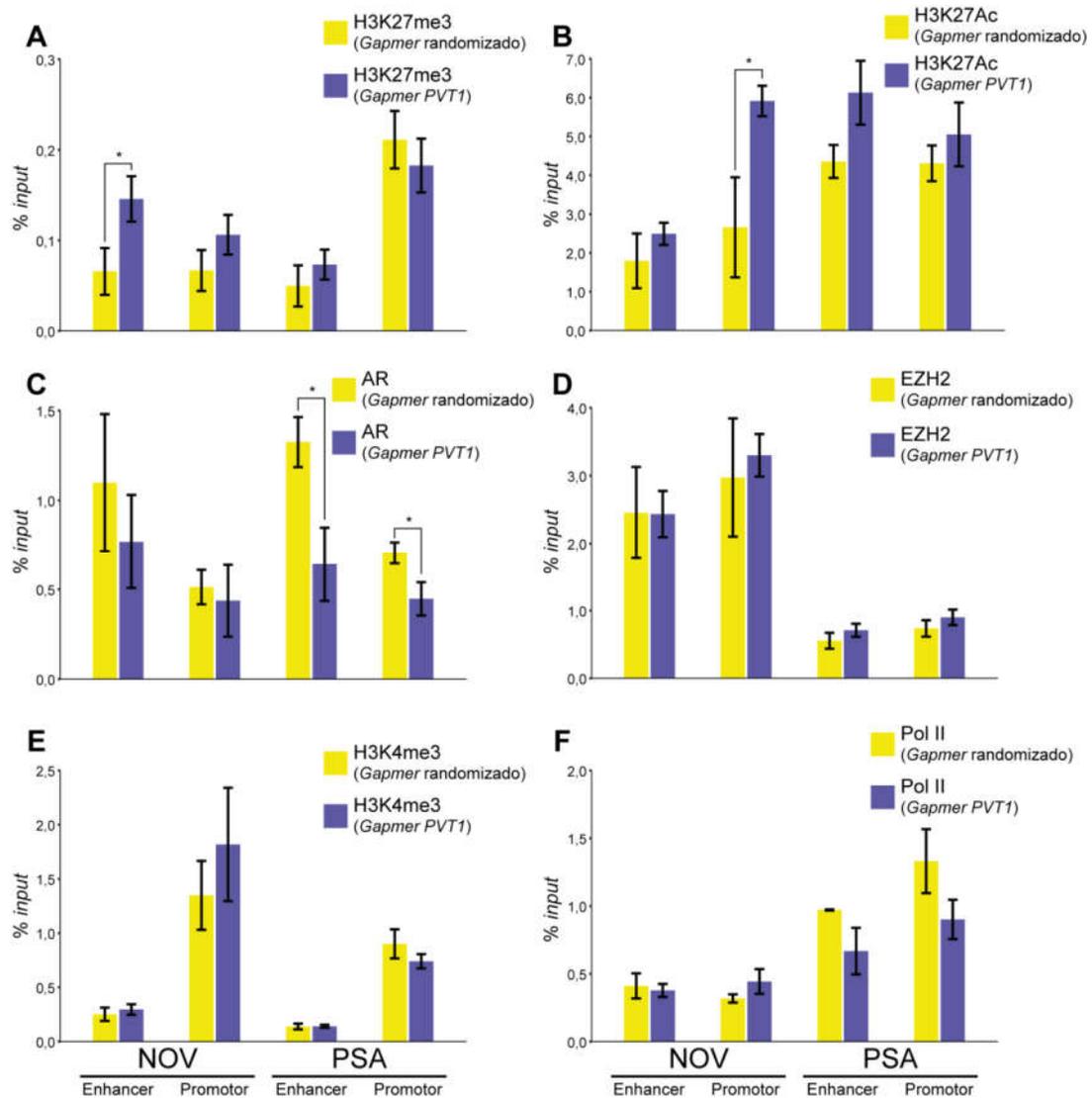


Figura 24: Grau de ocupação do promotor e do *enhancer* do gene *NOV* por diferentes marcas de histona em células LNCaP suplementadas com andrógeno, com e sem silenciamento do lincRNA *PVT1*.

Ocupação das regiões genômicas de *enhancer* e promotor do gene *NOV* e do gene controle positivo *PSA*, medidas por ChIP-qPCR, conforme indicado nas legendas abaixo do eixo-x dos painéis (E) e (F). Células LNCaP em cultura suplementadas com andrógeno foram submetidas ao silenciamento do lincRNA *PVT1* (gapmer *PVT1*, barras azuis), ou tratadas com gapmer randomizado (controle negativo, barras amarelas). Em seguida, foi produzido o *crosslinking* das proteínas ligadas ao DNA genômico, as células foram lisadas, o DNA foi fragmentado por sonicação, e alíquotas diferentes dessas amostras foram incubadas com anticorpos contra (A) H3K27me3, (B) H3K27Ac, (C) receptor de andrógeno (AR), (D) potenciador de Zeste homólogo 2 (EZH2), (E) H3K4me3, e (F) polimerase II (Pol II). O complexo anticorpo-proteína-DNA foi precipitado, o DNA co-precipitado foi purificado e submetido a qPCR com *primers* específicos para as regiões de *enhancer* e promotor do gene *NOV* e do gene controle positivo *PSA* (Wu, Runkle et al. 2014). Os gráficos mostram o “% input, que corresponde ao enriquecimento do DNA na amostra imunoprecipitada em relação ao DNA presente na amostra usada como *input*, antes da imunoprecipitação. (*) denota $p < 0,05$ entre as amostras indicadas; teste-t de Student foi utilizado.

Não houve mudança estatisticamente significativa no nível de ocupação por AR e por EZH2 do *enhancer* e do promotor do gene *NOV* (**Figuras 24C e 24D**) com o silenciamento do lincRNA *PVT1*. Estes dados sugerem que o lincRNA *PVT1* não teria um papel direto no recrutamento de EZH2, mas de alguma forma ele modularia a ação de EZH2 no *locus*. Curiosamente, já foi descrito que EZH2 tem também uma função independente do PRC2, e pode atuar como um coativador para fatores de transcrição críticos, incluindo o AR no câncer de próstata resistente à castração (Xu, Wu et al. 2012). Recentemente, Kim, Lee et al. (2018) relataram EZH2 como um ativador transcricional que induz expressão gênica de uma maneira independente de PRC2 e metilação; o ambiente da cromatina local dita o duplo papel de EZH2 como um ativador ou repressor, e foi mostrado que o papel ativador da transcrição de EZH2 é dependente da presença da marca H2K27ac no promotor do gene (Kim, Lee et al. 2018). Portanto, a ocupação persistente de EZH2 no promotor de *NOV* na condição de silenciamento de *PVT1* (**Figura 24D**), na presença de uma ocupação aumentada de H3K27ac nesta região (**Figura 24B**), sugere que a ativação da transcrição de *NOV*, que ocorreu quando *PVT1* foi silenciado (**Figura 22**), poderia ser mediada pelo papel ativador da transcrição de EZH2. A ligação de EZH2 no promotor poderia recrutar coativadores transcricionais adicionais, tais como SP1 ou KLF5 para induzir a expressão gênica, como sugerido por Kim, Lee et al. (2018). Nota-se também que não houve mudança estatisticamente significativa no nível de ocupação por H3K4me3 e por Pol II (**Figuras 24E e 24F**) das regiões do *enhancer* e do promotor de *NOV* ou *PSA* após o silenciamento de *PVT1*, o que indica que a identificação de coativadores transcricionais adicionais eventualmente recrutados para este *locus* será uma linha interessante para investigação futura.

Wu, Runkle et al. (2014) descreveram o aumento do enriquecimento em relação ao *input* da marca de H3K27me3 no promotor do gene *NOV* quando as células LNCaP foram suplementadas com andrógeno em comparação com desprovidas de andrógeno. O mesmo ocorreu com a presença da marca de EZH2 (Wu, Runkle et al. 2014).

Deve-se notar que houve mudança significativa ($p < 0,05$) na ocupação por AR do *enhancer* e do promotor do gene *PSA*, usado aqui como um gene controle não relacionado; esta redução pode ser devida à diminuição da expressão do AR, que ocorreu com o silenciamento do lincRNA *PVT1* (**Figura 23**). Apesar dessa diminuição da ocupação por AR na região do promotor do gene *PSA*, não detectamos no ensaio de microarranjos nenhuma mudança significativa da expressão do gene *PSA* com o silenciamento do lincRNA *PVT1*.

5. Conclusões

Mostramos que o lincRNA *PVT1* está associado ao receptor de andrógeno (AR) e à EZH2 em células LNCaP de câncer de próstata, o que sugere sua ação na regulação da expressão gênica, por meio do complexo AR-EZH2-*PVT1*, de uma fração de genes sensíveis ao silenciamento da expressão do lincRNA *PVT1*. Além disso, observamos que não há diferença estatística entre a associação do lincRNA *PVT1* e AR ou EZH2 em ambas as condições suplementada com e desprovida de R1881, o que permite concluir que uma fração do lincRNA *PVT1* se liga ao AR e ao complexo repressor Polycomb 2 independentemente do hormônio andrógeno.

O silenciamento do lincRNA *PVT1* foi capaz de restaurar a expressão parcialmente, totalmente ou causar a superexpressão de genes que tiveram a expressão inibida por AR quando as células foram tratadas com andrógeno. Dentre esses genes, cabe destacar os genes pró apoptóticos (*BMF*, *FAS*, *HRK*, *IFIT2* e *TNFRSF21*) e genes associados à modulação da interação celular (*AJUBA*, *DRAIC* e *NOV*), o que sugere uma importante função do lincRNA *PVT1* no desenvolvimento e migração do câncer de próstata.

Embora seja tentador propor que o lincRNA *PVT1* atue na modulação da ação do complexo PRC2 por meio da ativação da enzima metiltransferase EZH2, no sentido de favorecer a deposição de marcas de inibição da transcrição nas histonas, os nossos resultados de CHIP-qPCR não foram conclusivos, e experimentos adicionais ainda são necessários para elucidar os mecanismos de ação do lincRNA *PVT1* no processo de diminuição da transcrição de genes em células LNCaP de câncer de próstata.

Finalmente, produzimos evidências de que o lincRNA *PVT1* coopera com AR e EZH2 na repressão de genes. Dessa forma, o lincRNA *PVT1* é mais um fator no complexo mecanismo de regulação da expressão gênica via modulação da cromatina. Os mecanismos moleculares que determinam o direcionamento do complexo AR-EZH2-*PVT1* para as regiões genômicas promotoras e *enhancers* do conjunto específico de genes que identificamos como regulados em LNCaP ainda necessitam de mais estudos para serem identificados.

A espectroscopia de massas (MS) é uma ferramenta útil para identificar os prováveis fatores de transcrição que devem fazer parte do complexo regulador, e que determinam o programa de inibição de um conjunto específico de genes. A captura da cromatina na região do promotor e *enhancer* dos genes, e a caracterização por MS das proteínas presentes no complexo, em *loci* de genes inibidos pelo lincRNA *PVT1* e em *loci* de genes não afetados pelo lincRNA *PVT1*, poderá elucidar os componentes destes complexos reguladores.

O esclarecimento das redes regulatórias entre lincRNAs, fatores de transcrição e marcas epigenéticas permitirá uma melhor compreensão da interação entre as alterações genéticas e epigenéticas no câncer e, acima de tudo, produzirá novas estratégias para a intervenção terapêutica.

Referências

Aires, M. d. M. (2015). Fisiologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Al Olama, A. A., Z. Kote-Jarai, G. G. Giles, M. Guy, J. Morrison, G. Severi, D. A. Leongamornlert, M. Tymrakiewicz, S. Jhavar, E. Saunders, J. L. Hopper, M. C. Southey, K. R. Muir, D. R. English, D. P. Dearnaley, A. T. Ardern-Jones, A. L. Hall, L. T. O'Brien, R. A. Wilkinson, E. Sawyer, A. Lophatananon, U. K. G. P. C. S. C. B. A. o. U. S. S. o. Oncology, U. K. P. t. f. cancer, C. Treatment study, A. Horwich, R. A. Huddart, V. S. Khoo, C. C. Parker, C. J. Woodhouse, A. Thompson, T. Christmas, C. Ogden, C. Cooper, J. L. Donovan, F. C. Hamdy, D. E. Neal, R. A. Eeles and D. F. Easton (2009). "Multiple loci on 8q24 associated with prostate cancer susceptibility." Nat Genet **41**(10): 1058-1060.

Amirghofran, Z., A. Monabati and N. Gholijani (2004). "Androgen receptor expression in relation to apoptosis and the expression of cell cycle related proteins in prostate cancer." Pathology & Oncology Research **10**(1): 37-41.

Balas, M. M. and A. M. Johnson (2018). "Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer." Noncoding RNA Res **3**(3): 108-117.

Balk, S. P. (2002). "Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer." Urology **60**(3 Suppl 1): 132-138; discussion 138-139.

Balk, S. P. and K. E. Knudsen (2008). "AR, the cell cycle, and prostate cancer." Nucl Recept Signal **6**: e001.

Balk, S. P., Y. J. Ko and G. J. Bubley (2003). "Biology of prostate-specific antigen." J Clin Oncol **21**(2): 383-391.

Barsotti, A. M., R. Beckerman, O. Laptenko, K. Huppi, N. J. Caplen and C. Prives (2012). "p53-Dependent induction of PVT1 and miR-1204." J Biol Chem **287**(4): 2509-2519.

Bawa, P., S. Zackaria, M. Verma, S. Gupta, R. Srivatsan, B. Chaudhary and S. Srinivasan (2015). "Integrative Analysis of Normal Long Intergenic Non-Coding RNAs in Prostate Cancer." PLoS One **10**(5): e0122143.

Beckedorff, F. C., M. S. Amaral, C. Deocesano-Pereira and S. Verjovski-Almeida (2013). "Long non-coding RNAs and their implications in cancer epigenetics." Biosci Rep **33**(4).

Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology **57**(1): 289-300.

Bolstad, B. M., R. A. Irizarry, M. Astrand and T. P. Speed (2003). "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias." Bioinformatics **19**(2): 185-193.

Bradham, C. and D. R. McClay (2006). "p38 MAPK in development and cancer." Cell Cycle **5**(8): 824-828.

Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin **68**(6): 394-424.

Cai, C., H. H. He, S. Chen, I. Coleman, H. Wang, Z. Fang, S. Chen, P. S. Nelson, X. S. Liu, M. Brown and S. P. Balk (2011). "Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1." Cancer Cell **20**(4): 457-471.

Cai, M., S. Kim, K. Wang, P. J. Farnham, G. A. Coetzee and W. Lu (2016). "4C-seq revealed long-range interactions of a functional enhancer at the 8q24 prostate cancer risk locus." Sci Rep **6**: 22462.

Cao, W. J., H. L. Wu, B. S. He, Y. S. Zhang and Z. Y. Zhang (2013). "Analysis of long non-coding RNA expression profiles in gastric cancer." World J Gastroenterol **19**(23): 3658-3664.

Caspersson, T. and J. Schultz (1939). "Pentose nucleotides in the cytoplasm of growing tissues." Nature **143**: 602-603.

Chang, Z., J. Cui and Y. Song (2018). "Long noncoding RNA PVT1 promotes EMT via mediating microRNA-186 targeting of Twist1 in prostate cancer." Gene **654**: 36-42.

Chapman, M. H., R. Tidswell, J. S. Dooley, N. S. Sandanayake, V. Cerec, M. Deheragoda, A. J. Lee, C. Swanton, F. Andreola and S. P. Pereira (2012). "Whole genome RNA expression profiling of endoscopic biliary brushings provides data suitable for biomarker discovery in cholangiocarcinoma." J Hepatol **56**(4): 877-885.

Cheetham, S. W., F. Gruhl, J. S. Mattick and M. E. Dinger (2013). "Long noncoding RNAs and the genetics of cancer." Br J Cancer **108**(12): 2419-2425.

Chen, L., W. Zhai, X. Zheng, Q. Xie, Q. Zhou, M. Tao, Y. Zhu, C. Wu and J. Jiang (2018). "Decreased IFIT2 Expression Promotes Gastric Cancer Progression and Predicts Poor Prognosis of the Patients." Cell Physiol Biochem **45**(1): 15-25.

Chen, Y., H. Du, L. Bao and W. Liu (2018). "LncRNA PVT1 promotes ovarian cancer progression by silencing miR-214." Cancer Biol Med **15**(3): 238-250.

Cheng, G., F. Gao, X. Sun, H. Bi and Y. Zhu (2016). "Paris saponin VII suppresses osteosarcoma cell migration and invasion by inhibiting MMP2/9 production via the p38 MAPK signaling pathway." Mol Med Rep **14**(4): 3199-3205.

Cho, S. W., J. Xu, R. Sun, M. R. Mumbach, A. C. Carter, Y. G. Chen, K. E. Yost, J. Kim, J. He, S. A. Nevins, S. F. Chin, C. Caldas, S. J. Liu, M. A. Horlbeck, D. A. Lim, J. S. Weissman, C. Curtis and H. Y. Chang (2018). "Promoter of lncRNA Gene PVT1 Is a Tumor-Suppressor DNA Boundary Element." Cell **173**(6): 1398-1412 e1322.

Consortium, E. P. (2012). "An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome." *Nature* **489**(7414): 57-74.

Consortium, E. P., E. Birney, J. A. Stamatoyannopoulos, A. Dutta, R. Guigo, T. R. Gingeras, E. H. Margulies, Z. Weng, M. Snyder, E. T. Dermitzakis, R. E. Thurman, M. S. Kuehn, C. M. Taylor, S. Neph, C. M. Koch, S. Asthana, A. Malhotra, I. Adzhubei, J. A. Greenbaum, R. M. Andrews, P. Flicek, P. J. Boyle, H. Cao, N. P. Carter, G. K. Clelland, S. Davis, N. Day, P. Dhami, S. C. Dillon, M. O. Dorschner, H. Fiegler, P. G. Giresi, J. Goldy, M. Hawrylycz, A. Haydock, R. Humbert, K. D. James, B. E. Johnson, E. M. Johnson, T. T. Frum, E. R. Rosenzweig, N. Karnani, K. Lee, G. C. Lefebvre, P. A. Navas, F. Neri, S. C. Parker, P. J. Sabo, R. Sandstrom, A. Shafer, D. Vetric, M. Weaver, S. Wilcox, M. Yu, F. S. Collins, J. Dekker, J. D. Lieb, T. D. Tullius, G. E. Crawford, S. Sunyaev, W. S. Noble, I. Dunham, F. Denoeud, A. Reymond, P. Kapranov, J. Rozowsky, D. Zheng, R. Castelo, A. Frankish, J. Harrow, S. Ghosh, A. Sandelin, I. L. Hofacker, R. Baertsch, D. Keefe, S. Dike, J. Cheng, H. A. Hirsch, E. A. Sekinger, J. Lagarde, J. F. Abril, A. Shahab, C. Flamm, C. Fried, J. Hackermuller, J. Hertel, M. Lindemeyer, K. Missal, A. Tanzer, S. Washietl, J. Korb, O. Emanuelsson, J. S. Pedersen, N. Holroyd, R. Taylor, D. Swarbreck, N. Matthews, M. C. Dickson, D. J. Thomas, M. T. Weirauch, J. Gilbert, J. Drenkow, I. Bell, X. Zhao, K. G. Srinivasan, W. K. Sung, H. S. Ooi, K. P. Chiu, S. Foissac, T. Alioto, M. Brent, L. Pachter, M. L. Tress, A. Valencia, S. W. Choo, C. Y. Choo, C. Ucla, C. Manzano, C. Wyss, E. Cheung, T. G. Clark, J. B. Brown, M. Ganesh, S. Patel, H. Tammana, J. Chrast, C. N. Henrichsen, C. Kai, J. Kawai, U. Nagalakshmi, J. Wu, Z. Lian, J. Lian, P. Newburger, X. Zhang, P. Bickel, J. S. Mattick, P. Carninci, Y. Hayashizaki, S. Weissman, T. Hubbard, R. M. Myers, J. Rogers, P. F. Stadler, T. M. Lowe, C. L. Wei, Y. Ruan, K. Struhl, M. Gerstein, S. E. Antonarakis, Y. Fu, E. D. Green, U. Karaoz, A. Siepel, J. Taylor, L. A. Liefer, K. A. Wetterstrand, P. J. Good, E. A. Feingold, M. S. Guyer, G. M. Cooper, G. Asimenos, C. N. Dewey, M. Hou, S. Nikolaev, J. I. Montoya-Burgos, A. Loytynoja, S. Whelan, F. Pardi, T. Massingham, H. Huang, N. R. Zhang, I. Holmes, J. C. Mullikin, A. Ureta-Vidal, B. Paten, M. Seringhaus, D. Church, K. Rosenbloom, W. J. Kent, E. A. Stone, N. C. S. Program, C. Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing, C. Washington University Genome Sequencing, I. Broad, I. Children's Hospital Oakland Research, S. Batzoglou, N. Goldman, R. C. Hardison, D. Haussler, W. Miller, A. Sidow, N. D. Trinklein, Z. D. Zhang, L. Barrera, R. Stuart, D. C. King, A. Ameur, S. Enroth, M. C. Bieda, J. Kim, A. A. Bhinge, N. Jiang, J. Liu, F. Yao, V. B. Vega, C. W. Lee, P. Ng, A. Shahab, A. Yang, Z. Moqtaderi, Z. Zhu, X. Xu, S. Squazzo, M. J. Oberley, D. Inman, M. A. Singer, T. A. Richmond, K. J. Munn, A. Rada-Iglesias, O. Wallerman, J. Komorowski, J. C. Fowler, P. Couttet, A. W. Bruce, O. M. Dovey, P. D. Ellis, C. F. Langford, D. A. Nix, G. Euskirchen, S. Hartman, A. E. Urban, P. Kraus, S. Van Calcar, N. Heintzman, T. H. Kim, K. Wang, C. Qu, G. Hon, R. Luna, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, S. F. Aldred, S. J. Cooper, A. Halees, J. M. Lin, H. P. Shulha, X. Zhang, M. Xu, J. N. Haidar, Y. Yu, Y. Ruan, V. R. Iyer, R. D. Green, C. Wadelius, P. J. Farnham, B. Ren, R. A. Harte, A. S. Hinrichs, H. Trumbower, H. Clawson, J. Hillman-Jackson, A. S. Zweig, K. Smith, A. Thakkapallayil, G. Barber, R. M. Kuhn, D. Karolchik, L. Armengol, C. P. Bird, P. I. de Bakker, A. D. Kern, N. Lopez-Bigas, J. D. Martin, B. E. Stranger, A. Woodroffe, E. Davydov, A. Dimas, E. Eyas, I. B. Hallgrimsdottir, J. Huppert, M. C. Zody, G. R. Abecasis, X. Estivill, G. G. Bouffard, X. Guan, N. F. Hansen, J. R. Idol, V. V. Maduro, B. Maskeri, J. C. McDowell, M. Park, P. J. Thomas, A. C. Young, R. W. Blakesley, D. M. Muzny, E. Sodergren, D. A. Wheeler, K. C. Worley, H. Jiang, G. M. Weinstock, R. A. Gibbs, T. Graves, R. Fulton, E. R. Mardis, R. K. Wilson, M. Clamp, J. Cuff, S. Gnerre, D. B. Jaffe, J. L. Chang, K. Lindblad-Toh, E. S. Lander, M. Koriabine, M. Nefedov, K. Osoegawa, Y. Yoshinaga, B. Zhu and P. J. de Jong (2007).

"Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project." Nature **447**(7146): 799-816.

Cory, S., M. Graham, E. Webb, L. Corcoran and J. M. Adams (1985). "Variant (6;15) translocations in murine plasmacytomas involve a chromosome 15 locus at least 72 kb from the c-myc oncogene." EMBO J **4**(3): 675-681.

Costanzo, L. S. (2011). Fisiologia. Rio de Janeiro, Elsevier.

Coutinho, I., T. K. Day, W. D. Tilley and L. A. Selth (2016). "Androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer: a lesson in persistence." Endocr Relat Cancer **23**(12): T179-T197.

Crick, F. H., L. Barnett, S. Brenner and R. J. Watts-Tobin (1961). "General nature of the genetic code for proteins." Nature **192**: 1227-1232.

Cui, M., L. You, X. Ren, W. Zhao, Q. Liao and Y. Zhao (2016). "Long non-coding RNA PVT1 and cancer." Biochem Biophys Res Commun **471**(1): 10-14.

Culig, Z. (2016). "Androgen Receptor Coactivators in Regulation of Growth and Differentiation in Prostate Cancer." J Cell Physiol **231**(2): 270-274.

Dahm, R. (2005). "Friedrich Miescher and the discovery of DNA." Dev Biol **278**(2): 274-288.

Das, R., F. Y. Feng and L. A. Selth (2019). "Long non-coding RNAs in prostate cancer: Biological and clinical implications." Mol Cell Endocrinol **480**: 142-152.

daSilva, L. F., F. C. Beckedorff, A. C. Ayupe, M. S. Amaral, V. Mesel, A. Videira, E. M. Reis, J. C. Setubal and S. Verjovski-Almeida (2018). "Chromatin Landscape Distinguishes the Genomic Loci of Hundreds of Androgen-Receptor-Associated LincRNAs From the Loci of Non-associated LincRNAs." Front Genet **9**: 132.

Davidson, E. H. and R. J. Britten (1979). "Regulation of gene expression: possible role of repetitive sequences." Science **204**(4397): 1052-1059.

Debes, J. D. and D. J. Tindall (2002). "The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer." Cancer Lett **187**(1-2): 1-7.

Delahunt, B., R. J. Miller, J. R. Srigley, A. J. Evans and H. Samaratunga (2012). "Gleason grading: past, present and future." Histopathology **60**(1): 75-86.

Derrien, T., R. Johnson, G. Bussotti, A. Tanzer, S. Djebali, H. Tilgner, G. Guernec, D. Martin, A. Merkel, D. G. Knowles, J. Lagarde, L. Veeravalli, X. Ruan, Y. Ruan, T. Lassmann, P. Carninci, J. B. Brown, L. Lipovich, J. M. Gonzalez, M. Thomas, C. A. Davis, R. Shiekhattar, T. R. Gingeras, T. J. Hubbard, C. Notredame, J. Harrow and R. Guigo (2012). "The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression." Genome Res **22**(9): 1775-1789.

Dickerman, B. A., T. U. Ahearn, E. Giovannucci, M. J. Stampfer, P. L. Nguyen, L. A. Mucci and K. M. Wilson (2017). "Weight change, obesity and risk of prostate cancer progression among men with clinically localized prostate cancer." *Int J Cancer* **141**(5): 933-944.

Ding, C., Z. Yang, Z. Lv, C. Du, H. Xiao, C. Peng, S. Cheng, H. Xie, L. Zhou, J. Wu and S. Zheng (2015). "Long non-coding RNA PVT1 is associated with tumor progression and predicts recurrence in hepatocellular carcinoma patients." *Oncol Lett* **9**(2): 955-963.

Du, M., T. Yuan, K. F. Schilter, R. L. Dittmar, A. Mackinnon, X. Huang, M. Tschannen, E. Worthey, H. Jacob, S. Xia, J. Gao, L. Tillmans, Y. Lu, P. Liu, S. N. Thibodeau and L. Wang (2015). "Prostate cancer risk locus at 8q24 as a regulatory hub by physical interactions with multiple genomic loci across the genome." *Hum Mol Genet* **24**(1): 154-166.

Eder, I. E., Z. Culig, R. Ramoner, M. Thurnher, T. Putz, C. Nessler-Menardi, M. Tiefenthaler, G. Bartsch and H. Klocker (2000). "Inhibition of Lncap prostate cancer cells by means of androgen receptor antisense oligonucleotides." *Cancer Gene Ther* **7**(7): 997-1007.

Eeles, R. A., A. A. Olama, S. Benlloch, E. J. Saunders, D. A. Leongamornlert, M. Tymrakiewicz, M. Ghousaini, C. Luccarini, J. Dennis, S. Jugurnauth-Little, T. Dadaev, D. E. Neal, F. C. Hamdy, J. L. Donovan, K. Muir, G. G. Giles, G. Severi, F. Wiklund, H. Gronberg, C. A. Haiman, F. Schumacher, B. E. Henderson, L. Le Marchand, S. Lindstrom, P. Kraft, D. J. Hunter, S. Gapstur, S. J. Chanock, S. I. Berndt, D. Albanes, G. Andriole, J. Schleutker, M. Weischer, F. Canzian, E. Riboli, T. J. Key, R. C. Travis, D. Campa, S. A. Ingles, E. M. John, R. B. Hayes, P. D. Pharoah, N. Pashayan, K. T. Khaw, J. L. Stanford, E. A. Ostrander, L. B. Signorello, S. N. Thibodeau, D. Schaid, C. Maier, W. Vogel, A. S. Kibel, C. Cybulski, J. Lubinski, L. Cannon-Albright, H. Brenner, J. Y. Park, R. Kaneva, J. Batra, A. B. Spurdle, J. A. Clements, M. R. Teixeira, E. Dicks, A. Lee, A. M. Dunning, C. Baynes, D. Conroy, M. J. Maranian, S. Ahmed, K. Govindasami, M. Guy, R. A. Wilkinson, E. J. Sawyer, A. Morgan, D. P. Dearnaley, A. Horwich, R. A. Huddart, V. S. Khoo, C. C. Parker, N. J. Van As, C. J. Woodhouse, A. Thompson, T. Dudderidge, C. Ogden, C. S. Cooper, A. Lophatananon, A. Cox, M. C. Southey, J. L. Hopper, D. R. English, M. Aly, J. Adolfsson, J. Xu, S. L. Zheng, M. Yeager, R. Kaaks, W. R. Diver, M. M. Gaudet, M. C. Stern, R. Corral, A. D. Joshi, A. Shahabi, T. Wahlfors, T. L. Tammela, A. Auvinen, J. Virtamo, P. Klarskov, B. G. Nordestgaard, M. A. Roder, S. F. Nielsen, S. E. Bojesen, A. Siddiq, L. M. Fitzgerald, S. Kolb, E. M. Kwon, D. M. Karyadi, W. J. Blot, W. Zheng, Q. Cai, S. K. McDonnell, A. E. Rinkleb, B. Drake, G. Colditz, D. Wokolorczyk, R. A. Stephenson, C. Teerlink, H. Muller, D. Rothenbacher, T. A. Sellers, H. Y. Lin, C. Slavov, V. Mitev, F. Lose, S. Srinivasan, S. Maia, P. Paulo, E. Lange, K. A. Cooney, A. C. Antoniou, D. Vincent, F. Bacot, D. C. Tessier, C. O.-C. R. U. G.-E. Initiative, B. Australian Prostate Cancer, U. K. G. P. C. S. C. B. A. o. U. S. S. o. Oncology, U. K. P. S. Collaborators, P. Consortium, Z. Kote-Jarai and D. F. Easton (2013). "Identification of 23 new prostate cancer susceptibility loci using the iCOGS custom genotyping array." *Nat Genet* **45**(4): 385-391, 391e381-382.

Epstein, J. I., L. Egevad, M. B. Amin, B. Delahunt, J. R. Srigley, P. A. Humphrey and C. Grading (2016). "The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System." *Am J Surg Pathol* **40**(2): 244-252.

Espiritu, S. M. G., L. Y. Liu, Y. Rubanova, V. Bhandari, E. M. Holgersen, L. M. Szyca, N. S. Fox, M. L. K. Chua, T. N. Yamaguchi, L. E. Heisler, J. Livingstone, J. Wintersinger, F. Yousif, E. Lalonde, A. Rouette, A. Salcedo, K. E. Houlahan, C. H. Li, V. Huang, M. Fraser, T. van der Kwast, Q. D. Morris, R. G. Bristow and P. C. Boutros (2018). "The Evolutionary Landscape of Localized Prostate Cancers Drives Clinical Aggression." Cell **173**(4): 1003-1013 e1015.

Fang, Y. and M. J. Fullwood (2016). "Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer." Genomics Proteomics Bioinformatics **14**(1): 42-54.

Feldman, B. J. and D. Feldman (2001). "The development of androgen-independent prostate cancer." Nat Rev Cancer **1**(1): 34-45.

Gao, S., P. Lee, H. Wang, W. Gerald, M. Adler, L. Zhang, Y. F. Wang and Z. Wang (2005). "The androgen receptor directly targets the cellular Fas/FasL-associated death domain protein-like inhibitory protein gene to promote the androgen-independent growth of prostate cancer cells." Mol Endocrinol **19**(7): 1792-1802.

Gao, Y. L., Z. S. Zhao, M. Y. Zhang, L. J. Han, Y. J. Dong and B. Xu (2017). "Long Noncoding RNA PVT1 Facilitates Cervical Cancer Progression via Negative Regulating of miR-424." Oncol Res **25**(8): 1391-1398.

Geisler, S. and J. Collier (2013). "RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(11): 699-712.

George, D. and J. W. Moul (2012). "Emerging treatment options for patients with castration-resistant prostate cancer." Prostate **72**(3): 338-349.

Ghoussaini, M., H. Song, T. Koessler, A. A. Al Olama, Z. Kote-Jarai, K. E. Driver, K. A. Pooley, S. J. Ramus, S. K. Kjaer, E. Hogdall, R. A. DiCioccio, A. S. Whittemore, S. A. Gayther, G. G. Giles, M. Guy, S. M. Edwards, J. Morrison, J. L. Donovan, F. C. Hamdy, D. P. Dearnaley, A. T. Arden-Jones, A. L. Hall, L. T. O'Brien, B. N. Gehr-Swain, R. A. Wilkinson, P. M. Brown, J. L. Hopper, D. E. Neal, P. D. Pharoah, B. A. Ponder, R. A. Eeles, D. F. Easton, A. M. Dunning, U. K. G. P. C. S. C. B. A. o. U. S. S. o. Oncology and U. K. P. S. Collaborators (2008). "Multiple loci with different cancer specificities within the 8q24 gene desert." J Natl Cancer Inst **100**(13): 962-966.

Gleason, D. F. (1966). "Classification of prostatic carcinomas." Cancer Chemother Rep **50**(3): 125-128.

Graham, M. and J. M. Adams (1986). "Chromosome 8 breakpoint far 3' of the c-myc oncogene in a Burkitt's lymphoma 2;8 variant translocation is equivalent to the murine pvt-1 locus." EMBO J **5**(11): 2845-2851.

Guan, Y., W. L. Kuo, J. L. Stilwell, H. Takano, A. V. Lapuk, J. Fridlyand, J. H. Mao, M. Yu, M. A. Miller, J. L. Santos, S. E. Kalloger, J. W. Carlson, D. G. Ginzinger, S. E. Celniker, G. B. Mills, D. G. Huntsman and J. W. Gray (2007). "Amplification of PVT1 contributes to the pathophysiology of ovarian and breast cancer." Clin Cancer Res **13**(19): 5745-5755.

Haiman, C. A., N. Patterson, M. L. Freedman, S. R. Myers, M. C. Pike, A. Waliszewska, J. Neubauer, A. Tandon, C. Schirmer, G. J. McDonald, S. C. Greenway, D. O. Stram, L. Le Marchand, L. N. Kolonel, M. Frasco, D. Wong, L. C. Pooler, K. Ardlie, I. Oakley-Girvan, A. S. Whittemore, K. A. Cooney, E. M. John, S. A. Ingles, D. Altshuler, B. E. Henderson and D. Reich (2007). "Multiple regions within 8q24 independently affect risk for prostate cancer." Nat Genet **39**(5): 638-644.

Haverty, P. M., L. S. Hon, J. S. Kaminker, J. Chant and Z. Zhang (2009). "High-resolution analysis of copy number alterations and associated expression changes in ovarian tumors." BMC Med Genomics **2**: 21.

Heinlein, C. A. and C. Chang (2002). "Androgen receptor (AR) coregulators: an overview." Endocr Rev **23**(2): 175-200.

Helfand, B. T., W. J. Catalona and J. Xu (2015). "A genetic-based approach to personalized prostate cancer screening and treatment." Curr Opin Urol **25**(1): 53-58.

Humphrey, P. A. (2004). "Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate." Mod Pathol **17**(3): 292-306.

Huppi, K. and D. Siwarski (1994). "Chimeric transcripts with an open reading frame are generated as a result of translocation to the Pvt-1 region in mouse B-cell tumors." Int J Cancer **59**(6): 848-851.

Ilboudo, A., J. Chouhan, B. K. McNeil, J. R. Osborne and O. O. Ogunwobi (2015). "PVT1 Exon 9: A Potential Biomarker of Aggressive Prostate Cancer?" Int J Environ Res Public Health **13**(1): ijerph13010012.

INCA, I. N. d. C.-. (2019). "Câncer de próstata." Retrieved 28/03/2019, 2019, from <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>.

Iyer, M. K., Y. S. Niknafs, R. Malik, U. Singhal, A. Sahu, Y. Hosono, T. R. Barrette, J. R. Prensner, J. R. Evans, S. Zhao, A. Poliakov, X. Cao, S. M. Dhanasekaran, Y. M. Wu, D. R. Robinson, D. G. Beer, F. Y. Feng, H. K. Iyer and A. M. Chinnaiyan (2015). "The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome." Nat Genet **47**(3): 199-208.

Jia, L., B. Gui, D. Zheng, K. F. Decker, I. Tinay, M. Tan, X. Wang and A. S. Kibel (2017). "Androgen receptor-regulated miRNA-193a-3p targets AJUBA to promote prostate cancer cell migration." Prostate **77**(9): 1000-1011.

Jin, H. J., J. Kim and J. Yu (2013). "Androgen receptor genomic regulation." Transl Androl Urol **2**(3): 157-177.

Kapranov, P., J. Cheng, S. Dike, D. A. Nix, R. Duttgupta, A. T. Willingham, P. F. Stadler, J. Hertel, J. Hackermuller, I. L. Hofacker, I. Bell, E. Cheung, J. Drenkow, E. Dumais, S. Patel, G. Helt, M. Ganesh, S. Ghosh, A. Piccolboni, V. Sementchenko, H. Tammana and T. R. Gingeras (2007). "RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription." Science **316**(5830): 1484-1488.

- Khalil, A. M., M. Guttman, M. Huarte, M. Garber, A. Raj, D. Rivea Morales, K. Thomas, A. Presser, B. E. Bernstein, A. van Oudenaarden, A. Regev, E. S. Lander and J. L. Rinn (2009). "Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(28): 11667-11672.
- Kim, J., Y. Lee, X. Lu, B. Song, K. W. Fong, Q. Cao, J. D. Licht, J. C. Zhao and J. Yu (2018). "Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator." Cell Rep **25**(10): 2808-2820 e2804.
- Kim, M., S. J. Lee, S. Shin, K. S. Park, S. Y. Park and C. H. Lee (2018). "Novel natural killer cell-mediated cancer immunotherapeutic activity of anisomycin against hepatocellular carcinoma cells." Sci Rep **8**(1): 10668.
- Koeppen, B. M. and B. A. Stanton (2009). Fisiologia. Rio de Janeiro, Editora Elsevier.
- Koressaar, T. and M. Remm (2007). "Enhancements and modifications of primer design program Primer3." Bioinformatics **23**(10): 1289-1291.
- Kuhn, R. M., D. Karolchik, A. S. Zweig, T. Wang, K. E. Smith, K. R. Rosenbloom, B. Rhead, B. J. Raney, A. Pohl, M. Pheasant, L. Meyer, F. Hsu, A. S. Hinrichs, R. A. Harte, B. Giardine, P. Fujita, M. Diekhans, T. Dreszer, H. Clawson, G. P. Barber, D. Haussler and W. J. Kent (2009). "The UCSC Genome Browser Database: update 2009." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D755-761.
- Kung, J. T., D. Colognori and J. T. Lee (2013). "Long noncoding RNAs: past, present, and future." Genetics **193**(3): 651-669.
- Lamont, K. R. and D. J. Tindall (2011). "Minireview: Alternative activation pathways for the androgen receptor in prostate cancer." Mol Endocrinol **25**(6): 897-907.
- Langer, E. M., Y. Feng, H. Zhaoyuan, F. J. Rauscher, 3rd, K. L. Kroll and G. D. Longmore (2008). "Ajuba LIM proteins are snail/slug corepressors required for neural crest development in *Xenopus*." Dev Cell **14**(3): 424-436.
- Larsson, O., C. Wahlestedt and J. A. Timmons (2005). "Considerations when using the significance analysis of microarrays (SAM) algorithm." Bmc Bioinformatics **6**.
- Lee, J. T. (2012). "Epigenetic regulation by long noncoding RNAs." Science **338**(6113): 1435-1439.
- Leitzmann, M. F. and S. Rohrmann (2012). "Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates." Clin Epidemiol **4**: 1-11.
- Liao, X., S. Tang, J. B. Thrasher, T. L. Griebeling and B. Li (2005). "Small-interfering RNA-induced androgen receptor silencing leads to apoptotic cell death in prostate cancer." Mol Cancer Ther **4**(4): 505-515.

- Lima, L., A. Morais, F. Lobo, F. M. Calais-da-Silva, F. E. Calais-da-Silva and R. Medeiros (2008). "Association between FAS polymorphism and prostate cancer development." Prostate Cancer Prostatic Dis **11**(1): 94-98.
- Liu, E., Z. Liu, Y. Zhou, R. Mi and D. Wang (2015). "Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in ovarian cancer cells promotes cisplatin resistance by regulating apoptotic pathways." Int J Clin Exp Med **8**(11): 20565-20572.
- Lu, D., P. Luo, Q. Wang, Y. Ye and B. Wang (2017). "lncRNA PVT1 in cancer: A review and meta-analysis." Clin Chim Acta **474**: 1-7.
- Lu, N. Z., S. E. Wardell, K. L. Burnstein, D. Defranco, P. J. Fuller, V. Giguere, R. B. Hochberg, L. McKay, J. M. Renoir, N. L. Weigel, E. M. Wilson, D. P. McDonnell and J. A. Cidlowski (2006). "International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 782-797.
- Marchese, F. P. and M. Huarte (2018). "A "Counter-Enhancer" in Tumor Suppression." Cell **173**(6): 1318-1319.
- Marchese, F. P., I. Raimondi and M. Huarte (2017). "The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function." Genome Biol **18**(1): 206.
- Margueron, R. and D. Reinberg (2011). "The Polycomb complex PRC2 and its mark in life." Nature **469**(7330): 343-349.
- Marie, H., S. J. Pratt, M. Betson, H. Epple, J. T. Kittler, L. Meek, S. J. Moss, S. Troyanovsky, D. Attwell, G. D. Longmore and V. M. Braga (2003). "The LIM protein Ajuba is recruited to cadherin-dependent cell junctions through an association with alpha-catenin." J Biol Chem **278**(2): 1220-1228.
- McNair, C., A. Urbanucci, C. E. Comstock, M. A. Augello, J. F. Goodwin, R. Launchbury, S. G. Zhao, M. J. Schiewer, A. Ertel, J. Karnes, E. Davicioni, L. Wang, Q. Wang, I. G. Mills, F. Y. Feng, W. Li, J. S. Carroll and K. E. Knudsen (2017). "Cell cycle-coupled expansion of AR activity promotes cancer progression." Oncogene **36**(12): 1655-1668.
- McNeal, J. E. (1981). "The zonal anatomy of the prostate." Prostate **2**(1): 35-49.
- Mercer, T. R., M. E. Dinger and J. S. Mattick (2009). "Long non-coding RNAs: insights into functions." Nat Rev Genet **10**(3): 155-159.
- Meyer, K. B., A. T. Maia, M. O'Reilly, M. Ghousaini, R. Prathalingam, P. Porter-Gill, S. Ambis, L. Prokunina-Olsson, J. Carroll and B. A. Ponder (2011). "A functional variant at a prostate cancer predisposition locus at 8q24 is associated with PVT1 expression." PLoS Genet **7**(7): e1002165.
- Mitobe, Y., K. I. Takayama, K. Horie-Inoue and S. Inoue (2018). "Prostate cancer-associated lncRNAs." Cancer Lett **418**: 159-166.

Moreira, Y. J. C. B. (2010). Identificação de perfis de expressão de RNAs codificadores e não codificadores de proteínas como preditores de recorrência de câncer de próstata. Doutor em Ciências (Bioquímica) Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

Murthy, S., M. Wu, V. U. Bai, Z. Hou, M. Menon, E. R. Barrack, S. H. Kim and G. P. Reddy (2013). "Role of androgen receptor in progression of LNCaP prostate cancer cells from G1 to S phase." PLoS One **8**(2): e56692.

Nakamura, M., K. Shimada and N. Konishi (2008). "The role of HRK gene in human cancer." Oncogene **27 Suppl 1**: S105-113.

Nakaya, H. I., P. P. Amaral, R. Louro, A. Lopes, A. A. Fachel, Y. B. Moreira, T. A. El-Jundi, A. M. da Silva, E. M. Reis and S. Verjovski-Almeida (2007). "Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription." Genome Biol **8**(3): R43.

Nash, A. F. and I. Melezinek (2000). "The role of prostate specific antigen measurement in the detection and management of prostate cancer." Endocr Relat Cancer **7**(1): 37-51.

Niu, Y., T. M. Chang, S. Yeh, W. L. Ma, Y. Z. Wang and C. Chang (2010). "Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails." Oncogene **29**(25): 3593-3604.

Nola, S., R. Daigaku, K. Smolarczyk, M. Carstens, B. Martin-Martin, G. Longmore, M. Bailly and V. M. Braga (2011). "Ajuba is required for Rac activation and maintenance of E-cadherin adhesion." J Cell Biol **195**(5): 855-871.

Paci, P., T. Colombo and L. Farina (2014). "Computational analysis identifies a sponge interaction network between long non-coding RNAs and messenger RNAs in human breast cancer." BMC Syst Biol **8**: 83.

Parolia, A., M. Cieslik and A. M. Chinnaiyan (2018). "Competing for enhancers: PVT1 fine-tunes MYC expression." Cell Res **28**(8): 785-786.

Paulsen, F. and J. Waschke (2008). Sobotta - Atlas de anatomia humana.

Pegueroles, C. and T. Gabaldon (2016). "Secondary structure impacts patterns of selection in human lncRNAs." BMC Biol **14**: 60.

Pei, N., Y. Mao, P. Wan, X. Chen, A. Li, H. Chen, J. Li, R. Wan, Y. Zhang, H. Du, B. Chen, G. Jiang, M. Xia, C. Summers, G. Hu, D. Gu and H. Li (2017). "Angiotensin II type 2 receptor promotes apoptosis and inhibits angiogenesis in bladder cancer." J Exp Clin Cancer Res **36**(1): 77.

Pezaro, C., H. H. Woo and I. D. Davis (2014). "Prostate cancer: measuring PSA." Intern Med J **44**(5): 433-440.

Ponting, C. P., P. L. Oliver and W. Reik (2009). "Evolution and functions of long noncoding RNAs." Cell **136**(4): 629-641.

- Puthalakath, H., A. Villunger, L. A. O'Reilly, J. G. Beaumont, L. Coultas, R. E. Cheney, D. C. Huang and A. Strasser (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." Science **293**(5536): 1829-1832.
- Ransohoff, J. D., Y. Wei and P. A. Khavari (2018). "The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA." Nat Rev Mol Cell Biol **19**(3): 143-157.
- Reis, E. M., H. I. Nakaya, R. Louro, F. C. Canavez, A. V. Flatschart, G. T. Almeida, C. M. Egidio, A. C. Paquola, A. A. Machado, F. Festa, D. Yamamoto, R. Alvarenga, C. C. da Silva, G. C. Brito, S. D. Simon, C. A. Moreira-Filho, K. R. Leite, L. H. Camara-Lopes, F. S. Campos, E. Gimba, G. M. Vignal, H. El-Dorry, M. C. Sogayar, M. A. Barcinski, A. M. da Silva and S. Verjovski-Almeida (2004). "Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer." Oncogene **23**(39): 6684-6692.
- Riegman, P. H., R. J. Vlietstra, J. A. van der Korput, A. O. Brinkmann and J. Trapman (1991). "The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element." Mol Endocrinol **5**(12): 1921-1930.
- Rinn, J. L. and H. Y. Chang (2012). "Genome regulation by long noncoding RNAs." Annu Rev Biochem **81**: 145-166.
- Rinn, J. L., M. Kertesz, J. K. Wang, S. L. Squazzo, X. Xu, S. A. Brugmann, L. H. Goodnough, J. A. Helms, P. J. Farnham, E. Segal and H. Y. Chang (2007). "Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs." Cell **129**(7): 1311-1323.
- Ryan, C. J., A. Smith, P. Lal, J. Satagopan, V. Reuter, P. Scardino, W. Gerald and H. I. Scher (2006). "Persistent prostate-specific antigen expression after neoadjuvant androgen depletion: an early predictor of relapse or incomplete androgen suppression." Urology **68**(4): 834-839.
- Sakurai, K., B. J. Reon, J. Anaya and A. Dutta (2015). "The lncRNA DRAIC/PCAT29 Locus Constitutes a Tumor-Suppressive Nexus." Mol Cancer Res **13**(5): 828-838.
- Sathianathan, N. J., B. R. Konety, J. Crook, F. Saad and N. Lawrentschuk (2018). "Landmarks in prostate cancer." Nat Rev Urol **15**(10): 627-642.
- Shtivelman, E. and J. M. Bishop (1990). "Effects of translocations on transcription from PVT." Mol Cell Biol **10**(4): 1835-1839.
- Spalteholz, W. and R. Spanner (2006). Anatomia humana. São Paulo, Roca.
- Stein, C. A., J. B. Hansen, J. Lai, S. Wu, A. Voskresenskiy, A. Hog, J. Worm, M. Hedtjarn, N. Souleimanian, P. Miller, H. S. Soifer, D. Castanotto, L. Benimetskaya, H. Orum and T. Koch (2010). "Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents." Nucleic Acids Res **38**(1): e3.
- Taft, R. J., M. Pheasant and J. S. Mattick (2007). "The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity." Bioessays **29**(3): 288-299.

Takahashi, Y., G. Sawada, J. Kurashige, R. Uchi, T. Matsumura, H. Ueo, Y. Takano, H. Eguchi, T. Sudo, K. Sugimachi, H. Yamamoto, Y. Doki, M. Mori and K. Mimori (2014). "Amplification of PVT-1 is involved in poor prognosis via apoptosis inhibition in colorectal cancers." Br J Cancer **110**(1): 164-171.

Tang, J., Y. Li, Y. Sang, B. Yu, D. Lv, W. Zhang and H. Feng (2018). "LncRNA PVT1 regulates triple-negative breast cancer through KLF5/beta-catenin signaling." Oncogene **37**(34): 4723-4734.

Tian, Z., S. Cao, C. Li, M. Xu, H. Wei, H. Yang, Q. Sun, Q. Ren and L. Zhang (2019). "LncRNA PVT1 regulates growth, migration, and invasion of bladder cancer by miR-31/ CDK1." J Cell Physiol **234**(4): 4799-4811.

Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent and A. Jemal (2015). "Global cancer statistics, 2012." CA Cancer J Clin **65**(2): 87-108.

Tsai, M. C., O. Manor, Y. Wan, N. Mosammamarast, J. K. Wang, F. Lan, Y. Shi, E. Segal and H. Y. Chang (2010). "Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes." Science **329**(5992): 689-693.

Tusher, V. G., R. Tibshirani and G. Chu (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 5116-5121.

Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm and S. G. Rozen (2012). "Primer3--new capabilities and interfaces." Nucleic Acids Res **40**(15): e115.

Uo, T., S. R. Plymate and C. C. Sprenger (2017). "Allosteric alterations in the androgen receptor and activity in prostate cancer." Endocr Relat Cancer **24**(9): R335-R348.

Villeneuve, L., E. Rassart, P. Jolicoeur, M. Graham and J. M. Adams (1986). "Proviral integration site Mis-1 in rat thymomas corresponds to the pvt-1 translocation breakpoint in murine plasmacytomas." Mol Cell Biol **6**(5): 1834-1837.

Volders, P. J., J. Anckaert, K. Verheggen, J. Nuytens, L. Martens, P. Mestdagh and J. Vandesompele (2019). "LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs." Nucleic Acids Res **47**(D1): D135-D139.

Wan, B., H. Y. Wu, D. J. Lv, X. M. Zhou, L. R. Zhong, B. Lei, S. B. Zhang and X. M. Mao (2018). "Downregulation of lncRNA PVT1 expression inhibits proliferation and migration by regulating p38 expression in prostate cancer." Oncol Lett **16**(4): 5160-5166.

Wan, L., M. Sun, G. J. Liu, C. C. Wei, E. B. Zhang, R. Kong, T. P. Xu, M. D. Huang and Z. X. Wang (2016). "Long Noncoding RNA PVT1 Promotes Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation through Epigenetically Regulating LATS2 Expression." Mol Cancer Ther **15**(5): 1082-1094.

Wang, C., L. Wang, Y. Ding, X. Lu, G. Zhang, J. Yang, H. Zheng, H. Wang, Y. Jiang and L. Xu (2017). "LncRNA Structural Characteristics in Epigenetic Regulation." Int J Mol Sci **18**(12).

- Wang, F., J. H. Yuan, S. B. Wang, F. Yang, S. X. Yuan, C. Ye, N. Yang, W. P. Zhou, W. L. Li, W. Li and S. H. Sun (2014). "Oncofetal long noncoding RNA PVT1 promotes proliferation and stem cell-like property of hepatocellular carcinoma cells by stabilizing NOP2." Hepatology **60**(4): 1278-1290.
- Wang, Q., W. Li, Y. Zhang, X. Yuan, K. Xu, J. Yu, Z. Chen, R. Beroukhi, H. Wang, M. Lupien, T. Wu, M. M. Regan, C. A. Meyer, J. S. Carroll, A. K. Manrai, O. A. Janne, S. P. Balk, R. Mehra, B. Han, A. M. Chinnaiyan, M. A. Rubin, L. True, M. Fiorentino, C. Fiore, M. Loda, P. W. Kantoff, X. S. Liu and M. Brown (2009). "Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgen-independent prostate cancer." Cell **138**(2): 245-256.
- Wang, X., X. Song, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (2011). "The long arm of long noncoding RNAs: roles as sensors regulating gene transcriptional programs." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(1): a003756.
- Wang, Z., C. Zang, J. A. Rosenfeld, D. E. Schones, A. Barski, S. Cuddapah, K. Cui, T. Y. Roh, W. Peng, M. Q. Zhang and K. Zhao (2008). "Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome." Nat Genet **40**(7): 897-903.
- Washietl, S., M. Kellis and M. Garber (2014). "Evolutionary dynamics and tissue specificity of human long noncoding RNAs in six mammals." Genome Res **24**(4): 616-628.
- Webb, E., J. M. Adams and S. Cory (1984). "Variant (6 ; 15) translocation in a murine plasmacytoma occurs near an immunoglobulin kappa gene but far from the myc oncogene." Nature **312**(5996): 777-779.
- Wu, D., C. Zhang, Y. Shen, K. P. Nephew and Q. Wang (2011). "Androgen receptor-driven chromatin looping in prostate cancer." Trends Endocrinol Metab **22**(12): 474-480.
- Wu, L., C. Runkle, H. J. Jin, J. Yu, J. Li, X. Yang, T. Kuzel, C. Lee and J. Yu (2014). "CCN3/NOV gene expression in human prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor." Oncogene **33**(4): 504-513.
- Wu, Q., Y. C. Kim, J. Lu, Z. Xuan, J. Chen, Y. Zheng, T. Zhou, M. Q. Zhang, C. I. Wu and S. M. Wang (2008). "Poly A- transcripts expressed in HeLa cells." PLoS One **3**(7): e2803.
- Wu, Y., Y. Q. Wang, W. W. Weng, Q. Y. Zhang, X. Q. Yang, H. L. Gan, Y. S. Yang, P. P. Zhang, M. H. Sun, M. D. Xu and C. F. Wang (2016). "A serum-circulating long noncoding RNA signature can discriminate between patients with clear cell renal cell carcinoma and healthy controls." Oncogenesis **5**: e192.
- Wutz, A. (2011). "Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation." Nat Rev Genet **12**(8): 542-553.
- Xia, P., R. Zhang and G. Ge (2015). "C/EBPbeta Mediates TNF-alpha-Induced Cancer Cell Migration by Inducing MMP Expression Dependent on p38 MAPK." J Cell Biochem **116**(12): 2766-2777.

- Xiao, M., Y. Feng, C. Liu and Z. Zhang (2018). "Prognostic values of long noncoding RNA PVT1 in various carcinomas: An updated systematic review and meta-analysis." Cell Prolif **51**(6): e12519.
- Xu, K., H. Shimelis, D. E. Linn, R. Jiang, X. Yang, F. Sun, Z. Guo, H. Chen, W. Li, H. Chen, X. Kong, J. Melamed, S. Fang, Z. Xiao, T. D. Veenstra and Y. Qiu (2009). "Regulation of androgen receptor transcriptional activity and specificity by RNF6-induced ubiquitination." Cancer Cell **15**(4): 270-282.
- Xu, K., Z. J. Wu, A. C. Groner, H. H. He, C. Cai, R. T. Lis, X. Wu, E. C. Stack, M. Loda, T. Liu, H. Xu, L. Cato, J. E. Thornton, R. I. Gregory, C. Morrissey, R. L. Vessella, R. Montironi, C. Magi-Galluzzi, P. W. Kantoff, S. P. Balk, X. S. Liu and M. Brown (2012). "EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent." Science **338**(6113): 1465-1469.
- Xu, Y., S. Y. Chen, K. N. Ross and S. P. Balk (2006). "Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins." Cancer Res **66**(15): 7783-7792.
- Yan, H., Y. Yang, L. Zhang, G. Tang, Y. Wang, G. Xue, W. Zhou and S. Sun (2015). "Characterization of the genotype and integration patterns of hepatitis B virus in early- and late-onset hepatocellular carcinoma." Hepatology **61**(6): 1821-1831.
- Yang, J., C. Li, A. Mudd and X. Gu (2017). "lncRNA PVT1 predicts prognosis and regulates tumor growth in prostate cancer." Biosci Biotechnol Biochem **81**(12): 2301-2306.
- Yang, L., C. Lin, C. Jin, J. C. Yang, B. Tanasa, W. Li, D. Merkurjev, K. A. Ohgi, D. Meng, J. Zhang, C. P. Evans and M. G. Rosenfeld (2013). "lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs." Nature **500**(7464): 598-602.
- Yang, Y. R., S. Z. Zang, C. L. Zhong, Y. X. Li, S. S. Zhao and X. J. Feng (2014). "Increased expression of the lncRNA PVT1 promotes tumorigenesis in non-small cell lung cancer." Int J Clin Exp Pathol **7**(10): 6929-6935.
- Yeger, H. and B. Perbal (2016). "CCN family of proteins: critical modulators of the tumor cell microenvironment." J Cell Commun Signal **10**(3): 229-240.
- Young, J. E., G. A. Garden, R. A. Martinez, F. Tanaka, C. M. Sandoval, A. C. Smith, B. L. Sopher, A. Lin, K. H. Fischbeck, L. M. Ellerby, R. S. Morrison, J. P. Taylor and A. R. La Spada (2009). "Polyglutamine-expanded androgen receptor truncation fragments activate a Bax-dependent apoptotic cascade mediated by DP5/Hrk." J Neurosci **29**(7): 1987-1997.
- Yu, J., J. Yu, R. S. Mani, Q. Cao, C. J. Brenner, X. Cao, X. Wang, L. Wu, J. Li, M. Hu, Y. Gong, H. Cheng, B. Laxman, A. Vellaichamy, S. Shankar, Y. Li, S. M. Dhanasekaran, R. Morey, T. Barrette, R. J. Lonigro, S. A. Tomlins, S. Varambally, Z. S. Qin and A. M. Chinnaiyan (2010). "An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression." Cancer Cell **17**(5): 443-454.

- Yuan, C. L., H. Li, L. Zhu, Z. Liu, J. Zhou and Y. Shu (2016). "Aberrant expression of long noncoding RNA PVT1 and its diagnostic and prognostic significance in patients with gastric cancer." Neoplasma **63**(3): 442-449.
- Yuan, X. and S. P. Balk (2009). "Mechanisms mediating androgen receptor reactivation after castration." Urol Oncol **27**(1): 36-41.
- Zeng, C., X. Yu, J. Lai, L. Yang, S. Chen and Y. Li (2015). "Overexpression of the long non-coding RNA PVT1 is correlated with leukemic cell proliferation in acute promyelocytic leukemia." J Hematol Oncol **8**: 126.
- Zhang, A., J. C. Zhao, J. Kim, K. W. Fong, Y. A. Yang, D. Chakravarti, Y. Y. Mo and J. Yu (2015). "LncRNA HOTAIR Enhances the Androgen-Receptor-Mediated Transcriptional Program and Drives Castration-Resistant Prostate Cancer." Cell Rep **13**(1): 209-221.
- Zhang, H., Z. Chen, X. Wang, Z. Huang, Z. He and Y. Chen (2013). "Long non-coding RNA: a new player in cancer." J Hematol Oncol **6**: 37.
- Zhang, S., G. Zhang and J. Liu (2016). "Long noncoding RNA PVT1 promotes cervical cancer progression through epigenetically silencing miR-200b." APMIS **124**(8): 649-658.
- Zhang, Y., G. Yang and Y. Luo (2019). "Long non-coding RNA PVT1 promotes glioma cell proliferation and invasion by targeting miR-200a." Exp Ther Med **17**(2): 1337-1345.
- Zhang, Z., Z. Zhu, B. Zhang, W. Li, X. Li, X. Wu, L. Wang, L. Fu, L. Fu and J. T. Dong (2014). "Frequent mutation of rs13281615 and its association with PVT1 expression and cell proliferation in breast cancer." J Genet Genomics **41**(4): 187-195.
- Zhao, J., P. Du, P. Cui, Y. Qin, C. Hu, J. Wu, Z. Zhou, W. Zhang, L. Qin and G. Huang (2018). "LncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer." Oncogene **37**(30): 4094-4109.
- Zhao, J., B. K. Sun, J. A. Erwin, J. J. Song and J. T. Lee (2008). "Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome." Science **322**(5902): 750-756.
- Zhao, J. C., K. W. Fong, H. J. Jin, Y. A. Yang, J. Kim and J. Yu (2016). "FOXA1 acts upstream of GATA2 and AR in hormonal regulation of gene expression." Oncogene **35**(33): 4335-4344.
- Zhao, J. C., J. Yu, C. Runkle, L. Wu, M. Hu, D. Wu, J. S. Liu, Q. Wang, Z. S. Qin and J. Yu (2012). "Cooperation between Polycomb and androgen receptor during oncogenic transformation." Genome Res **22**(2): 322-331.
- Zhou, Q., J. Chen, J. Feng and J. Wang (2016). "Long noncoding RNA PVT1 modulates thyroid cancer cell proliferation by recruiting EZH2 and regulating thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR)." Tumour Biol **37**(3): 3105-3113.
- Zhou, Y., E. C. Bolton and J. O. Jones (2015). "Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis." J Mol Endocrinol **54**(1): R15-29.

Zuo, G. W., C. D. Kohls, B. C. He, L. Chen, W. Zhang, Q. Shi, B. Q. Zhang, Q. Kang, J. Luo, X. Luo, E. R. Wagner, S. H. Kim, F. Restegar, R. C. Haydon, Z. L. Deng, H. H. Luu, T. C. He and Q. Luo (2010). "The CCN proteins: important signaling mediators in stem cell differentiation and tumorigenesis." Histol Histopathol **25**(6): 795-806.

Apêndices

Apêndice 1

Tabela A1: Lista de genes responsivos a andrógênio.

883 genes responsivos a andrógênio (R1881) que tiveram a sua expressão ativada .	1155 genes responsivos a andrógênio (R1881) que tiveram a sua expressão inibida .
<p>A_21_P0014882; A_33_P3210561; A_33_P3221980; A_33_P3298980; A_33_P3301445; A_33_P3329740; A_33_P3330413; A_33_P3349727; A_33_P3365845; A_33_P3367970; A_33_P3371450; A_33_P3375026; A_33_P3391120; A_33_P3402086; A_33_P3403356; A_33_P3407049; A1BG; ABCC1; ABCC4; ABHD2; ABHD3; ABL1; AC003101.1; AC006483.5; AC133680.1; AC142381.1; ACACA; ACAD8; ACOX3; ACSL3; ACTL8; ADAMTS1; ADH1C; ADPRM; ADRA2A; ADRB1; AF086546; AF130105; AFF3; AGPAT5; AGR2; AHNAK; AK096255; AK130248; AK4; AKAP1; AKAP12; AKAP5; AL022344.7; AL133645; ALDH1A3; ALDH4A1; ANK1; ANKH; ANKRD26P3; ANKRD37; ANXA1; AP000525.9; AP004550.1; APLN; APPBP2; ARAP2; ARG2; ARHGAP26; ARHGAP28; ARMC12; ARSG; ASGR2; ASRGL1; ATAD2; ATG101; ATMIN; ATP10A; ATP1A1; ATP1A4; ATP2C1; AZGP1; B2M; B3GNT2; BAIAP2; BC018676; BC022164; BC028196; BC029496; BC045716; BC066989; BC071853; BCAP29; BEND4; BET1; BHLHA15; BHLHE40; BICD2; BMPR1A; BMPR1B-AS1; BTAF1; BTG1; BU171032; C19orf48; C19orf83; C1orf116; C1orf21; C1QTNF9B-AS1; C2orf27A; C2orf76; C3orf35; C3orf58; C9orf152; C9orf72; C9orf91; CA5BP1; CACNG4; CAMKK2; CAND1.11; CANT1; CARTPT; CASC10; CBLL1; CBWD5; CCDC126; CCDC138; CCDC141; CCDC15; CCDC189; CCDC74A; CCDC74B; CD518305; CDC14B; CDC23; CDC25A; CDC42EP2; CDC42SE1; CDK2; CDYL2; CECR6; CENPN; CEP44; CEP83; CERS6; CHAC2; CHD7; CHKA; CHRDL1; CHRFBAM7A; CITED1; CLGN; CMC2; CNGB3; COL12A1; COL23A1; CORO2A; COTL1; CREB3L2; CREB3L4; CRISPLD2; CRLS1; CROT; CSNK1A1L; CSNK1G3; CSRP2; CTD-2292M16.8; CTD-2314B22.1; CTD- 2538C1.2; CTF1; CU692082; CUX2; CXCR4; CYP11A1; CYP1A1; CYP2U1; CYP4F30P; CYTH1; DA197111; DBI; DDIAS; DEFB132; DEGS1; DEPD1B; DFN31; DHCR24; DHRS12; DIO2; DKFZP58611420; DLX1; DLX2; DNAJB9; DNAJC3; DNASE2B; DNM1L; DOCK4; DOCK5; DRD2; DSC1; DSG1-AS1; DUBR; DUSP2; DYNLL2; EAF2; EBP; EC12; EDEM1; EDEM3; EFCAB12; EFNA5; EFN2; EGFR; EHBP1; EIF4E2; ELK4; ELL2; ELOVL1; ELOVL2; ELOVL5; ELOVL7; EML1; EMP2; ENDOD1; ENST00000613924; ENST00000614063; ENST00000619210; ENST00000620237; ENST00000624585; ENST00000624615; ENTPD7; EPDR1; EPHA7; EPN2; ERGIC2; ERLEC1; ERN1; ERO1L; ERFF1; ESRP2; ETV1; EXTL2; FAM103A1; FAM105A; FAM13A-AS1; FAM151B; FAM174B; FAM188B; FAM189A2; FAM83A-AS1; FAM91A1; FAR2P1; FAR2P2; FASN; FAXDC2; FBXW2; FCN2; FERMT2; FGD4; FGFR2; FGFR3; FGFRL1; FHDC1; FICD; FIG4; FKBP1B; FKBP5; FMO5; FOS; FOSL2; FOXD4; FRK; FRYL; FXD3; FZD5; FZD8; GABPB1; GABPB1-AS1; GADD45G; GAN; GAMPLINC; GAS8- AS1; GCFC2; GCNT1; GFM1; GHR; GLB1L2; GLI1; GLRX2; GLUD1; GLUD2; GLYATL1; GLYATL2; GMPPB; GNB4; GNMT; GOLGA2; GOLGA4; GOLPH3; GPC6; GPR158; GREB1; GRHL2;</p>	<p>A_21_P0014213; A_21_P0014894; A_32_P48615; A_33_P3222600; A_33_P3241150; A_33_P3265935; A_33_P3294078; A_33_P3311911; A_33_P3346526; A_33_P3392350; A2M-AS1; ABCA1; ABCA12; ABCC5; ABCC6; ABCC6P1; ABCG1; ABLIM1; ABTB2; AC007562.1; AC010967.2; AC073283.4; AC093901.1; AC141928.1; ACAA2; ACADSB; ACKR3; ACTA2; ACTRT3; ADAM23; ADCY1; ADCY2; ADD2; ADGRB2; ADGRG6; ADGRV1; ADM; ADORA2B; ADRA2C; AEBP1; AGBL5-AS1; AGT; AHNAK2; AIDA; AJUBA; AK021734; AK058041; AK092862; AK123308; AK124361; AK124859; AK125166; AK125979; AK129982; AKR1C1; AKR1C3; AL117431; AL523350; ALCAM; ALPK1; ALX4; AMIGO2; AMIGO3; ANGP1L2; ANKRD16; ANKRD18A; ANKRD18B; ANKRD20A11P; ANKRD20A12P; ANKRD20A2; ANKRD20A3; ANKRD20A5P; ANKRD20A8P; ANKRD20A9P; ANKRD28; ANKRD36B; ANKRD62P1; ANO2; ANP32E; ANPEP; ANTXR1; ANXA9; AOC1; AP000253.1; APBA1; APOLD1; APPL1; ARHGAP18; ARHGAP20; ARHGAP27; ARHGAP32; ARHGEF10; ARHGEF17; ARHGEF40; ARL4D; ASAP2; ASB13; ASIC1; ASNSP1; ASS1; ATG16L2; ATG3; ATOH7; ATP11A; ATP1B2; ATP2B1; ATP2B4; ATP8A1; ATXN7L1; AUTS2; BAHCC1; BAMBI; BANK1; BARD1; BASP1; BBS9; BC092495; BCAM; BCHE; BDH2; BEND5; BEND7; BEST1; BEST4; BFSP1; BHLHE41; BIRC3; BLNK; BMF; BMX; BRSK7; BTD; BTN2A2; BX648696; C10orf10; C12orf60; C14orf132; C14orf93; C16orf45; C16orf74; C16orf89; C18orf61; C1orf63; C1QTNF3; C1QTNF6; C1R; C1RL-AS1; C21orf58; C2orf15; C4orf32; C4orf46; C5orf30; C9orf92; CA12; CABLES1; CACNA1G; CACNB2; CADM1; CALD1; CAMK1D; CAMK2N1; CAPRIN2; CAPS2; CARN1S1; CASC1; CASC2; CBLN2; CBR3; CCDC14; CCDC18-AS1; CCDC69; CCDC88B; CCDC93; CCNE2; CCNG2; CCNO; CD24; CD83; CDCA7L; CDH18; CDH26; CDH3; CDHR3; CDK8; CDNF; CDON; CDR2L; CELA2A; CERK; CFAP70; CHAC1; CHAD1; CHAF1B; CHN1; CHRM1; CLCN4; CLCN5; CLDND2; CNBD1; CNKSR3; CNTN2; CNTN5; COBL; COBLL1; COL16A1; COL18A1; COL5A2; COL9A2; COL9A3; COLCA1; COLQ; COMP; CPAMD8; CRABP2; CREBRF; CRNDE; CROCCP2; CSMD1; CTBP1; CTD-2251F13.1; CTD-2342N23.3; CTTNBP2NL; CXorf36; CYTH3; DAND5; DAPK2; DCBLD2; DCDC2; DCHS1; DDB2; DDC; DDO; DDR2; DDX11L16; DDX58; DENND1B; DENND3; DENND5B; DEPTOR; DFNAS; DGKH; DICER1-AS1; DIDO1; DIO3; DIXDC1; DLGAP1-AS3; DMKN; DNAH11; DNAH2; DOK1; DOK7; DPP4; DPYSL3; DQ786257; DRAIC; DSC2; DSE; DSEL; DUSP26; DUSP6; EDN2; EFCAB11; EFHD1; EFR3B; EGLN3; ELFN2; ENC1; ENOX1; ENPP4; ENPP5; ENST00000612143; ENST00000614678; ENST00000614987; ENST00000615792; ENST00000619168; ENST00000621666; ENST00000621996; ENST00000623723; ENST00000624675; ENTPD3; EPB41; EPB41L4A; EPHX1; EPS8; ERBB2; ESPN; ETV6; EXPH5; EXTL1;</p>

GRIN3A; GUCY1A3; H2AFZ; HACD2; HCLS1; HEBP2; HERC4; HERC5; HERC6; HERPUD1; HES2; HEY1; HGD; HIF1A-AS2; HIPK2; HK2; HM13; HMGCR; HMGCS1; HMGXB3; HOMER2; HOPX; HS3ST1; HSD17B2; HSD17B4; HSPA13; ID1; ID2; ID3; IDH1; IDI1; IDI2-AS1; IGF1; IGF1R; IGFBP3; IGFBP5; IL6R; IMPDH1; IMPDH1P11; INPP4B; INSIG1; INTS10; IRS2; ITGAV; JHDM1D-AS1; JMJD1C-AS1; JPH1; KANK1; KAZALD1; KBTBD11-OT1; KCND2; KCNG3; KCNMA1; KCNN2; KCTD3; KCTD9; KDELR2; KDM7A; KIF22; KLB; KLF4; KLF5; KLHL29; KLK15; KLK2; KLK3; KLK4; KLK5; KLKP1; KMT5A; KRT18; KRT18P19; KRT18P26; KRT18P28; KRT18P40; KRT18P42; KRT18P49; KRT18P52; KRT18P55; KRT18P59; KRT18P64; KRT18P65; KRT19; KRT19P2; KRT8; KRT83; KRT8P15; KRT8P37; KRT8P44; KRT8P48; L3MBTL3; LA16c-380H5.4; LA16c-83F12.6; LAMA1; LAMA3; LAMC1; LAT2; LDLR; LECT1; LIFR; LIMCH1; LIN7B; LINC00644; LINC00883; LINC01296; LINC01299; LINC-PINT; Inc-AC016251.1-9-2; Inc-AGGF1-3:17; Inc-ANKH-1:3; Inc-C14orf23-3:1; Inc-C16orf61-2:1; Inc-C9orf82-1:1; Inc-CBLL1-1:3; Inc-CETP-1:1; Inc-CETP-1:2; Inc-COX4NB-1:1; Inc-DRGX-1:1; Inc-FAM75A6-1:1; Inc-GLYATL2-2:3; Inc-HDAC9-3:1; Inc-HPCAL1-1:6; Inc-KCNE4-1:1; Inc-KLRG2-1:1; Inc-KRT80-3:1; Inc-MAGEB10-2:1; Inc-MIXL1-2:1; Inc-MRPL48-1:1; Inc-MUC20-3:1; Inc-OSBP19-1:1; Inc-PEA15-1:1; Inc-PERP-2:2; Inc-PIK3R1-1:1; Inc-PPM1D-1:1; Inc-RAB4A-1:2; Inc-RASL10A-1:1; Inc-SCCPDH-1:2; Inc-SLC7A6OS-2:1; Inc-ST3GAL5-1:1; Inc-TBX15-2:1; Inc-TSKU-1:1; Inc-WISP1-1:1; Inc-XRCC2-4:1; LOC100506023; LOC100506860; LOC100508046; LOC101927322; LOC101927482; LOC101927495; LOC158435; LOC283194; LOC284648; LOC284825; LOC440040; LOC440896; LOC440910; LOC642426; LOC81691; LONRF1; LRCH1; LRIG1; LRRC16A; LRRC8A; LRRFIP2; LSS; LY9; MAF; MAFK; MALT1; MAP2K4; MAP7D1; MAP9; MAPK10; MAPK6; MARCH5; MBOAT2; MCCC2; MCEE; MCFD2; MDGA1; MEGF9; MEMO1; MERTK; MESP1; MFS2A; MICAL1; MICALCL; MINOS1-NBL1; MIPEP; MIR17HG; MIRLET7BHG; MLPH; MORC4; MORN1; MPC2; MPHOSPH9; MPP6; MPRIP; MPZL1; MRPS18A; MTCL1; MTERF4; MTFP1; MTM1; MTMR11; MTMR12; MTMR2; MTMR9; MTOR; MXD1; MYBL1; MYOF; MZT2A; NANS; NAT1; NAT2; NCAPD3; NDFIP2; NDRG1; NDRG4; NEBL; NEDD4L; NFIB; NFKBIA; NKX3-1; NKX3-2; NM_001098516; NM_001199814; NM_031953; NMD3; NNNMT; NPC1; NPPC; NPR1; NR5A2; NSMAF; NT5DC3; NTNG1; NUP58; NUP98; NUPL1; ODC1; OLA1; OPN1MW; OR7E47P; ORC5; ORM1; ORM2; OSBP18; OTUD7B; OTULIN; PACS1; PACSIN2; PAK1IP1; PALMD; PAPSS1; PAQR4; PAQR6; PART1; PARVA; PASK; PCDH1; PCDH20; PCNA-AS1; PCTP; PDIA5; PDLIM5; PDZRN3; PEA15; PER1; PEX10; PFKFB2; PGC; PGM2; PGM3; PHF20L1; PHGR1; PI4K2B; PIAS1; PIGH; PLA2G5; PLPP1; PLPP3; PLPP6; PMEPA1; PNKD; PNMA1; POLR3E; POP1; POTE3; POTE4; POTE1; POTE2; PPFIA3; PPFIBP1; PPFIBP2; PPM1A; PPM1D; PPM1K; PPP1CB; PPP2CB; PRAMEF8; PRDM1; PRDX6; PRIM2; PRKAR2B; PRKAR2B; PRKCA; PRKCH; PRR16; PSD3; PSMA6; PTCRA; PTGER4; PTGFR; PTN; PTPLB; PTPN21; PTPN9; PTPRJ; PTPRM; PTPRN2; RAB27A; RAB28; RAB3B; RAB4A; RAB6C-AS1; RAD54B; RALGPS2; RALYL; RARA; RARB; RASL10A; RBM24; RDH10; REP15; REPS2; RFX; RFPL2; RFPL3S; RGS16; RHCG; RHOBTB3; RHO; RIC8B; RLN1; RNF112; RNF138; RNF138P1; RNF150; RNF223; ROR1; RP11-1078H9.6; RP11-1079K10.3; RP11-19618.3; RP11-236B18.2; RP11-314A15.2; RP11-356O9.1; RP11-416N13.1; F2R; FALEC; FAM102A; FAM110C; FAM134B; FAM175A; FAM177B; FAM182B; FAM184A; FAM184B; FAM198A; FAM198B; FAM19A2; FAM201A; FAM212B; FAM217B; FAM221B; FAM224A; FAM229B; FAM47E; FAM49A; FAM78A; FANK1; FAS; FAXC; FBXL2; FBXL22; FBXO15; FCGR2C; FCN1; FEZ1; FGD3; FGD6; FGF13; FHOD3; FLJ31104; FLJ36000; FLJ43315; FMNL3; FOLH1; FOLH1B; FOXD3; FOXN3; FOXN4; FOXO4; FOXO6; FOXP4-AS1; FOXQ1; FRMD5; FRMPD1; FRMPD2; FSCN1; FUT10; FUT8; FUT8-AS1; FYN; FZD2; FZD3; FZD4; GALNT10; GALNT14; GALNT18; GAREM1; GATA6; GATS; GCA; GCG; GHRL; GIMAP2; GIMAP6; GJB2; GLCCI1; GLCE; GLI3; GLIPR1L2; GLIS2; GLS2; GOLGA2P2Y; GOLGA2P6; GOLGA6L4; GOLGA6L9; GOLGA8R; GOLPH3L; GPAT3; GPER1; GPR137B; GPR20; GPR63; GPRIN2; GPX8; GRAMD1C; GRB10; GRB14; GRIK1; GRIK2; GRK5; GS1-421I3.2; GSC; GSTA2; GSTA5; GUCY1B2; GUSBP1; GUSBP2; HACL1; HAGLROS; HCG8; HEG1; HEPACAM; HLA-DQB1; HOTAIRM1; HOXA10; HOXA11-AS; HOXA3; HOXA5; HOXA7; HOXA9; HOXB5; HOXB6; HOXB-AS1; HOXC12; HOXC13-AS; HOXC4; HOXC5; HOXC8; HOXC9; HOXC-AS1; HOXC-AS3; HRK; HS6ST2; HSD17B7; HSPA12A; HSPA4L; HTR2C; HTRA1; IER5; IFIH1; IFIT2; IFIT5; IFITM1; IGFALS; IGIP; IGKV1-16; IGKV1D-8; IGKV1OR2-108; IKZF2; IKZF3; IL15; IL17C; IL17RB; IL17RD; IL1RAP; IL1RN; IL27RA; IL36G; IL4R; INHBB; INSIG2; INTS8; IQCH-AS1; IQCJ-SCHIP1; IRF1; IRF2BPL; IRX3; IRX5; ITGB4; ITGB7; ITPKA; ITPR1; JAK3; JDP2; KALRN; KATNAL2; KCNAB2; KCNG1; KCNIP3; KCNJ3; KCNK13; KCNK5; KCNMB4; KCNS3; KCNU1; KDM4D; KDM6A; KHDRBS3; KHK; KIAA0408; KIAA0922; KIAA1217; KIAA1257; KIAA1324; KIAA1462; KIF21A; KIF25; KIF3C; KIF5B; KITLG; KLHL1; KLHL24; KLHL3; KLLN; KMT2C; KSR2; LAMB1; LCN15; LETMD1; LFNG; LIF; LIMA1; LIMS2; LINC00467; LINC00476; LINC00478; LINC00565; LINC00648; LINC00673; LINC00853; LINC00858; LINC00933; LINC01003; LINC01006; LINC01021; LINC01024; LINC01133; LINC01137; LINC01138; LINC01184; LINC01193; LINC01351; LINC01354; LINC01503; LINC01569; LINGO3; Inc-ACCSL-1:1; Inc-ACSS3-2:1; Inc-ACSS3-2:2; Inc-ADA-1:2; Inc-BDKRB1-1:1; Inc-BHLHE41-2:12; Inc-C11orf39-3:1; Inc-C12orf61-3:1; Inc-C1orf122-1:1; Inc-C1orf201-2:2; Inc-C1orf201-3:2; Inc-C5orf43-3:2; Inc-CCKAR-1:1; Inc-CCKAR-1:2; Inc-CCNE2-1:1; Inc-COBL1-1:1; Inc-COLQ-1:1; Inc-CTD-2054N24.2.1-1:1; Inc-DCAF10-2:1; Inc-DHX34-2:1; Inc-DTHD1-2:1; Inc-DYDC1-3:1; Inc-EVX1-5:3; Inc-EXOC4-2:1; Inc-EYS-2:1; Inc-F8A2-2:1; Inc-FAM72C-2:1; Inc-FOXN1-1:1; Inc-FURIN-1:1; Inc-FZD4-1:1; Inc-GOLPH3L-1:1; Inc-HIATL1-1:1; Inc-INTS8-1:1; Inc-INTS9-1:3; Inc-IRF2BPL-2:1; Inc-IRX3-4:5; Inc-JMJD7-PLA2G4B-1:2; Inc-JMJD7-PLA2G4B-2:1; Inc-KB-1980E6.3.1-1:2; Inc-KDM6A-1:3; Inc-KIAA0195-1:1; Inc-KIAA0319L-1:1; Inc-LOXL1-1:1; Inc-MAT2B-3:19; Inc-MAT2B-3:8; Inc-MBL2-2:3; Inc-MDM4-1:1; Inc-MLLT4-1:1; Inc-OIT3-2:1; Inc-PDCD11-1:1; Inc-PDE2A-1:1; Inc-PGR-1:1; Inc-PHF3-1:1; Inc-PHGHDH-2:1; Inc-PRAGMIN.1-3:3; Inc-QKI-5:1; Inc-RASSF7-1:1; Inc-RP11-293M10.1.1-1:1; Inc-RP3-377D14.1.1-3:12; Inc-RPL1-1:14; Inc-RPL1-1:15; Inc-SLC2A9-1:1; Inc-SLC38A8-4:2; Inc-SLC3A2-2:1; Inc-SRBD1-1:1; Inc-STK32C-2:1; Inc-THNSL1-2:1; Inc-TMEM140-1:1; Inc-TNFAIP8L1-1:1; Inc-TRAPPC8-2:1; Inc-TRH-2:1; Inc-TULP4-1:1; Inc-VSIG2-1:1; Inc-WASF3-1:1; Inc-ZBBX-3:1; Inc-ZNF667-2:1; Inc-ZNF674-3:2; Inc-ZNF74-1:5; LNP1; LNX2; LOC100129203; LOC100130357; LOC100131347; LOC100288798; LOC100288911; LOC100289495;

<p>RP11-456K23.1; RP11-469M7.1; RP11-48B3.4; RP11-521C20.2; RP11-561O23.7; RP11-65J21.3; RP11-738O11.9; RP11-774O3.3; RP1-90G24.6; RP4-655J12.4; RP5-1198O20.4; RPL27A; RWDD4; S100P; SACS; SAP30; SASH1; SAT1; SCAP; SDCBP; SDCBPP1; SEC11C; SEC14L2; SEC24A; SEC24B; SEC24D; SEC61G; SEMA3C; SEPP1; SERPINE2; SETBP1; SGK1; SGK223; SGK3; SH3D21; SHROOM3; SIM2; SIPA1L2; SLAIN2; SLC16A1; SLC16A6; SLC22A1; SLC22A17; SLC22A23; SLC25A20; SLC25A33; SLC25A37; SLC25A40; SLC26A2; SLC2A1; SLC30A7; SLC33A1; SLC35F2; SLC35G5; SLC39A10; SLC39A14; SLC39A7; SLC41A1; SLC43A1; SLC45A3; SLC4A4; SLCO2A1; SLF1; SLIT3; SMAD9; SMAGP; SMIM13; SMPD2; SMPD4; SMS; SNAP23; SNORA19; SNORA30; SNORA80A; SNORD90; SOCS2; SOCS2-AS1; SORD; SP9; SPATA13; SPATC1L; SPATS2L; SPCS3; SPDEF; SPDYA; SPHAR; SPRED1; SPTB; SRF; SSR3; SSX2IP; ST20-AS1; ST6GAL1; ST6GALNAC1; STARD3NL; STK17B; STK39; SULT1C3; SUN2; SWT1; SYNJ1; SYT4; SYTL1; TACSTD2; TAF1A; TAOK3; TARP; TARS; TASP1; TBC1D1; TBC1D4; TBC1D8; TBRG1; TBX2; TBXAS1; TCAF1; TCAF2; TCONS_I2_00006720; TCONS_I2_00017540; TCONS_I2_00018295; TCONS_I2_00018296; TCONS_I2_00028266; TENM1; TEX2; TG; THC2568408; THC2610134; THC2626681; THC2636494; THC2665222; THC2685534; THC2719114; THRAP3; THRB; THSD7A; THUMPD1; THYN1; TIPARP; TM4SF1; TMCC3; TMED9; TMEFF2; TMEM100; TMEM164; TMEM79; TMEM87A; TMEM87B; TMPRSS2; TNFAIP3; TNFAIP8; TNFRSF19; TNK2; TPD52; TRAPPC11; TRG-AS1; TRIB2; TRIM24; TRIM36; TRIM48; TRIM49; TRIM49B; TRIM49D1; TRIM51; TRIM53AP; TRMT6; TRPM7; TSKU; TTC12; TTC5; TTN; TUBA3C; TUBA3D; TUBA3FP; TUBA3GP; TWIST1; TXNDC16; U71363; UAP1; UBE2G1; UBE2J1; UBE2NL; UGT1A6; UGT2B7; UHRF2; UHRF2P1; USP10; USP8; VEGFA; VGF; VIMP; VLDLR; VLDLR-AS1; VSTM2A; WDR41; WDYHV1; WIPI1; WNT7B; WTH3D1; WTIP; WWC1; XM_003959913; XR_109259; XR_109894; XR_171099; XR_242328; XR_242411; XR_424109; XR_428440; XR_433669; ZBED3-AS1; ZBTB1; ZBTB10; ZBTB16; ZBTB24; ZBTB44; ZC3HAV1; ZCCHC6; ZDHHHC8P1; ZHX1; ZNF18; ZNF385B; ZNF532; ZNF652; ZNF69; ZNF814; ZNRF2; ZNRF2P1; ZP1.</p>	<p>LOC100505478; LOC100506082; LOC100506476; LOC100506990; LOC100507487; LOC100996255; LOC100996455; LOC101927056; LOC101927571; LOC101927822; LOC101928103; LOC101929395; LOC101929633; LOC155060; LOC257396; LOC283575; LOC388242; LOC400958; LOC401585; LOC642929; LOC643072; LOC643770; LOC646214; LOC650293; LOC728730; LPCAT4; LRIG3; LRRC20; LRRC31; LRRC4C; LRRC75A; LRRC9; LRRN1; LTF; LTN1; LUZP2; LYN; MACF1; MAGI3; MAL; MAN1C1; MANBA; MANEA; MANEA-AS1; MAP2K6; MAP3K13; MAP3K8; MAPK4; MAPRE2; MATN2; MB21D2; MCAM; MCF2L; MCTP1; MCU; MECOM; MED14OS; MET; METTL15; MEX3B; MF12-AS1; MGC16275; MIR4697HG; MIR600HG; MMP16; MMP24; MNX1; MNX1-AS1; MORC3; MOV10L1; MRC2; MRS2; MT1DP; MTMR9L; MUT; MX1; MYB; MYH10; MYLK; MYNN; MYRIP; MYT1; MYZAP; NAB1; NABP1; NAIP; NANOS1; NAP1L3; NAPEPLD; NAT8L; NCOA7; NDUFAF4; NEK1; NEK6; NET3; NETO1; NEURL3; NINL; NIPAL1; NIPSNAP3A; NIPSNAP3B; NKAPP1; NKD2; NLGN4X; NLRC3; NOV; NOVA1; NPAS1; NR_024011; NR3C1; NR3C2; NR4A2; NREP; NRG3; NRIP3; NRXN1; NSG1; NTN4; NUAK1; NUAK2; NUDT8; NUTM2F; OCLN; OGFR1; OPRK1; OPTN; OR51E1; OSBPL10; OSR2; OXTR; P2RX7; PABPC5; PAG1; PAK2; PAN3-AS1; PAPP; PARP8; PAX1; PBX1; PBXIP1; PCDH11X; PCED1B; PDE4D; PDE4DIP; PDGFRL; PDLIM3; PDZK1IP1; PEG3; PELI2; PGM2L1; PGM5P2; PHF12; PHLPP1; PIGZ; PIK3IP1; PIK3IP1-AS1; PIK3R3; PITX1; PKIA; PKIB; PKNOX2; PLA2G2A; PLA2G4D; PLCB2; PLCB4; PLD6; PLEKHA2; PLGLB1; PLIN4; PLS1; PMP22; PMS2; PPP1R14C; PPP2R2A; PRAC2; PRDM12; PRKAG2-AS1; PRKD1; PRKG2; PRSS16; PRSS23; PSAT1; PSAT1P1; PSAT1P3; PTPRK; PTPRR; PURA; RAB17; RAB19; RAB33A; RAB37; RABL3; RAD21-AS1; RAI14; RANBP3L; RAP1GDS1; RAP2B; RAP2C-AS1; RARRES3; RASA4; RASL11B; RASSF2; RASSF5; RASSF8-AS1; RBP5; RBPMS; RCAN2; RCAN3; RDM1; REEP1; RELB; RFX3-AS1; RGL1; RGS10; RHBG; RHOH; RIMS1; RMDN1; RNASEL; RNF125; RNF144B; RNF157-AS1; RNF43; RNFT2; ROR2; RP11-1000B6.3; RP11-1023L17.1; RP11-1081M5.1; RP11-1081M5.2; RP11-119D9.1; RP11-12K11.2; RP11-253M7.4; RP11-254F7.2; RP11-267A15.1; RP11-299H21.1; RP11-319E16.2; RP11-319F12.2; RP11-329B9.4; RP11-356J5.12; RP11-379B8.1; RP11-383J24.6; RP11-401P9.4; RP11-421M1.8; RP11-450H5.1; RP11-457M11.5; RP11-45M22.5; RP11-493L12.4; RP11-499E18.1; RP11-539L10.2; RP11-578F21.6; RP11-57A19.2; RP11-629O1.2; RP11-657O9.1; RP11-666A20.4; RP11-699A5.2; RP11-725D20.1; RP11-760H22.2; RP11-77P16.4; RP11-85M11.2; RP11-888D10.3; RP11-98G7.1; RP13-726E6.1; RP13-941N14.1; RP1-65J11.1; RP4-800G7.2; RPS6KA5; RPS6KL1; RSNB1L-AS1; RTN4R; RTN4RL1; RYR2; S100A3; SCAI; SCGB1D1; SCGB1D2; SCHIP1; SCNN1D; SDAD1P1; SDC3; SDC4; SELL; SEMA5B; SEPT6; SERAC1; SERPINB5; SERPINI1; SESN3; SFR1; SH2D3C; SH3BGR2; SH3BP5; SH3RF1; SHC3; SHC4; SHISA3; SI; SKAP2; SLC12A2; SLC12A6; SLC16A14; SLC16A7; SLC18B1; SLC1A7; SLC20A2; SLC22A10; SLC22A11; SLC23A1; SLC2A13; SLC30A3; SLC35F3; SLC38A9; SLC40A1; SLC44A1; SLC51A; SLC52A3; SLC6A12; SLC6A13; SLC7A2; SLCO5A1; SLITRK3; SMA4; SMAD3; SMC6; SMIM3; SNAI3; SNRK; SNRK-AS1; SNX18P3; SNX18P7; SNX22; SOBP; SOGA3; SORBS1; SORBS2; SORL1; SOWAHB; SOX11; SPAG5-AS1; SPTAN1; SPTLC3; SRCIN1; SRGAP2; SRGAP2B; SRGAP3; SRP14-AS1; SSBP2; ST3GAL1;</p>
--	--

ST5; ST7; ST7-AS1; ST7-OT4; ST8SIA4; STAC; STARD5; STK3;
 STOX1; STOX2; STRBP; STXBP5L; STXBP6; SULF2; SUSD4;
 SUSD6; SVIL; SYBU; SYNE1; SYNE2; SYNPO; SYTL2; TAL2;
 TARBP1; TARSL2; TBX10; TBX19; TCF7L2;
 TCONS_I2_00000198; TCONS_I2_00000562;
 TCONS_I2_00001498; TCONS_I2_00007046;
 TCONS_I2_00008795; TCONS_I2_00008799;
 TCONS_I2_00008879; TCONS_I2_00008962;
 TCONS_I2_00017138; TCONS_I2_00017422;
 TCONS_I2_00018853; TCONS_I2_00018976;
 TCONS_I2_00019490; TCONS_I2_00020648;
 TCONS_I2_00020852; TCONS_I2_00021053;
 TCONS_I2_00022830; TCONS_I2_00022832;
 TCONS_I2_00023776; TCONS_I2_00028458;
 TCONS_I2_00028604; TCONS_I2_00028817;
 TCONS_I2_00029295; TCONS_I2_00029343; TCTEX1D4;
 TDP1; TFAP2A-AS1; TFF3; TGM3; THBS4; THC2471881;
 THC2507047; THC2537043; THC2548652; THC2563836;
 THC2567789; THC2600547; THC2601170; THC2644314;
 TIAM2; TIMP2; TLE1; TLE3; TLL1; TMCC2; TMEM116;
 TMEM117; TMEM144; TMEM158; TMEM181; TMEM266;
 TMEM38B; TMEM45A; TMEM51; TMPRSS6; TMSB4X;
 TNFRSF10D; TNFRSF11B; TNFRSF12A; TNFRSF21; TNFSF15;
 TNIK; TNRC6B; TNS1; TOX3; TP53INP1; TPCN1; TPPP; TPRXL;
 TRBV30; TRERF1; TRIB1; TRIM2; TRIM38; TRIM45; TRNP1;
 TRPS1; TSHZ1; TSHZ3; TSL; TSPAN10; TSPAN12; TSPAN5;
 TTBK1; TTBK2; TTN-AS1; TTTY14; TTTY6; TUBB8; TULP4;
 TYRP1; UACA; UBAC2-AS1; UBE2E1-AS1; UBE2Q2P1;
 UBE2Q2P3; UFL1; UGT2B10; UGT2B11; UGT2B15; UNC5B;
 USP3-AS1; VASH2; VAV3; VGLL4; VIPR2; VN1R108P; VOPP1;
 VPS13A; VPS13B; VPS54; VSTM2L; VTA1; VWA2; VWF;
 WASIR2; WEE2-AS1; WI2-85898F10.1; WLS; WNT4;
 XM_006723786; XR_109175; XR_111287; XR_158870;
 XR_159012; XR_241604; XR_241611; XR_242359;
 XR_242407; XR_242480; XR_244659; XR_244755;
 XR_245037; XR_245646; XR_246983; XR_250613;
 XR_251551; XR_251682; XR_252953; XR_424060;
 XR_424361; XR_424475; XR_425623; XR_425926;
 XR_426345; XR_426478; XR_426840; XR_431240;
 XR_432026; YPEL1; ZADH2; ZAK; ZBBX; ZBTB20; ZBTB43;
 ZC3H6; ZCWPW1; ZFHX2; ZFHX4; ZFP36L1; ZIC2; ZIC5;
 ZMAT1; ZMYND12; ZNF117; ZNF204P; ZNF365; ZNF575;
 ZNF658; ZNF703; ZNF81; ZSWIM4; ZSWIM5.

Tabela A2: Genes cuja expressão foi afetada pelo silenciamento do lincRNA *PVT1* em células LNCaP em cultura desprovida de ou suplementada com andrógeno (ver Figura 18).

Comparação	N. de genes	Genes
Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (+R1881) e Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (-R1881)	232	A_33_P3223860; A_33_P3301876; A_33_P3345031; AC024560.2; ACRC; ACTA1; ADAM20P1; ADRB1; AEN; AK025118; AK096098; AK123926; AK127152; ALB; ANXA1; ANXA2R; AREG; ARL4A; ARRC2; ASH1L-AS1; AURKAPS1; BBC3; BRD8; BRDT; BRI3; BTN3A1; BTN3A2; C1orf56; C2orf72; C2orf81; C4orf46; CARD9; CCNE2; CD3EAP; CD55; CDH26; CEACAM1; CEP135; CHAC1; CHRNA10; CLDN11; COX19; CTD-2292M16.8; CTXN1; CYP27A1; DCUN1D5; DDIAS; DHX58; DIEXF; DLX2; DNAAF3; DNHD1; DOK3; DTL; DTWD1; DUSP18; DYRK3; E2F7; ECM1; EFCAB3; EGR1; ENKUR; ERAP2; ESPL1; ESPNL; FAM155B; FAM187A; FAM209A; FAM46C; FAM71A; FAM81A; FAM84A; FAM87A; FAS; FAXDC2; FDXR; FGD3; FOXD4L5; FOXN4; FOXQ1; GADD45A; GATA6; GLS; GPRIN1; GPX8; GRM2; GSG2; GUCY1B2; HCLS1; HRK; IDI2-AS1; IER5; IFFO1; IFIT1; IL20RB; IQCD; IRS1; KCNIP2-AS1; KCNJ14; KIAA0408; KIAA1462; KIF2C; KLHL31; LAMB2P1; LIF; LINC00324; LINC00476; LINC01311; LINC01410; LMO2; Inc-AK5-1:1; Inc-AP000769.1-1:1; Inc-CERK-1:1; Inc-DCTD-1:1; Inc-DKK4-1:1; Inc-FAM72C-2:1; Inc-FAM98A-1:1; Inc-IDE-1:1; Inc-MATN2-2:1; Inc-MMRN1-2:1; Inc-MMRN1-2:2; Inc-MMRN1-2:5; Inc-NDST2-3:1; Inc-NT5DC3-1:1; Inc-OBFC2A-1:1; Inc-PITPNC1-1:1; Inc-PPM1D-1:1; Inc-RPL7L1-1:1; Inc-SEPT7L-1:1; Inc-SERPINC1-1:24; Inc-SLC39A8-1:1; Inc-SRBD1-1:1; Inc-TAF15-1:1; Inc-WNT1-2:1; Inc-WRAP73-1:1; LOC100506804; MCM10; MDM2; MESDC1; MIA; MORF4L2-AS1; MPZL2; MRM1; MS4A8; MTRF2; MTHFD2; MYB; NAB2; NABP1; NOV; NR2F1; ORC6; PAX1; PAX2; PDE4A; PDE4D; PDE4DIP; PGF; PHLDA1; PHLDA3; PIM2; PLAC8L1; PLK3; PMAIP1; PMP22; PPP1R27; PRKAG2-AS1; PTGES2-AS1; PTGFR; RASL11B; RBM26-AS1; REM2; RHBDF2; RHEBL1; RIN1; RNF19B; RP11-318C24.2; RP11-344N10.5; RP11-395G23.3; RP11-621L6.3; RPA4; RPRML; RRN3P2; SBSN; SCARNA8; SKA1; SLC18B1; SLC25A19; SLC25A36; SLC29A1; SLC7A2; SNHG1; SNHG12; SNORA26; SNORA3B; SNORA8; SNORD103A; SNORD21; SNORD43; SNORD47; SNORD84; SNORD86; SOGA3; SPG7; SPRY1; STC2; TBX2; TCONS_J2_00009373; TCONS_J2_00020648; TFAP2A-AS1; THC2667604; THC2724751; TICRR; TIGAR; TLR3; TMED6; TMEM243; TNFSF10; TNFSF9; TOR4A; TSPAN12; TTR; UBAP2; UHRF1; WDR66; XR_241982; ZC3H12C; ZFP36L2; ZGLP1; ZNF124; ZNF215; ZNF436-AS1
Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (+R1881)	426	A_21_P0014946; A_32_P88905; A_33_P3218504; A_33_P3334043; A_33_P3346526; A_33_P3404759; A_33_P3424347; ABT1; AC092620.3; AC093382.1; AC108488.4; ACKR3; ACTA2; ADH1C; ADM; AGBL5-AS1; AJUBA; AK093004; AK095428; AK095971; AK096487; AK096649; AK097098; AK098491; AK123449; AK124361; AK126805; AK289844; AK294208; AMIGO3; AMOTL2; ANG; ANKRD16; ANKRD34A; ANKRD50; ANP32E; AQP10; ARHGAP32; ARL4D; ARMCX6; ASB13; ASNSP1; ASPM; AY129018; BAX; BBS12; BC029571; BC050402; BEX5; BF515046; BI056255; BIRC3; BMF; BRIP1; BTG2; C10orf10; C11orf95; C12orf66; C4orf47; C8orf48; CAPN10-AS1; CARD8; CBLN2; CBR3; CCDC103; CCDC34; CCNO; CD83; CDADC1; CDCA7L; CDH24; CDKL1; CDKN1A; CEP120; CEP152; CEP162; CERK; CHKB-AS1; CHML; CLCN5; CLDN23; CLPTM1; CNKSR3; COLCA1; COLGALT1; CRNDE; CRYGS; CSRNP2; CTD-231912.4; CUZD1; CYP2J2; DAND5; DCLRE1B; DDX11L16; DESI2; DNAH11; DNMT3A; DRAIC; DRAM1; DSC1; DSC2; DUSP4; DYRK2; EEF1DP3; EID2B; EMC3-AS1; ENC1; ENST00000621052; ENST00000623723; ERICH2; ETS2; EXPH5; F2R; FAM155A-IT1; FAM177A1; FAM198B; FAM212B; FAM217B; FAM229B; FAM50B; FGD6; FIGN; FOS; FOXD3; FOXO4; FOXO6; FRMD4B; FSCN1; FSD1L; FZD7; FZD8; GDPGP1; GEMIN2; GIGYF1; GIMAP2; GIT1; GJB2; GJC1; GNPD1; GPAT3; GRHL3; HACD1; HAGLROS; HAS3; HAUS6; HEG1; HES6; HMBBOX1; HMOX1; HNRNPLL; HOXA11-AS; HOXA7; HOXA9; HOXB5; HOXB6; HSD17B6; IFI44; IFIT2; IFIT5; IFITM1; IGSF9; IKBIP; ING1; IRF1; IRX2; IRX3; IRX5; ITPRIP; KB-1460A1.5; KCNS3; KDM6B; KDSR; KIAA0040; KIAA1841; KIF23; KIF25; KIFC1; KITLG; KLF6; KLHL24; KLLN; LFNG; LGI2; LIN9; LINC00662; LINC01011; LINC01089; LINC01315; LMO4; Inc-AL035696.1-5:1; Inc-APOC3-2:1; Inc-C11orf1-1:1; Inc-C17orf62-2:1; Inc-C21orf58-1:1; Inc-C2orf78-1:1; Inc-C6orf192-1:1; Inc-C9orf103-3:1; Inc-C9orf80-1:2; Inc-CCKAR-1:1; Inc-CENPP-1:1; Inc-CLK4-1:1; Inc-COP22-1:2; Inc-DNAJC11-1:1; Inc-EIF2D-1:1; Inc-

		<p>ERP44-3:3; lnc-EYS-2:1; lnc-FAM46D-1:1; lnc-GNS-2:1; lnc-HCRTR1-1:1; lnc-INTS8-1:1; lnc-INTS9-1:3; lnc-IRX3-4:5; lnc-KBTBD6-1:1; lnc-MAPK8IP2-1:12; lnc-MAPK8IP2-1:5; lnc-MCCC2-2:2; lnc-MMRN1-2:6; lnc-MTA2-1:1; lnc-NME4-1:2; lnc-OBFC1-2:2; lnc-OIT3-2:1; lnc-OTOGL-1:1; lnc-PHF3-1:1; lnc-PLEKHA5-1:1; lnc-PRKRIR-1:2; lnc-RALGDS-2:1; lnc-RHOJ-1:1; lnc-RNF125-2:1; lnc-RPLP1-1:14; lnc-RPLP1-1:15; lnc-RPP30-2:1; lnc-RSBN1L-1:1; lnc-SEH1L-1:1; lnc-SEMA6C-1:1; lnc-SFN-1:1; lnc-SOX6-1:1; lnc-SPIRE2-1:1; lnc-TCF19-1:4; lnc-TCL1B-2:1; lnc-TDRD5-1:1; lnc-TTR-1:1; lnc-UQCRFS1-7:1; lnc-ZNF717-1:1; lnc-ZNF74-1:5; lnc-ZSCAN10-3:4; LOC100270804; LOC100288911; LOC100506127; LOC100506302; LOC101929516; LOC388692; LOC399815; LOC400958; LPCAT4; LRIG3; LRP11; LSM3; LTF; MAFB; MAP3K8; MAP7D3; MCM4; MCM9; MEX3B; MNX1; MYO1B; NAA38; NCOA7; NDC1; NEAT1; NEMP1; NET1; NEURL3; NFKBID; NIPAL1; NM_001099435; NR_024011; NR1D1; NR3C1; NRARP; NREP; NRG4; NT5DC3; NUAK2; OAF; ORC1; OSR2; P2RX7; PABPC5; PAG1; PAN3-AS1; PANX1; PDLIM3; PELI1; PER2; PGM2L1; PLEKHO1; PLGLB1; PLK2; POGLUT1; POLR3G; PRDM12; PRPF4; PSAT1; PSAT1P1; PSAT1P3; PTCH1; RAB30-AS1; RAP2B; RASIP1; RASSF2; RASSF5; RAVR1; RBM38; RBM43; RDM1; RIPK1; RMI2; RNF125; RNF144B; RNF146; RP11-1007024.2; RP11-1055B8.4; RP11-150012.3; RP11-18H7.1; RP11-206L10.9; RP11-227G15.8; RP11-253M7.4; RP11-304L19.12; RP11-363J20.1; RP11-45M22.5; RP11-486G15.2; RP11-57A19.2; RP11-705O1.8; RP13-516M14.1; RTN3; SAV1; SCARNA23; SCGB1D2; SERPINB5; SERPINC1; SESN2; SF3B4; SH3BGR2; SIX1; SIX4; SLC22A10; SMC6; SNHG21; SNHG4; SNORA61; SOCS1; SOWAHD; SOX8; SPATA41; SPOCK2; SPRED3; ST8SIA4; STIM2; STK38; TAF5L; TAP1; TBX2-AS1; TCONS_I2_00006779; TCONS_I2_00006780; TCONS_I2_00011380; TCONS_I2_00013803; TCONS_I2_00014848; TCONS_I2_00017138; TCONS_I2_00020645; TCONS_I2_00020647; TCONS_I2_00029338; TCONS_I2_00029343; TERF2; TGFBI; TGIF1; THC2601170; THC2674845; TIGD3; TLE1; TNFRSF21; TOR1B; TP53; TPM3; TPTE; TRAF5; TRIB1; TRIM2; TRIM45; TSNAXIP1; TUBBP5; TYMS; TYMSOS; ULBP1; UNC93B1; UQCRB; USP27X; VASH1; VIM-AS1; WEE1; XM_005255122; XR_108380; XR_109753; XR_243166; XR_424187; XR_424475; XR_425268; XR_426337; ZAR1L; ZBTB26; ZFP14; ZNF219; ZNF28; ZNF383; ZNF404; ZNF425; ZNF585A; ZNF658; ZNF713; ZNF79; ZNF845; ZNF850; ZNF878; ZPLD1; ZSCAN12; ZSCAN16-AS1</p>
Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA PVT1 (-R1881)	164	<p>A_21_P0014692; A_21_P0014749; A_33_P3300117; A_33_P3367970; A_33_P3484775; AC084809.3; AC087491.2; AK022341; AK055942; AK123993; ALKBH8; AMER1; AOC2; APOE; BC008289; BC110990; BREA2; BZW2; C18orf54; C8G; CCDC177; CDC42EP2; CDK2; CXCR4; DSG1-AS1; EBPL; EID3; ENKD1; ENST00000614063; ERVMER34-1; EXO1; FAHD2A; FXJ1; FOXN2; FRMD8; GABPB1-AS1; GAN; GAPLINC; GNRH1; GP1BB; GPR75; HAPLN3; HES7; HIST1H4K; HIST1H4K; HIST2H3A; HSPB2; ICOSLG; IFI6; IGF2BP1; IGFBP5; IHH; IP6K2; ITGA10; KIF18A; KLF4; KLHL11; LINC01167; lnc-ANKH-1:3; lnc-ASH2L-1:1; lnc-CPN2-3:1; lnc-EIF2AK4-4:1; lnc-EIF4EBP1-1:1; lnc-FAM3A-1:1; lnc-GATAD1-2:2; lnc-HLA-DMA-1:1; lnc-NDFIP1-1:1; lnc-PDE2A-1:1; lnc-SNX33-1:1; LOC101927482; LOC101928891; LRRC73; MARVELD1; MDM1; METTL1; MFSD2A; MIR17HG; MSL1; MTMR11; MYBPHL; NAA35; NACC2; NOP56; NR2C2AP; PCDH20; PFKFB2; PID1; PNP; POLR1C; PPM1D; PPRC1; PRR22; PSPN; PTGER4; RAB36; RASL11A; RDH10; RDX; RECQL4; RGS16; RNF112; RNU6ATAC; RP11-1275H24.1; RP11-159D12.2; RP11-359M6.3; RP11-655M14.13; RP4-564F22.5; RPL32; SCARF2; SCARNA11; SCARNA14; SCARNA18; SCARNA3; SGK223; SGOL1; SKIL; SLC17A4; SLC1A3; SNHG15; SNHG17; SNORA13; SNORA14B; SNORA2A; SNORA30; SNORA36B; SNORA38; SNORA40; SNORA41; SNORA44; SNORA46; SNORA50C; SNORA57; SNORA5A; SNORA5B; SNORA63; SNORA65; SNORA68; SNORA74B; SNORA79; SNORA80A; SNORA80B; SNORA84; SNORD104; SNORD62A; SNORD64; SNORD76; SNORD99; SPEF1; STX2; TCL1B; TCONS_I2_00000969; TCONS_I2_00006103; TCONS_I2_00019714; TCP10L; TFF1; TGM1; THC2756939; TPM2; VTRNA1-2; VTRNA1-3; VWCE; ZMYND10; ZNF169; ZNF577</p>
Diminuição da expressão com silenciamento de lincRNA PVT1 (+R1881) e	232	<p>AC093642.3; ACP; ADAL; ADCY1; ADGRV1; AF131217.1; AK125979; AL035610.2; ALG14; ANK3; ANKIB1; ANTXR1; AP000473.5; APBA2; ARHGAP29; ARHGAP35; ARHGAP6; ARHGEF10; ARL8B; ARNT2; ASAP1; ATHL1; ATP2C2; ATXN7L1; AUH; B9D1; BMP6; BTBD9; C11orf80; C5orf28; C8orf37-AS1; CA5BP1; CAB39; CASC4; CCDC88C; CDKAL1; CGNL1; CHMP3; COA1; COMMD1; CRADD; CREBL2; CRYBG3; CSPP1; CUX1;</p>

Diminuição da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (-R1881)		DAPK2; DCAF6; DGCR5; DIAPH2; DIAPH3; DISC1; DLEU1; DOCK1; DOCK4; EFR3A; EIF2AK2; ENST00000612111; EPHA3; EPHB2; ERI3; EXOC4; EXOC7; FAM118A; FAM171A1; FAR2P1; FARP2; FBXL17; FGF13; FGFRL1; FHOD3; FMO4; FOXN3; GALNT10; GALNT16; GFOD1; GLB1L; GMDS; GMDS-AS1; GOLGA8A; GPATCH2; GPC6; GRIK2; GYG2P1; HDAC8; HIVEP3; HOOK1; HS6ST2; ICA1; IMM2P2; INPP4A; INPP5A; JAZF1; KALRN; KCND2; KCNMA1; KDM4B; KDM4C; KIAA0556; KIF13B; LINC00858; LINC00882; LINC01029; LMBR1; linc-C20orf197-3:13; linc-EXOC4-1:1; linc-EXOC4-2:1; linc-MAGEB10-2:1; linc-MBL2-2:3; linc-WRNIP1-2:35; linc-WRNIP1-2:9; linc-ZBBX-3:1; LOC100288798; LOC100507291; LOC101927056; LOC101927282; LOC339862; LOC728730; LRRC40; LRRN3; MAP2K4; MAP2K5; MED27; MFF; MIR99AHG; MKL1; MPP6; MSI2; MSRA; MYLK; NAALADL2; NEFH; NLGN1; NLGN4Y; NM_005042; NRXN1; NSMAF; PBX1; PCCA; PDK3; PDPK1; PDSS2; PDZRN3; PIK3CB; PKNOX2; PLCB4; POLA1; POTES; POTEI; PPARA; PPARG; PPM1H; PPP2R2C; PRKCE; PRUNE2; PSMF1; PTPRG; PVT1; RABGAP1; RABGAP1L; RALGPS1; RALYL; RANBP3L; RAPGEF1; ROR1; RP11-122G18.5; RP11-266A24.1; RP11-38M15.11; RPS6KA3; RPS6KA5; RPTOR; RSRC1; RTN4RL1; SBF2; SCFD2; SEMA4F; SEPT11; SESTD1; SETD3; SH3PXD2A; SHANK2; SIL1; SLC24A1; SLC24A3; SMYD3; SNX14; SNX29; SRP14-AS1; SRRM1; SRRM2-AS1; ST3GAL3; STAG2; STK32C; STK33; STYK1; SUS4; TARSL2; TBC1D22A; TBL1X; TCF4; TCONS_I2_00001492; TCONS_I2_00017189; TCONS_I2_00025015; TENM1; TENM2; TLL1; TMEM222; TMEM242; TMEM266; TMTC2; TNFSF4; TTC28; TTC7B; TYRP1; UBAC2; UBE2E2; USP25; USP31; VAC14; WDR11; WDR7; WNT7B; WWC1; XR_110931; XR_426478; XR_430630; YPEL1; ZBBX; ZBTB20; ZDHHC14; ZFAND3; ZFYVE28; ZNF385B
Diminuição da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (+R1881)	278	A_21_P0013943; AC133680.1; ACRV1; ACTN1; ACYP2; ADGRG6; AFF3; AK022088; AK128032; AK130248; AK130387; AK5; AK8; ALCAM; ANKRD20A11P; ANKRD37; AP4S1; APBA1; ARFGF2; ARHGAP27; ARHGAP28; ARHGAP44; ARHGAF10L; ARHGAF16; ARID1B; ATE1; ATF7; ATG4A; ATP6V0E2-AS1; BC029857; BQ082135; C10orf76; C16orf72; C1orf21; CCNA1H; CAMK2B; CASZ1; CCDC138; CCDC146; CCDC183; CCDC50; CCDC53; CCDC90B; CD99L2; CDC14B; CEP44; CERS6; CHST11; COL27A1; COL4A5; COL4A6; COLEC12; COX7B2; CPAMD8; CPLX3; CPNE7; CPSF1; CREB3L4; CTC-228N24.3; CTD-2384A14.2; CYP4F30P; DCLK2; DENND1A; DENND5B; DEPDC1B; DHRS2; DHX36; DHX37; DIS3L; DISP2; DNAJB12; DNAJC1; DNASE2B; DNTTIP2; DOCK5; DYM; EAF2; EDA; EFNA5; EHMT1; EIF2B3; EIF3H; ENOX1; ENST00000624918; ENTPD5; EVI5; FAM172A; FAM189A1; FAM221A; FAR2P2; FBXO25; FGGY; FMR1NB; FTO; GABPB1; GALNT18; GATS; GNAZ; GOLGA4; GOLGA6A; GOLGA8R; GPR158; GULP1; HHAT; HIF1A; HIPK2; HLCS; HUWE1; IFT140; IGF1R; IL1RAPL1; IRAK1; ITGA9-AS1; KATNAL2; KCNC2; KCNHB8; KDM6A; KIAA0355; KIAA1328; KLHL29; KTN1; LA16c-380H5.4; LAMA3; LARP4B; LIN7A; LINC01372; linc-BAI1-1:1; linc-FMOD-2:1; linc-FSIP1-1:1; linc-MAT2B-3:8; linc-MIPOL1-2:1; linc-MIPOL1-4:1; linc-MYC-2:22; linc-NLGN1-1:6; linc-OSBPL9-1:1; linc-RP3-377D14.1.1-4:1; linc-SMCR7L-1:1; linc-SNURF-1:1; linc-SREK1-2:1; linc-WRNIP1-2:20; LOC102723927; LOC284930; LOC286437; LOC440910; LPP; LRIG1; LRP8; LRRC20; LTA4H; LUZP2; M6PR; MAML3; MBOAT2; MCTP2; MGAT5; MGC39584; MICAL3; MMP11; MOCOS; MUC4; NCK1-AS1; NEBL; NEK11; NFATC1; NINL; NLGN4X; NME3; NOSTRIN; NPDC1; NPRL3; NRP1; NTNG1; OBSCN; OLA1; OR8A1; OTUD7A; P3H2; PAXBP1-AS1; PEBP4; PI4KA; PI4KAP2; PIGK; PIR; PKN2; PLCB1; POLR1A; POTES3; POTES; PRKACB; PRKCH; PRR4; PTPN14; PTPN21; PTPRM; PTPRN2; PUDP; RALY; RARB; RBKS; REXO2; RFX2; RP11-1038A11.1; RP11-30J20.1; RP11-323I15.2; RP11-476K15.1; RP11-624L4.1; RP11-738O11.9; RP1-65J11.1; RP1-90G24.6; RP4-742C19.12; RXRA; SAMD12; SAP130; SCHLAP1; SENP7; SEPT9; SERGEF; SETBP1; SGMS1; SLC13A3; SLC22A18; SLC22A23; SLC25A21; SLC26A10; SMOCC2; SMU1; SPIDR; SPIRE2; SRGAP2; ST3GAL5; ST7; STK39; SYT7; TANGO2; TBC1D1; TBL1Y; TCONS_I2_00000562; TCONS_I2_00001494; TCONS_I2_00017422; TECPR1; TFPI; TG; THBS3; THC2616237; THRB; THSD7A; TMEM229B; TMEM241; TOM1L2; TPT1-AS1; TRAPPC9; TRIM48; TRIM49D1; TRIM53AP; TSHZ3; TTC12; TTC6; U2AF1; UBE4A; UMAD1; VPS37B; VT11A; XIAP; XM_006720346; XR_241611; XR_424539; YPEL2; ZACN; ZC3H3; ZC4H2; ZDBF2; ZFH3; ZHX2; ZMIZ1; ZMYM4; ZNF146; ZNF585B; ZNF652
Diminuição da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (-	204	A_21_P0014213; A_33_P3222600; AC010967.2; AC098973.2; ACAT1; ACER3; ACTN3; ADAMTS17; ADD1; AFF1; AGAP1; AIDA; AK123308; AK130873; AL117431; AMN1; ANKRD20A12P; ANKRD20A2; ANKRD44; ANXA6; APMAP; ARL15; ARMC9; ASAP2; ASTN2; ATP9B; BCAS1; BCAS3; BLMH; C1orf95; CA12; CAMKMT; CFAP44; CHCHD3;

R1881)	<p> CNBD1; COLQ; CTD-2001C12.1; CTD-2151A2.1; CTPS2; CUEDC1; DDO; DENND1B; DEPTOR; DIO3; DIS3L2; DPP4; DSCR3; EEF1A1; EEFSEC; EML5; ERC1; ERCC6L2; ERGIC1; ERMAP; FAM3B; FARP1; FBLN7; FBXL7; FER; FOXO4; FRMD5; FRMPD2; FZD6; GALNT11; GAS6; GBA3; GOLGA6L4; GOLGA6L9; GOLGA8J; GPA33; GRIK1; GRK5; GUCD1; HIRA; HIST2H2BE; INADL; ITPK1; ITPR1; KCNAB2; KCNK13; KCNU1; KDM5B; KIAA1033; KIAA1217; KLHL13; LACE1; LARGE; LHPP; LINC00565; LINC01006; LINC01354; LINGO3; lnc-ADAM30-1:1; lnc-ARID2-3:1; lnc-C11orf39-3:1; lnc-C17orf46- 1:1; lnc-HIATL1-1:1; lnc-PEX2-3:1; lnc-PLCD1-1:6; lnc-TRAP1-1:1; lnc-TRH-2:1; lnc- WDR7-6:1; LOC100130587; LOC101929633; LOC401052; LOC553103; LRP1; LRRC42; LYPD6B; MAGI1; MAPK10; MATN2; MBD5; MECOM; MEGF8; MFN2; MFSDB; NACAD; NAP1L4; NCAPG2; NDRG3; NEU4; NIPAL3; NIPSNAP3B; NRG3; NXN; OPRK1; OSBP2; OTUD5; PALLD; PANK3; PITPNM3; PKIB; PLA2G4F; PLCG2; PLEKHB2; PLXDC2; PPFIA1; PPIP5K1; PTK2; PTPN13; PTPRR; RAP2C-AS1; ROR2; RP11-166P13.3; RP11-305L7.1; RP11-319F12.2; RP11-379B8.1; RP11-452F19.3; RP11-456O19.2; RP11-548L20.1; RP11-666A20.4; RP11-723O4.6; RPS6KA2; RRBP1; RTN1; RYR2; SDC3; SEC23A; SECISBP2; SHISA3; SHROOM2; SLC16A7; SLC38A6; SLC5A1; SMARCB1; SMPDL3A; SNAP47; SNRK; SORBS2; SPG11; SSH1; STAG3L4; STIM1; STX18-AS1; STXBP4; STYXL1; SYT17; TCONS_I2_00012688; TCONS_I2_00016154; TCONS_I2_00018853; TCONS_I2_00018976; TGM3; TJP2; TMEM210; TMEM245; TNIK; TPK1; TRAM2; TRMT2B; TSPAN9; TXNRD2; TYW1; VPS13A; WNK2; XR_242359; XR_242407; XR_246983; XR_425926; XR_428452; XR_431240; ZAK; ZBED3-AS1; ZMAT1 </p>
--------	---

Tabela A3: Comparação entre genes responsivos a andrógeno e diferencialmente expressos com o silenciamento do lincRNA *PVT1* (ver Figura 19).

Comparação	N. de genes	Genes
Diminuição da expressão por R1881 e Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (+R1881) e Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (-R1881)	34	C4orf46; CCNE2; CDH26; CHAC1; FAS; FGD3; FOXN4; FOXQ1; GATA6; GPX8; GUCY1B2; HRK; IER5; KIAA0408; KIAA1462; LIF; LINC00476; lnc-FAM72C-2:1; lnc-SRBD1-1:1; MYB; NABP1; NOV; PAX1; PDE4D; PDE4DIP; PMP22; PRKAG2-AS1; RASL11B; SLC18B1; SLC7A2; SOGA3; TCONS_I2_00020648; TFAP2A-AS1; TSPAN12
Diminuição da expressão por R1881 e Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (+R1881)	126	A_33_P3346526; ACKR3; ACTA2; ADM; AGBL5-AS1; AJUBA; AK124361; AMIGO3; ANKRD16; ANP32E; ARHGAP32; ARL4D; ASB13; ASNRP1; BIRC3; BMF; C10orf10; CBLN2; CBR3; CCNO; CD83; CERK; CLCN5; CNKSR3; COLCA1; DAND5; DDX11L16; DNAH11; DRAIC; DSC2; ENCL1; ENST00000623723; EXPH5; F2R; FAM198B; FAM212B; FAM217B; FAM229B; FGD6; FOXD3; FOXO4; FOXO6; FSCN1; GIMAP2; GJB2; GPAT3; HAGLROS; HEG1; HOXA11-AS; HOXA7; HOXA9; HOXB5; HOXB6; IFIT2; IFIT5; IFITM1; IRF1; IRX3; IRX5; KCNS3; KIF25; KITLG; KLHL24; KLLN; LFNG; lnc-CCKAR-1:1; lnc-EYS-2:1; lnc-INTS8-1:1; lnc-INTS9-1:3; lnc-IRX3-4:5; lnc-OIT3-2:1; lnc-PHF3-1:1; lnc-RPLP1-1:14; lnc-RPLP1-1:15; lnc-ZNF74-1:5; LOC100288911; LOC400958; LPCAT4; LRIG3; LTF; MAP3K8; MEX3B; MNX1; NCOA7; NET1; NEURL3; NIPAL1; NR_024011; NR3C1; NREP; NUAK2; OSR2; P2RX7; PABPC5; PAG1; PAN3-AS1; PDLIM3; PGM2L1; PRDM12; PSAT1; PSAT1P1; PSAT1P3; RAP2B; RASSF2; RASSF5; RDM1; RNF125; RNF144B; RP11-253M7.4; RP11-45M22.5; RP11-57A19.2; SCGB1D2; SERPINB5; SH3BGRL2; SLC22A10; SMC6; ST8SIA4; TCONS_I2_00017138; TCONS_I2_00029343; THC2601170; TLE1; TNFRSF21; TRIB1; TRIM2; TRIM45; XR_424475
Diminuição da expressão por R1881 e Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (-R1881)	1	lnc-PDE2A-1:1
Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (+R1881) e Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA <i>PVT1</i> (-R1881)	198	A_33_P3223860; A_33_P3301876; A_33_P3345031; AC024560.2; ACRC; ACTA1; ADAM20P1; ADRB1; AEN; AK025118; AK096098; AK123926; AK127152; ALB; ANXA1; ANXA2R; AREG; ARL4A; ARRC2; ASH1L-AS1; AURKAPS1; BBC3; BRD8; BRDT; BRI3; BTN3A1; BTN3A2; C1orf56; C2orf72; C2orf81; CARD9; CD3EAP; CD55; CEACAM1; CEP135; CHRNA10; CLDN11; COX19; CTD-2292M16.8; CTXN1; CYP27A1; DCUN1D5; DDIAS; DHX58; DIXF; DLX2; DNAAF3; DNHD1; DOK3; DTL; DTWD1; DUSP18; DYRK3; E2F7; ECM1; EFCAB3; EGR1; ENKUR; ERAP2; ESPL1; ESPNL; FAM155B; FAM187A; FAM209A; FAM46C; FAM71A; FAM81A; FAM84A; FAM87A; FAXDC2; FDXR; FOXD4L5; GADD45A; GLS; GPRIN1; GRM2; GSG2; HCLS1; IDI2-AS1; IFFO1; IFIT1; IL20RB; IQCD; IRS1; KCNIP2-AS1; KCNJ14; KIF2C; KLHL31; LAMB2P1; LINC00324; LINC01311; LINC01410; LMO2; lnc-AK5-1:1; lnc-AP000769.1-1:1; lnc-CERK-1:1; lnc-DCTD-1:1; lnc-DKK4-1:1; lnc-FAM98A-1:1; lnc-IDE-1:1; lnc-MATN2-2:1; lnc-MMRN1-2:1; lnc-MMRN1-2:2; lnc-MMRN1-2:5; lnc-NDST2-3:1; lnc-NT5DC3-1:1; lnc-OBFC2A-1:1; lnc-PITPNC1-1:1; lnc-PPM1D-1:1; lnc-RPL7L1-1:1; lnc-SEPT7L-1:1; lnc-SERPINC1-1:24; lnc-SLC39A8-1:1; lnc-TAF15-1:1; lnc-WNT1-2:1; lnc-WRAP73-1:1; LOC100506804; MCM10; MDM2; MESDC1; MIA; MORF4L2-AS1; MPZL2; MRM1; MS4A8; MTRF2; MTHFD2; NAB2; NR2F1; ORC6; PAX2; PDE4A; PGF; PHLDA1; PHLDA3; PIM2; PLAC8L1; PLK3; PMAIP1; PPP1R27; PTGES2-AS1; PTGFR; RBM26-AS1; REM2; RHBDF2; RHEBL1; RIN1; RNF19B; RP11-318C24.2; RP11-344N10.5; RP11-395G23.3; RP11-621L6.3; RPA4; RPRML; RRN3P2; SBSN; SCARNA8; SKA1; SLC25A19; SLC25A36; SLC29A1; SNHG1; SNHG12; SNORA26; SNORA3B; SNORA8; SNORD103A; SNORD21; SNORD43; SNORD47; SNORD84; SNORD86; SPG7; SPRY1; STC2; TBX2; TCONS_I2_00009373; THC2667604; THC2724751; TICRR; TIGAR; TLR3; TMED6; TMEM243; TNFSF10; TNFSF9; TOR4A; TTR; UBAP2; UHRF1; WDR66; XR_241982; ZC3H12C; ZFP36L2; ZGLP1; ZNF124; ZNF215; ZNF436-

		AS1
Diminuição da expressão por R1881	990	<p>A_21_P0014213; A_21_P0014894; A_32_P48615; A_33_P3222600; A_33_P3241150; A_33_P3265935; A_33_P3294078; A_33_P3311911; A_33_P3392350; A2M-AS1; ABCA1; ABCA12; ABCC5; ABCC6; ABCC6P1; ABCG1; ABLIM1; ABTB2; AC007562.1; AC010967.2; AC073283.4; AC093901.1; AC141928.1; ACAA2; ACADSB; ACTRT3; ADAM23; ADCY1; ADCY2; ADD2; ADGRB2; ADGRG6; ADGRV1; ADORA2B; ADRA2C; AEBP1; AGT; AHNAK2; AIDA; AK021734; AK058041; AK092862; AK123308; AK124859; AK125166; AK125979; AK129982; AKR1C1; AKR1C3; AL117431; AL523350; ALCAM; ALPK1; ALX4; AMIGO2; ANGPTL2; ANKRD18A; ANKRD18B; ANKRD20A11P; ANKRD20A12P; ANKRD20A2; ANKRD20A3; ANKRD20A5P; ANKRD20A8P; ANKRD20A9P; ANKRD28; ANKRD36B; ANKRD62P1; ANO2; ANPEP; ANTXR1; ANXA9; AOC1; AP000253.1; APBA1; APPLD1; APPL1; ARHGAP18; ARHGAP20; ARHGAP27; ARHGEF10; ARHGEF17; ARHGEF40; ASAP2; ASIC1; ASS1; ATG16L2; ATG3; ATOH7; ATP11A; ATP1B2; ATP2B1; ATP2B4; ATP8A1; ATXN7L1; AUTS2; BAHCC1; BAMBI; BANK1; BARD1; BASP1; BBS9; BC092495; BCAM; BCHE; BDH2; BEND5; BEND7; BEST1; BEST4; BFSP1; BHLHE41; BLNK; BMX; BRSK2; BTD; BTN2A2; BX648696; C12orf60; C14orf132; C14orf93; C16orf45; C16orf74; C16orf89; C18orf61; C1orf63; C1QTNF3; C1QTNF6; C1R; C1RL-AS1; C21orf58; C2orf15; C4orf32; C5orf30; C9orf92; CA12; CABLES1; CACNA1G; CACNB2; CADM1; CALD1; CAMK1D; CAMK2NB1; CAPRIN2; CAPS2; CARNS1; CASC1; CASC2; CCDC14; CCDC18-AS1; CCDC69; CCDC88B; CCDC93; CCNG2; CD24; CDH18; CDH3; CDHR3; CDK8; CDNF; CDON; CDR2L; CELA2A; CFAP70; CHADL; CHAF1B; CHN1; CHRM1; CLCN4; CLDND2; CNBD1; CNTN2; CNTN5; COBL; COBLL1; COL16A1; COL18A1; COL5A2; COL9A2; COL9A3; COLQ; COMP; CPAMD8; CRABP2; CREBRF; CROCCP2; CSMD1; CTBP1; CTD-2251F13.1; CTD-2342N23.3; CTTNBP2NL; CXorf36; CYTH3; DAPK2; DCBLD2; DCC2; DCHS1; DDB2; DDC; DDO; DDR2; DDX58; DENND1B; DENND3; DENND5B; DEPTOR; DFNA5; DGKH; DICER1-AS1; DIDO1; DIO3; DIXDC1; DLGAP1-AS3; DMKN; DNAH2; DOK1; DOK7; DPP4; DPYSL3; DQ786257; DSE; DSEL; DUSP26; DUSP6; EDN2; EFCAB11; EFHD1; EFR3B; EGLN3; ELFN2; ENOX1; ENPP4; ENPP5; ENST00000612143; ENST00000614678; ENST00000614987; ENST00000615792; ENST00000619168; ENST00000621666; ENST00000621996; ENST00000624675; ENTPD3; EPB41; EPB41L4A; EPHX1; EPS8; ERBB2; ESPN; ETV6; EXTL1; FALEC; FAM102A; FAM110C; FAM134B; FAM175A; FAM177B; FAM182B; FAM184A; FAM184B; FAM198A; FAM19A2; FAM201A; FAM221B; FAM224A; FAM47E; FAM49A; FAM78A; FANK1; FAXC; FBXL22; FBXL22; FBXO15; FCGR2C; FCN1; FEZ1; FGF13; FHOD3; FLJ31104; FLJ36000; FLJ43315; FMNL3; FOLH1; FOLH1B; FOXN3; FOXP4-AS1; FRMD5; FRMPD1; FRMPD2; FUT10; FUT8; FUT8-AS1; FYN; FZD2; FZD3; FZD4; GALNT10; GALNT14; GALNT18; GAREM1; GATS; GCA; GCG; GHRL; GIMAP6; GLCC1; GLCE; GLI3; GLIPR1L2; GLIS2; GLS2; GOLGA2P2Y; GOLGA2P6; GOLGA6L4; GOLGA6L9; GOLGA8R; GOLPH3L; GPER1; GPR137B; GPR20; GPR63; GPRIN2; GRAMD1C; GRB10; GRB14; GRIK1; GRIK2; GRK5; GS1-421I3.2; GSC; GSTA2; GSTA5; GUSBP1; GUSBP2; HACL1; HCG8; HEPACAM; HLA-DQB1; HOTAIRM1; HOXA10; HOXA3; HOXA5; HOXB-AS1; HOXC12; HOXC13-AS; HOXC4; HOXC5; HOXC8; HOXC9; HOXC-AS1; HOXC-AS3; HS6ST2; HSD17B7; HSPA12A; HSPA4L; HTR2C; HTRA1; IFIH1; IGFALS; IGIP; IGKV1-16; IGKV1D-8; IGKV1OR2-108; IKZF2; IKZF3; IL15; IL17C; IL17RB; IL17RD; IL1RAP; IL1RN; IL27RA; IL36G; IL4R; INHBB; INSIG2; INTS8; IQCH-AS1; IQCJ-SCHIP1; IRF2BPL; ITGB4; ITGB7; ITPKA; ITPR1; JAK3; JDP2; KALRN; KATNAL2; KCNAB2; KCNG1; KCNIP3; KCNJ3; KCNK13; KCNK5; KCNMB4; KCNU1; KDM4D; KDM6A; KHDRBS3; KHK; KIAA0922; KIAA1217; KIAA1257; KIAA1324; KIF21A; KIF3C; KIF5B; KLHL1; KLHL3; KMT2C; KSR2; LAMB1; LCN15; LETMD1; LIMA1; LIMS2; LINC00467; LINC00478; LINC00565; LINC00648; LINC00673; LINC00853; LINC00858; LINC00933; LINC01003; LINC01006; LINC01021; LINC01024; LINC01133; LINC01137; LINC01138; LINC01184; LINC01193; LINC01351; LINC01354; LINC01503; LINC01569; LINGO3; lnc-ACCSL-1:1; lnc-ACSS3-2:1; lnc-ACSS3-2:2; lnc-ADA-1:2; lnc-BDKRB1-1:1; lnc-BHLHE41-2:12; lnc-C11orf39-3:1; lnc-C12orf61-3:1; lnc-C1orf122-1:1; lnc-C1orf201-2:2; lnc-C1orf201-3:2; lnc-C5orf43-3:2; lnc-CCKAR-1:2; lnc-CCNE2-1:1; lnc-COBL1-1:1; lnc-COLQ-1:1; lnc-CTD-2054N24.2.1-1:1; lnc-DCAF10-2:1; lnc-DHX34-2:1; lnc-DTHD1-2:1; lnc-DYDC1-3:1; lnc-EVX1-5:3; lnc-EXOC4-2:1; lnc-F8A2-2:1; lnc-FOXN1-1:1; lnc-FURIN-1:1; lnc-FZD4-1:1; lnc-GOLPH3L-1:1; lnc-HIATL1-1:1; lnc-IRF2BPL-2:1; lnc-JMJD7-PLA2G4B-1:2; lnc-JMJD7-PLA2G4B-2:1; lnc-KB-1980E6.3.1-1:2; lnc-KDM6A-1:3; lnc-KIAA0195-1:1; lnc-KIAA0319L-1:1; lnc-LOXL1-1:1; lnc-MAT2B-3:19; lnc-MAT2B-3:8; lnc-MBL2-2:3; lnc-MDM4-1:1; lnc-MLLT4-1:1; lnc-PDCD11-1:1; lnc-PGR-1:1; lnc-PHGDH-2:1; lnc-PRAGMIN.1-3:3; lnc-QKI-5:1; lnc-RASSF7-1:1; lnc-RP11-293M10.1.1-1:1; lnc-RP3-377D14.1.1-3:12; lnc-SLC2A9-1:1; lnc-SLC38A8-4:2; lnc-SLC3A2-2:1; lnc-STK32C-2:1; lnc-THNSL1-2:1; lnc-TMEM140-1:1; lnc-TNFAIP8L1-1:1; lnc-TRAPPC8-2:1; lnc-TRH-2:1; lnc-TULP4-1:1; lnc-VSIG2-1:1; lnc-WASF3-1:1; lnc-ZBBX-3:1; lnc-ZNF667-2:1; lnc-ZNF674-3:2; LNP1; LNX2; LOC100129203;</p>

		<p>LOC100130357; LOC100131347; LOC100288798; LOC100289495; LOC100505478; LOC100506082; LOC100506476; LOC100506990; LOC100507487; LOC100996255; LOC100996455; LOC101927056; LOC101927571; LOC101927822; LOC101928103; LOC101929395; LOC101929633; LOC155060; LOC257396; LOC283575; LOC388242; LOC401585; LOC642929; LOC643072; LOC643770; LOC646214; LOC650293; LOC728730; LRRC20; LRRC31; LRRC4C; LRRC75A; LRRC9; LRRN1; LTN1; LUZP2; LYN; MACF1; MAGI3; MAL; MAN1C1; MANBA; MANEA; MANEA-AS1; MAP2K6; MAP3K13; MAPK4; MAPRE2; MATN2; MB21D2; MCAM; MCF2L; MCTP1; MCU; Mecom; MED14OS; MET; METTL15; MFI2-AS1; MGC16275; MIR4697HG; MIR600HG; MMP16; MMP24; MNX1-AS1; MORC3; MOV10L1; MRC2; MRS2; MT1DP; MTMR9LP; MUT; MX1; MYH10; MYLK; MYNN; MYRIP; MYT1; MYZAP; NAB1; NAIP; NANOS1; NAP1L3; NAPEPLD; NAT8L; NDUFAF4; NEK1; NEK6; NETO1; NINL; NIPSNAP3A; NIPSNAP3B; NKAPP1; NKD2; NLGN4X; NLRC3; NOVA1; NPAS1; NR3C2; NR4A2; NRG3; NRIP3; NRXN1; NSG1; NTN4; NUAK1; NUDT8; NUTM2F; OCLN; OGFRL1; OPRK1; OPTN; OR51E1; OSBPL10; OXTR; PAK2; PAPP; PARP8; PBX1; PBXIP1; PCDH11X; PCED1B; PDGFRL; PDZK1IP1; PEG3; PELI2; PGM5P2; PHF12; PHLPP1; PIGZ; PIK3IP1; PIK3IP1-AS1; PIK3R3; PITX1; PKIA; PKIB; PKNOX2; PLA2G2A; PLA2G4D; PLCB2; PLCB4; PLD6; PLEKHA2; PLIN4; PLS1; PMS2; PPP1R14C; PPP2R2A; PRAC2; PRKD1; PRKG2; PRSS16; PRSS23; PTPRK; PTPRR; PURA; RAB17; RAB19; RAB33A; RAB37; RABL3; RAD21-AS1; RAI14; RANBP3L; RAP1GDS1; RAP2C-AS1; RARRES3; RASA4; RASSF8-AS1; RBP5; RBPMS; RCAN2; RCAN3; REEP1; RELB; RFX3-AS1; RGL1; RGS10; RHBG; RHOH; RIMS1; RMDN1; RNASEL; RNF157-AS1; RNF43; RNFT2; ROR2; RP11-1000B6.3; RP11-1023L17.1; RP11-1081M5.1; RP11-1081M5.2; RP11-119D9.1; RP11-12K11.2; RP11-254F7.2; RP11-267A15.1; RP11-299H21.1; RP11-319E16.2; RP11-319F12.2; RP11-329B9.4; RP11-356J5.12; RP11-379B8.1; RP11-383J24.6; RP11-401P9.4; RP11-421M1.8; RP11-450H5.1; RP11-457M11.5; RP11-493L12.4; RP11-499E18.1; RP11-539L10.2; RP11-578F21.6; RP11-629O1.2; RP11-657O9.1; RP11-666A20.4; RP11-699A5.2; RP11-725D20.1; RP11-760H22.2; RP11-77P16.4; RP11-85M11.2; RP11-888D10.3; RP11-98G7.1; RP13-726E6.1; RP13-941N14.1; RP1-65J11.1; RP4-800G7.2; RPS6KA5; RPS6KL1; RSNB1L-AS1; RTN4R; RTN4RL1; RYR2; S100A3; SCAI; SCGB1D1; SCHIP1; SCNN1D; SDAD1P1; SDC3; SDC4; SELL; SEMA5B; SEPT6; SERAC1; SERPINI1; SESN3; SFR1; SH2D3C; SH3BP5; SH3RF1; SHC3; SHC4; SHISA3; SI; SKAP2; SLC12A2; SLC12A6; SLC16A14; SLC16A7; SLC1A7; SLC20A2; SLC22A11; SLC23A1; SLC2A13; SLC30A3; SLC35F3; SLC38A9; SLC40A1; SLC44A1; SLC51A; SLC52A3; SLC6A12; SLC6A13; SLC05A1; SLITRK3; SMAA4; SMAD3; SMIM3; SNAI3; SNRK; SNRK-AS1; SNX18P3; SNX18P7; SNX22; SOBP; SORBS1; SORBS2; SORL1; SOWAHB; SOX11; SPAG5-AS1; SPTAN1; SPTLC3; SRCIN1; SRGAP2; SRGAP2B; SRGAP3; SRP14-AS1; SSBP2; ST3GAL1; ST5; ST7; ST7-AS1; ST7-OT4; STAC; STARD5; STK3; STOX1; STOX2; STRBP; STXBP5L; STXBP6; SULF2; SUSD4; SUSD6; SVIL; SYBU; SYNE1; SYNE2; SYNPO; SYTL2; TAL2; TARBPI; TARSL2; TBX10; TBX19; TCF7L2; TCONS_I2_00000198; TCONS_I2_00000562; TCONS_I2_00001498; TCONS_I2_00007046; TCONS_I2_00008795; TCONS_I2_00008799; TCONS_I2_00008799; TCONS_I2_00008879; TCONS_I2_00008962; TCONS_I2_00017422; TCONS_I2_00018853; TCONS_I2_00018976; TCONS_I2_00019490; TCONS_I2_00020852; TCONS_I2_00021053; TCONS_I2_00022830; TCONS_I2_00022832; TCONS_I2_00023776; TCONS_I2_00028458; TCONS_I2_00028604; TCONS_I2_00028817; TCONS_I2_00029295; TCTEX1D4; TDP1; TFF3; TGM3; THBS4; THC2471881; THC2507047; THC2537043; THC2548652; THC2563836; THC2567789; THC2600547; THC2644314; TIAM2; TIMP2; TLE3; TLL1; TMCC2; TMEM116; TMEM117; TMEM144; TMEM158; TMEM181; TMEM266; TMEM38B; TMEM45A; TMEM51; TMPRSS6; TMSB4X; TNFRSF10D; TNFRSF11B; TNFRSF12A; TNFSF15; TNIK; TNRC6B; TNS1; TOX3; TP53INP1; TPCN1; TPPP; TPRXL; TRBV30; TRERF1; TRIM38; TRNP1; TRPS1; TSHZ1; TSHZ3; TSL; TSPAN10; TSPAN5; TTBK1; TTBK2; TTN-AS1; TTTY14; TTTY6; TUBB8; TULP4; TYRP1; UACA; UBAC2-AS1; UBE2E1-AS1; UBE2Q2P1; UBE2Q2P3; UFL1; UGT2B10; UGT2B11; UGT2B15; UNC5B; USP3-AS1; VASH2; VAV3; VGLL4; VIPR2; VN1R108P; VOPP1; VPS13A; VPS13B; VPS54; VSTM2L; VTA1; VWA2; VWF; WASIR2; WEE2-AS1; WI2-85898F10.1; WLS; WNT4; XM_006723786; XR_109175; XR_111287; XR_158870; XR_159012; XR_241604; XR_241611; XR_242359; XR_242407; XR_242480; XR_244659; XR_244755; XR_245037; XR_245646; XR_246983; XR_250613; XR_251551; XR_251682; XR_252953; XR_424060; XR_424361; XR_425623; XR_425926; XR_426345; XR_426478; XR_426840; XR_431240; XR_432026; YPEL1; ZADH2; ZAK; ZBBX; ZBTB20; ZBTB43; ZC3H6; ZCWPW1; ZFHX2; ZFHX4; ZFP36L1; ZIC2; ZIC5; ZMAT1; ZMYND12; ZNF117; ZNF204P; ZNF365; ZNF575; ZNF703; ZNF81; ZSWIM4; ZSWIM5</p>
Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA PVT1	296	<p>A_21_P0014946; A_32_P88905; A_33_P3218504; A_33_P3334043; A_33_P3404759; A_33_P3424347; ABT1; AC092620.3; AC093382.1; AC108488.4; ADH1C; AK093004; AK095428; AK095971; AK096487; AK096649; AK097098; AK098491; AK123449; AK126805; AK289844; AK294208; AMOTL2; ANG; ANKRD34A; ANKRD50; AQP10; ARMXC6; ASPM;</p>

(+R1881)		<p>AY129018; BAX; BBS12; BC029571; BC050402; BEX5; BF515046; BI056255; BRIP1; BTG2; C11orf95; C12orf66; C4orf47; C8orf48; CAPN10-AS1; CARD8; CCDC103; CCDC34; CDADC1; CDH24; CDKL1; CDKN1A; CEP120; CEP152; CEP162; CHKB-AS1; CHML; CLDN23; CLPTM1; COLGALT1; CRYGS; CSRN2; CTD-231912.4; CUZD1; CYP2J2; DCLRE1B; DESI2; DNMT3A; DRAM1; DSC1; DUSP4; DYRK2; EEF1DP3; EID2B; EMC3-AS1; ENST00000621052; ERICH2; ETS2; FAM155A-IT1; FAM177A1; FAM50B; FIGN; FOS; FRMD4B; FSD1L; FZD7; FZD8; GDPGP1; GEMIN2; GIGYF1; GIT1; GJC1; GNPDA1; GRHL3; HACD1; HAS3; HAUS6; HES6; HMBOX1; HMOX1; HNRNPLL; HSD17B6; IFI44; IGSF9; IKBIP; ING1; IRX2; ITPRIP; KB-1460A1.5; KDM6B; KDSR; KIAA0040; KIAA1841; KIF23; KIFC1; KLF6; LGI2; LIN9; LINC00662; LINC01011; LINC01089; LINC01315; LMO4; lnc-AL035696.1-5:1; lnc-APOC3-2:1; lnc-C11orf1-1:1; lnc-C17orf62-2:1; lnc-C21orf58-1:1; lnc-C2orf78-1:1; lnc-C6orf192-1:1; lnc-C9orf103-3:1; lnc-C9orf80-1:2; lnc-CENPP-1:1; lnc-CLK4-1:1; lnc-COPZ2-1:2; lnc-DNAJC11-1:1; lnc-EIF2D-1:1; lnc-ERP44-3:3; lnc-FAM46D-1:1; lnc-GNS-2:1; lnc-HCRTR1-1:1; lnc-KBTBD6-1:1; lnc-MAPK8IP2-1:12; lnc-MAPK8IP2-1:5; lnc-MCCC2-2:2; lnc-MMRN1-2:6; lnc-MTA2-1:1; lnc-NME4-1:2; lnc-OBFC1-2:2; lnc-OTOGL-1:1; lnc-PLEKHA5-1:1; lnc-PRKRIR-1:2; lnc-RALGDS-2:1; lnc-RHOJ-1:1; lnc-RNF125-2:1; lnc-RPP30-2:1; lnc-RSNB1L-1:1; lnc-SEH1L-1:1; lnc-SEMA6C-1:1; lnc-SFN-1:1; lnc-SOX6-1:1; lnc-SPIRE2-1:1; lnc-TCF19-1:4; lnc-TCL1B-2:1; lnc-TDRD5-1:1; lnc-TTR-1:1; lnc-UQCRFS1-7:1; lnc-ZNF717-1:1; lnc-ZSCAN10-3:4; LOC100270804; LOC100506127; LOC100506302; LOC101929516; LOC388692; LOC399815; LRP11; LSM3; MAFB; MAP7D3; MCM4; MCM9; MYO1B; NAA38; NDC1; NEAT1; NEMP1; NFKBID; NM_001099435; NR1D1; NRARP; NRG4; NT5DC3; OAF; ORC1; PANX1; PELI1; PER2; PLEKHO1; PLK2; POGlut1; POLR3G; PRPF4; PTCH1; RAB30-AS1; RASIP1; RAVER1; RBM38; RBM43; RIPK1; RMI2; RNF146; RP11-1007024.2; RP11-1055B8.4; RP11-150012.3; RP11-18H7.1; RP11-206L10.9; RP11-227G15.8; RP11-304L19.12; RP11-363J20.1; RP11-486G15.2; RP11-705O1.8; RP13-516M14.1; RTN3; SAV1; SCARNA23; SERPINC1; SESN2; SF3B4; SIX1; SIX4; SNHG21; SNHG4; SNORA61; SOCS1; SOWAHD; SOX8; SPATA41; SPOCK2; SPRED3; STIM2; STK38; TAF5L; TAP1; TBX2-AS1; TCONS_I2_00006779; TCONS_I2_00006780; TCONS_I2_00011380; TCONS_I2_00013803; TCONS_I2_00014848; TCONS_I2_00020645; TCONS_I2_00020647; TCONS_I2_00029338; TERF2; TGFBI; TGF1; THC2674845; TIGD3; TOR1B; TP53; TPM3; TPTE; TRAF5; TSNAIP1; TUBBP5; TYMS; TYMSOS; ULBP1; UNC93B1; UQCRB; USP27X; VASH1; VIM-AS1; WEE1; XM_005255122; XR_108380; XR_109753; XR_243166; XR_424187; XR_425268; XR_426337; ZAR1L; ZBTB26; ZFP14; ZNF219; ZNF28; ZNF383; ZNF404; ZNF425; ZNF585A; ZNF713; ZNF79; ZNF845; ZNF850; ZNF878; ZPLD1; ZSCAN12; ZSCAN16-AS1</p>
Aumento da expressão com silenciamento de lincRNA PVT1 (-R1881)	163	<p>A_21_P0014692; A_21_P0014749; A_33_P3300117; A_33_P3367970; A_33_P3484775; AC084809.3; AC087491.2; AK022341; AK055942; AK123993; ALKBH8; AMER1; AOC2; APOE; BC008289; BC110990; BREA2; BZW2; C18orf54; C8G; CCDC177; CDC42EP2; CDK2; CXCR4; DSG1-AS1; EBPL; EID3; ENKD1; ENST00000614063; ERVMER34-1; EXO1; FAHD2A; FXJ1; FOXN2; FRMD8; GABPB1-AS1; GAN; GAPLINC; GNRH1; GP1BB; GPR75; HAPLN3; HES7; HIST1H4J; HIST1H4K; HIST2H3A; HSPB2; ICOSLG; IFI6; IGF2BP1; IGFBP5; IHH; IP6K2; ITGA10; KIF18A; KLF4; KLHL11; LINC01167; lnc-ANKH-1:3; lnc-ASH2L-1:1; lnc-CPN2-3:1; lnc-EIF2AK4-4:1; lnc-EIF4EBP1-1:1; lnc-FAM3A-1:1; lnc-GATAD1-2:2; lnc-HLA-DMA-1:1; lnc-NDFIP1-1:1; lnc-SNX33-1:1; LOC101927482; LOC101928891; LRRC73; MARVELD1; MDM1; METTL1; MFSD2A; MIR17HG; MSL1; MTMR11; MYBPHL; NAA35; NACC2; NOP56; NR2C2AP; PCDH20; PFKFB2; PIDD1; PNP; POLR1C; PPM1D; PPRC1; PRR22; PSPN; PTGER4; RAB36; RASL11A; RDH10; RDX; RECQL4; RGS16; RNF112; RNU6ATAC; RP11-1275H24.1; RP11-159D12.2; RP11-359M6.3; RP11-655M14.13; RP4-564F22.5; RPL32; SCARF2; SCARNA11; SCARNA14; SCARNA18; SCARNA3; SGK223; SGOL1; SKIL; SLC17A4; SLC1A3; SNHG15; SNHG17; SNORA13; SNORA14B; SNORA2A; SNORA30; SNORA36B; SNORA38; SNORA40; SNORA41; SNORA44; SNORA46; SNORA50C; SNORA57; SNORA5A; SNORA5B; SNORA63; SNORA65; SNORA68; SNORA74B; SNORA79; SNORA80A; SNORA80B; SNORA84; SNORD104; SNORD62A; SNORD64; SNORD76; SNORD99; SPEF1; STX2; TCL1B; TCONS_I2_00000969; TCONS_I2_00006103; TCONS_I2_00019714; TCP10L; TFF1; TGM1; THC2756939; TPM2; VTRNA1-2; VTRNA1-3; VWCE; ZMYND10; ZNF169; ZNF577</p>