Caio Martins Moura

**Análise da expressão da molécula CD44 e suas isoformas no
câncer de próstata**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Urologia

Orientadora: Prof. Dra. Katia Ramos Moreira
Leite

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moura, Caio Martins

Análise da expressão da molécula CD44 e suas isoformas no câncer de próstata /
Caio Martins Moura. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia .

Orientadora: Katia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Moléculas de adesão celular 2.Expressão gênica 3.Reação em
cadeira da polimerase em tempo real 4.Neoplasias da próstata 5.Prognóstico

USP/FM/DBD-388/12

“Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Roberto Caldeira e Ana Carolina.”

Agradecimentos

Agradeço imensamente à **Prof. Dra Katia Ramos Leite**, a quem eu admiro e estimo; e que me apoiou, incentivou e orientou. Agradeço por tantas lições acadêmicas e de vida; pela firmeza nos princípios; pela disposição em indicar-me os caminhos da pesquisa com competência profissional. Agradeço pelo exemplo de conduta ética e paixão humana.

Ao **Dr. José Pontes Junior**, por coorientar-me e pela disposição em colaborar com esta pesquisa. Sou profundamente grato pela colaboração e pelas preciosas ponderações conceituais.

Ao **Prof. Dr. Miguel Srougi**, pela oportunidade de trabalhar neste maravilhoso grupo, e todo o apoio que foi dado para o desenvolvimento de várias pesquisas no LIM55.

À pesquisadora **Dra. Sabrina Reis**, por toda ajuda e incentivo neste projeto. Por ter me ensinado a como desenvolver uma pesquisa. Além de amiga, foi como uma orientadora neste projeto.

Aos meus queridos amigos do LIM55, **Iran Amorin, Nayara Viana, Denis Reis, Camila Piantino, Nelson Dip, Luciana Timoszczuk, Manuel Garcia, Betina Katz, Michele Silva, Vanessa Ribeiro** por estar comigo desde o começo, e transformar todos os dias divertidos dentro do laboratório.

Ao **Prof. Dr. Homero Bruschini** por permitir minha pós graduação.

Aos colegas do departamento urológico **Elisa, Iones e Inisabete** por me ajudar nesta pós-graduação.

Aos meus queridos irmãos **Vinícius e Bianca** por todo apoio nestes anos.

Aos meus pais, **Roberto e Ana Carolina**, por acreditar e me incentivar por toda esta vida, vocês são o espelho da vida. A cada dia vocês me ensinam como vencer, sempre serei grato a vocês!

À **Marielle Muniz** por estar me apoiando todos estes anos, e dizer que a distância pode ser transformada em luz.

A **Deus** por me ajudar nesta caminhada, e por ter toda minha família unida!

Agradecimento Institucional

Agradeço o apoio financeiro da FAPESP, fundação de apoio à pesquisa do Estado de São Paulo, sem o qual a realização esta tese não seria possível.

Protocolo: 10/51427-6

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	Introdução	1
1.1	Câncer de próstata	2
1.2	Diagnósticos	3
1.3	Fatores prognósticos	6
1.3.1	PSA	6
1.3.2	Estadiamento	7
1.3.3	Gleason	8
1.4	Biologia Molecular no Câncer de Próstata	9
1.5	Moléculas de Adesão	10
1.6	CD44	11
2	Objetivos	17
3	Materiais e Métodos	19
3.1	Pacientes e amostras	20
3.2	Ética	20
3.3	Método de extração do RNA total	21
3.4	Transcrição reversa (RT)	22

3.5	Análise de expressão do CD44s e das variantes por PCR em tempo real quantitativo _____	23
3.6	Eletroforese do produto final do qRT-PCR para confirmação da expressão das variantes _____	25
3.7	Análise estatística _____	26
4	Resultados _____	28
4.1	Comparação do perfil de expressão do gene CD44 e suas variantes _	29
4.2	Determinação da expressão das variantes de CD44 por eletroforese _	32
4.3	Expressão das variantes do CD44 e os fatores prognósticos _____	33
4.4	Expressão das variantes do CD44 e a recidiva bioquímica _____	35
5	Discussão _____	38
6	Conclusões _____	44
7	Perspectiva _____	46
8	Anexos _____	48
9	Referências _____	54

Lista de abreviaturas

CaP – Câncer de Próstata

PSA – Antígeno Prostático Específico

HPB – Hiperplasia Prostática Benigna

MAC – Moléculas de Adesão

CD44s – CD44 forma padrão

CD44v – Variantes do CD44

AH – Ácido Hialurônico

RTK – Receptor Tirosina Quinase

MMP – Metaloproteinase

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real

RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro

cDNA – Ácido Desoxirribonucleico complementar

β₂M – Beta-2-microglobulin

Lista de Figuras

- Figura 1 – Estrutura do CD44 em que as variantes se encontram no domínio extracelular próximo a membrana _____ 12
- Figura 2 – Estrutura do gene do gene CD44 com 20 éxons, no qual os 10 éxons do meio sofrem *splicing* alternativo formando as variáveis (v1-v10). Os éxons que não sofrem o *splicing* alternativo formam a CD44s (padrão) _____ 13
- Figura 3 – Esquema ilustrando a interatividade da variante do CD44 com o receptor tirosina quinase. A ligação do complexo CD44v/AH com o receptor tirosina quinase desregula a via apoptótica, resultando em proliferação e sobrevivência celular _____ 15
- Figura 4 – Desenho esquemático do sistema de amplificação utilizando *sybergreen*, onde o corante se liga ao DNA fita-dupla durante a amplificação do gene se esse estiver expresso possibilitando sua quantificação pela técnica de qRT-PCR _____ 24
- Figura 5 – Perfil de expressão das variantes do CD44 em 94 pacientes com CaP quando comparado ao controle HPB _____ 30
- Figura 6 – (a) Expressão do CD44s e das variantes no CaP. (b) Expressão do CD44s e das variantes na HPB _____ 32
- Figura 7 – Curva de sobrevida dos 90 pacientes em relação a expressão da CD44v2. Pacientes que tinham uma maior expressão da CD44v2 tinham um tempo médio de sobrevida maior comparado aos pacientes com a expressão menor que a média ($p=0,044$) _____ 36

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Dados demográficos clínicos e laboratoriais dos pacientes com CaP e do grupo controle_____	21
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados para quantificação da expressão das 94 amostras e do controle endógeno_____	26
Tabela 3 – Porcentagem de super e subexpressão de CD44s e suas variantes e média de expressão dos 94 pacientes com CaP quando comparado ao HPB_____	31
Tabela 4 – Expressão das variantes do CD44 de acordo com o estadiamento patológico, PSA pré-operatório e escore de Gleason____	34
Tabela 5 – Expressão de CD44s e suas variantes de acordo com a recidiva bioquímica _____	35
Tabela 6 – Chance de recidiva em relação à expressão da variante 2_____	37

Resumo

Moura CM. Análise da Expressão da Molécula CD44 e Suas Isoformas no Câncer de Próstata [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Introdução: O Câncer de próstata (CaP) é o tumor mais comum e a segunda causa de óbito por câncer no homem. O diagnóstico é feito pelo toque retal, nível sérico do antígeno prostático específico (PSA) e biópsia. A avaliação prognóstica é definida pelo PSA, estágio e escore de Gleason, porém, nenhum destes fatores clássicos, mesmo quando avaliados em conjunto, tem excelente performance na determinação prognóstica desta neoplasia. O CD44 é uma glicoproteína transmembrana envolvida em múltiplos processos celulares entre eles a adesão, migração, transmissão de sinal e apoptose. Tem como seu principal ligante o ácido hialurônico sendo assim um importante elemento na interação entre a célula e a matriz e por isso tem sido estudada como potencial marcador em várias neoplasias. Além da forma padrão (CD44s), apresenta ainda dez isoformas resultantes de *splicing*. São poucos os estudos de CD44 no CaP, principalmente relacionados a expressão de suas isoformas. **Objetivo:** Analisar e correlacionar a expressão de CD44s e de suas isoformas CD44v2, CD44v3, CD44v4, CD44v5, CD44v6, CD44v7, CD44v8, CD44v9 e CD44v10 no câncer localizado de próstata com os fatores prognósticos clássicos. **Material e métodos:** Analisamos retrospectivamente os espécimes cirúrgicos de 94 pacientes submetidos a prostatectomia radical (PR) entre outubro de 1997 e abril 2002. A expressão da forma *standard*, assim como das suas oito variantes resultado de *splicing* alternativo foi analisada através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). O grupo controle foi constituído pelos espécimes cirúrgicos de 14 pacientes com hiperplasia prostática benigna (HPB) submetidos a cirurgia aberta. Correlacionamos o perfil de expressão da forma padrão e suas variantes com escore de Gleason, estadiamento patológico, nível de PSA pré-operatório e recidiva bioquímica definida por níveis de PSA acima de 0,2ng/ml em seguimento médio de 53,3 meses. **Resultados:** Encontramos subexpressão de CD44s e superexpressão de todas as isoformas resultado de *splicing* alternativo no CaP localizado quando comparado a HPB. Observamos que a média de expressão da maioria das variantes foi maior nos pacientes que não recidivaram, porém apenas a maior expressão de CD44v2 esteve significativamente associada a menor chance de recidiva bioquímica ($p=0,044$). **Conclusão:** No CaP, existe uma alteração na expressão de CD44, com perda de CD44s e aumento de expressão de todas as suas variantes. No entanto, a recorrência tumoral mostrou-se significativamente associada a perda da expressão de CD44v2

Descritores: Moléculas de adesão celular; expressão gênica; Reação em cadeia da polimerase em tempo real; Neoplasias da próstata; prognóstico.

SUMMARY

Moura CM. Analysis of CD44 Molecule and Its Isoforms expression in Prostate Cancer [dissertation]. São Paulo: Faculty of Medicine, University of São Paulo, 2012.

Introduction: Prostate cancer (PC) is the most common tumor and the second leading cause of cancer death in men. The diagnosis is made by rectal examination, serum prostate-specific antigen (PSA) and biopsy. The prognosis is defined by the PSA, tumor stage and Gleason score, however, none of these classical factors, even when combined, have excellent accuracy in determining tumor behavior. The CD44 is a transmembrane glycoprotein related to many cell processes including adhesion, migration, signaling transduction and apoptosis, being considered a potential marker in many tumors. Besides the standard form (CD44s) there are ten isoforms resulted from alternative *splicing*. There is scarce data in the literature regarding the role of CD44 and its isoforms in PC prognosis. **Objective:** To analyze the expression of the CD44s and its isoforms CD44v2, CD44v3, CD44v4, CD44v5, CD44v6, CD44v7, CD44v8, CD44v9 and CD44v10 in surgical specimens of localized PC correlating the expression profile with the classical prognostic factors and biochemical recurrence. **Methods:** We retrospectively analyzed the surgical specimens of 94 patients that underwent radical prostatectomy between October 1997 and April 2002. The standard form as well as its nine variants were analyzed by quantitative, real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The control group consisted of 14 specimens of patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) submitted to open surgery. We correlated the expression of the variants with the Gleason score, pathological stage, pre-operative PSA and the occurrence of biochemical recurrence defined as PSA higher than 0.2 ng/ml in a mean follow up of 53.3 months. **Results:** CD44s was underexpressed, and all isoforms were overexpressed in PC when compared with BPH. However, the mean expression of most variants was higher in patients without recurrence, while a higher expression of CD44v2 correlated with higher recurrence free survival rate ($p=0.044$). **Conclusion:** In PC, there is a change in CD44 expression with a loss of CD44s and an overexpression of all of the CD44 variants. We also found that biochemical recurrence was significantly associated with loss of CD44v2 expression.

Descriptors: Cell adhesion molecules; gene expression; real-time polymerase chain reaction; prostatic neoplasms; prognosis.

1. Introdução

1.1 Câncer de Próstata

O Câncer de próstata (CaP) é reconhecido como um dos problemas de saúde mais importantes na população do sexo masculino. Dados do Instituto Nacional do Câncer mostram que o CaP é a neoplasia não cutânea mais comum em homens no Brasil, sendo estimados 60.180 novos casos para 2012, representando 30% dos tumores do homem. O CaP é também a segunda causa de óbito por câncer (www.inca.com.br).

A incidência do CaP é cerca de 70% maior em negros e 70% menor em orientais e índios, quando comparada com à frequência em brancos. Ademais, a mortalidade pela doença é cerca de três vezes maior em negros, contribuindo para isto, não apenas fatores genéticos, mas também menor acesso ao serviço de saúde em nosso país (Srougi et al., 2008).

Os fatores que determinam o risco de desenvolver CaP não são bem conhecidos, embora alguns tenham sido identificados. A idade e o estilo de vida são fatores de risco importante para o CaP, estudos mostram que a existência do tumor em indivíduos com menos de 40 anos é exceção, ocorrendo aumento de incidência após os 50 anos (Giovannucci et al., 2007).

Outro fator de risco é a hereditariedade, onde, pai ou irmão com tumor, aumenta o risco individual em 3 a 10 vezes, quando comparado à população geral (Crawford et al., 2003). No entanto, apenas cerca de 10-15% dos tumores de próstata diagnosticados são hereditários, os quais se

caracterizam por diagnóstico em idade mais precoce quando comparados aos tumores esporádicos (Roehl et al., 2006).

A ingestão de gorduras, carne cozida, micronutrientes, vitaminas (carotenóides, retinóides, vitaminas C, D) e minerais (cálcio,) podem influenciar no surgimento da doença. Como a maioria dos estudos relatados até o momento são do tipo caso-controle, ou seja, com menor nível de evidência, ainda existem muitas dúvidas sobre o papel destes fatores de risco na carcinogênese da próstata. Diversos estudos randomizados em andamento estão tentando esclarecer o papel de tais fatores de risco para esta neoplasia (Schimid et al., 2007).

Especula-se que o aumento da incidência do CaP seja parcialmente devido ao envelhecimento populacional somado à identificação de casos subclínicos, facilitada pelo emprego disseminado do rastreamento com toque retal e dosagem do antígeno prostático específico (PSA).

1.2 Diagnóstico

O toque retal é o método clássico de detecção do CaP, sendo importante pois cerca de 75% dos casos localizam-se na zona periférica da próstata, que corresponde à região da glândula palpável ao toque. A presença de nódulo ou endurecimento da glândula são indícios de CaP. Este exame tem importância no rastreamento e no estadiamento, apesar de sua subjetividade, variabilidade interpessoal entre examinadores, e da existência de doenças prostáticas associadas que podem simular a neoplasia como

hipertrofia benigna, prostatite, biópsias prévias, tornando o exame pouco específico (Schroder et al., 1998).

O PSA é uma protease produzida no ácino prostático e secretada no fluido seminal, por isso sua concentração no plasma é normalmente pequena. A função do PSA é liquefazer o esperma auxiliando assim no processo de fecundação. Desde sua descoberta em 1979 até os dias de hoje, tornou-se ferramenta valiosa para diagnóstico precoce, tratamento e seguimento de pacientes com CaP (Reis et al., 2010).

Elevações séricas de PSA ocorrem como resultado de qualquer desarranjo da próstata normal, que possibilite a difusão do PSA através do tecido prostático e alcance da corrente sanguínea. Isso ocorre no CaP e também em outras doenças benignas, como prostatites, hiperplasia prostática benigna (HPB), biópsia de próstata ou trauma prostático (Qiu et al., 1990). O nível de PSA é um parâmetro contínuo e quanto maior o valor, mais provável é a existência de CaP. A constatação de que muitos homens podem ter CaP, apesar dos baixos níveis de PSA, foi reforçada pelos resultados recentes de um estudo de prevenção realizado nos Estados Unidos (Thompson et al., 2001).

Pacientes com PSA entre 4 a 10ng/ml ou >10 ng/ml têm, respectivamente 30% e 62% de probabilidade de terem CaP. Mesmo com PSA < 0,5 ng/ml, existe 6,6% de chance de haver CaP. Assim não há nível do PSA abaixo do qual o homem esteja 100% seguro de não ter CaP (Reis et al., 2010).

A biópsia de próstata deve ser indicada quando os níveis de PSA estiverem elevados e/ou o toque retal alterado. A idade do paciente, a existência de comorbidades, a expectativa de vida e as consequências do diagnóstico e eventual tratamento devem também ser considerados, com o intuito de reduzir o excesso de diagnóstico e o tratamento desnecessário. A estratificação de risco está se tornando importante ferramenta para reduzir o número de biópsias de próstata desnecessárias (Roobol et al., 2010).

A associação da dosagem de PSA ao toque retal é importante, já que o toque retal tem alta especificidade, porém baixa sensibilidade, assim como baixo valor preditivo positivo (Perrer et al., 1996). Elevados níveis séricos de PSA são então indicação de biópsia prostática guiada pela ultra-sonografia transretal (BTRUS), único método diagnóstico da neoplasia. Devido a sua baixa especificidade, quando uma biópsia prostática é realizada em pacientes com níveis de PSA entre 3,0 e 10,0 ng/ml são observadas taxas de resultados negativos de aproximadamente 70 a 80% (Djavan et al., 2000).

Apesar do uso disseminado do PSA para rastreamento do CaP, e do benefício do seu uso no diagnóstico precoce, está claro a necessidade de

identificação de novos marcadores, com melhor sensibilidade e especificidade para o diagnóstico do CaP.

1.3 Fatores prognósticos

O CaP é uma doença heterogênea e de comportamento variável, existindo casos de alto potencial de agressão e que ameaçam a vida do paciente ao mesmo tempo que existe um número considerável de tumores indolentes, cujo diagnóstico e tratamento são desnecessários. Por isto torna-se importante a definição prognóstica no CaP. Os fatores clássicos de prognóstico são o PSA, escore de Gleason e estágio clínico e patológico (Dall'Oglio et al., 2010).

1.3.1 PSA

A dosagem do PSA total não pode ser usada isoladamente como fator preditivo da extensão tumoral ou da presença de metástases. Metástases ganglionares ocorrem em cerca de 20% dos pacientes com PSA > 20ng/ml e em 75% dos pacientes com PSA > 50 ng/ml. Quanto mais alto o valor do PSA, maior a chance de doença localmente avançada ou disseminada. Esse fato tem grande impacto na decisão terapêutica e no prognóstico da doença (Reis et al., 2010).

A concentração sérica de PSA é bastante útil para o monitoramento do tratamento e esse foi o primeiro uso aprovado desse marcador pelo órgão regulador americano *Food and Drug Administration* (FDA). Se a taxa de PSA não cai a nível indetectável após prostatectomia radical, ou aumenta a despeito da radioterapia ou da crioterapia realizadas, ou se aumenta dentro

do primeiro ano após a realização de qualquer tratamento local ou se, ainda, dobra de valor em menos de seis meses, provavelmente o paciente apresenta persistência local de doença ou metástase à distância. O Nível detectável de PSA após prostatectomia radical está associado com recorrência da doença em muitos pacientes, sendo que o intervalo médio entre a recorrência do PSA e a morte por câncer situa-se entre 5 e 12 anos, dependendo do escore de Gleason (Corrêa et al., 2006). Porém, o emprego isolado do PSA pré-operatório para estágio e consequentemente, para definição da estratégia terapêutica, ainda é controverso, visto que não é um marcador específico do CaP.

1.3.2 Estadiamento

A evolução dos pacientes com adenocarcinoma da próstata está intimamente relacionada com a extensão da neoplasia e, por isto, a União Internacional Contra o Câncer propôs a utilização do sistema TNM para o CaP, de modo a padronizar a classificação dos pacientes com a doença e permitir estudos comparativos mais precisos (Srougi et al., 2008).

O estadiamento clínico é dado pelas alterações do toque retal somadas a alterações em exames de imagem, dos quais a ressonância é o que mostra melhores resultados. A ressonância magnética proporciona melhor visualização e análise da glândula prostática, com distinção mais definida da anatomia para estadiamento local e melhores possibilidades para prever a extensão extracapsular e a invasão das vesículas seminais. A tomografia computadorizada ou ressonância magnética devem ser indicadas

no estadiamento do paciente com CaP de alto risco, principalmente quando o PSA estiver > 20 ng/ml (Reis et al., 2010). Porém a predição pré-operatória do estágio é limitada, pois exames de imagem como ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética, comumente subestimam a extensão extracapsular do tumor (Moul et al., 2002).

1.3.3 Gleason

A classificação de Gleason considera a arquitetura glandular do tumor e a sua relação com o estroma prostático caracterizando cinco padrões distintos, que variam do bem diferenciado 1 ao indiferenciado 5. O escore de Gleason é dado pela soma dos dois padrões tumorais mais representativos da neoplasia. Os tumores com escore de Gleason entre 2 e 6 são considerados bem diferenciados e têm comportamento menos agressivo quando comparado aos tumores com escore de 7 a 10 que são considerados menos diferenciados (Gleason et al., 1992). Ainda, os padrões 4 ou 5 de Gleason quando presentes em mais de 5% do volume do CaP é um indicador de prognóstico desfavorável para a recidiva bioquímica. Entretanto, o emprego isolado do escore de Gleason para a tomada de decisão é insuficiente devido à subjetividade da avaliação do Gleason pelo patologista (Partin et al., 2001) (Moreira-Leite K et al., 2009).

Nenhum dos fatores prognósticos isolados tem valor preditivo independente ou superior ao da associação dos demais fatores envolvidos (Zequi et al, 2010). A pesquisa continua no sentido de estabelecer novos fatores prognósticos, e o enfoque principal tem sido dado ao estudo dos

marcadores moleculares (Jonathan et al., 2007). Até o momento, apesar da vasta pesquisa realizada, nenhum marcador mostrou-se capaz de prever adequadamente o comportamento biológico do CaP.

1.4 Biologia molecular no câncer de próstata

As ferramentas da biologia molecular no CaP tem proporcionado uma oportunidade para o desenvolvimento de novos métodos de prevenção, detecção e tratamento. A busca por novos marcadores moleculares que permitam uma detecção precoce tem sido o objetivo de vários laboratórios, inclusive o nosso (LIM55).

Durante muito tempo a sensibilidade e dependência dos androgênios foi a principal questão na pesquisa do CaP que é conceituado como um câncer hormônio-dependente (Denmeade et al., 2002, Issacs et al., 2002). Esse conhecimento datado de 1940 veio da observação de que os pacientes submetidos a orquiectomia apresentavam a regressão da glândula e a melhoria dos sintomas (Schulz et al., 2002). Posteriormente, na década de 1990, houve o reconhecimento de que cânceres humanos são normalmente causados pelo acúmulo de múltiplas alterações genéticas, que ativam proto-oncogenes e inativam genes supressores tumorais. Isso levou a um rastreio para alterações cromossômicas recorrentes e análise mutacional de vários oncogenes e genes supressores de tumor conhecidos alterados em outros carcinomas. Ambas as linhas de pesquisa produziram muitas idéias, mas não chegaram a descobrir nenhum marcador de prognóstico chave no CaP.

Baseado na larga amplitude clínica do CaP, é improvável que um marcador molecular isoladamente possa determinar o prognóstico do CaP. Talvez perfis de expressão de vários genes em conjunto possa auxiliar no entendimento do mecanismo responsável pelo desenvolvimento e progressão dessa neoplasia.

Nosso laboratório, LIM55, dispõe de um banco de tumor urológico criado pelo Profs. Drs Miguel Srougi e Katia Ramos Moreira Leite em 1997 no Hospital Sírio Libanês com mais de 3000 amostras cadastradas. Este banco de tumor constitui uma fonte de pesquisa e motivo de estudo para um grande número de pesquisadores que atuam na pesquisa translacional

1.5 Moléculas de adesão

Com o intuito de avaliar o papel das Moléculas de Adesão (MAC) e das proteases como marcadores de prognóstico no CaP, o LIM55 iniciou uma linha de pesquisa sobre a expressão destas moléculas em pacientes com CaP em vários estádios desta neoplasia.

Pontes et al (2010) demonstraram que há uma perda de expressão das moléculas de adesão E-caderina e β -Catenina em metástases ósseas e linfonodais de CaP em cerca de 90% dos casos quando comparado ao tumor primário, denotando um papel da perda de expressão destas moléculas na progressão da neoplasia.

A adesão entre células epiteliais é um fenômeno fundamental para a manutenção da homeostasia dos tecidos, atuando em vários eventos

importantes da célula: proliferação, migração, diferenciação e morte. Desta forma, qualquer alteração na adesão gera consequências importantes no fenótipo da célula (Thomas et al., 1997).

O mecanismo específico que contribui para o padrão de disseminação do CaP ainda é pouco conhecido, acredita-se que as MAC e proteases tenham papel importante neste processo (Albelda et al., 1993). Supõe-se que nas várias etapas da oncogênese exista alteração no balanço entre adesão e motilidade celular, determinado por perfil específico de expressão destas MACs.

1.6 CD44

O CD44 é uma glicoproteína transmembrana que pertence à família das MAC e tem participação em diversas atividades celulares como interação célula-célula, célula-matriz extracelular, migração celular, apresentação de fatores de crescimento, citocinas, transmissão de sinal da superfície celular para o seu interior, apoptose, sobrevivência celular e proliferação, e tem sido estudada como um potencial marcador de agressividade de várias neoplasias (Zoller et al., 2011).

Vários tumores expressam diversas variantes de CD44 as quais tem sido associada à progressão da neoplasia (Paradis et. al., 1998). Em CaP os estudos que exploram o papel de CD44 são escassos, pouco contundentes e a maioria baseados em trabalhos que avaliaram apenas expressão proteica por imuno-histoquímica (Iczkowski et al., 2003).

O gene CD44 foi mapeado no cromossomo 11p13 e é composto de 20 éxons. A forma padrão (CD44s) é a mais abundante nas células normais e consiste de um domínio extracelular, que possui uma sequência sinal N-terminal (éxon 1) e um sítio para a ligação ao Ácido Hialurônico (AH) (éxons 2 e 3), uma região proximal à membrana plasmática (éxons 4, 5, 16 e 17), um domínio transmembrana (éxon 18) e um domínio citoplasmático (éxon 20) (Figura 1) (Thorne et al., 2004).

Figura 1 – Estrutura do CD44 em que as variantes se encontram no domínio extracelular próximo a membrana

Moléculas contendo os éxons variáveis são conhecidas como CD44v1-10, sendo que a variante 1 não é expressa em humanos por possuir um *stop* códon (figura 2), estas isoformas resultante de *splicing* alternativo se diferem nas sequências de aminoácidos e composição de carboidratos, variando seu peso molecular de 85-230 KD (Goodison et al., 1999).

Splicing alternativo é um processo que permite a produção de diferentes proteínas a partir de um único gene (Maniatis et al., 2002). Após a transcrição, os íntrons são removidos a partir do pré-RNA por um processo denominado *splicing*. Às vezes um éxon pode ser incluído ou excluído das transcrições finais, ou pode haver dois sítios de *splicing* em um final de um éxon que são reconhecidos pelo spliceossomo (Kashyap et al., 2008).

A junção de diferentes éxons permite que um só gene expresse múltiplos RNAm, que codificam proteínas com diversas funções eventualmente antagonistas (Faustino et al., 2003) (Kashyap et al., 2008).

Figura 2 – Estrutura do gene do gene CD44 com 20 éxons, no qual os 10 éxons do meio sofrem *splicing* alternativo formando as variáveis (v1-v10); os éxons que não sofrem o *splicing* alternativo formam a CD44s (padrão)

Uma das principais características do CD44 é pertencer a um grupo de proteínas que se liga ao ácido hialurônico (AH). O AH é o principal componente na matriz extracelular dos tecidos de mamíferos, que se

acumula na divisão celular e no rápido remodelamento da matriz, que ocorre durante a morfogênese embrionária, inflamação e tumorigênese (Toole et al., 2001).

As proteínas do CD44 podem ser encontradas em três estágios de acordo com a ligação do AH: CD44 Inativo, o qual não se liga ao AH; CD44 induzido, não se liga ao AH, porém pode ser ativado por estímulos fisiológicos; e o CD44 ativo que pode ligar-se ao AH (Lesley et al., 2003).

Essa interação CD44/AH ativa vários receptores tirosina quinase (RTK) no CaP. Além disso, o domínio extracelular do CD44 pode possuir sulfato e/ou sulfato de heparan permitindo-o a ligação de fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e o Fator de Crescimentos de Hepatócitos (HGF), facilitando assim a invasão celular através da alteração das vias PI3K/AKT (Figura 3) (Misra et al., 2011).

Esta associação CD44-RTK promove a ativação de cascatas de sinalização que bloqueiam a apoptose e regulam as proteínas anti-apoptóticas, como, neuregulina (NRG1), prostaglandina E2 (PGE2) e fosfolipase C- γ (PLC γ) (Zoller 2011).

Figura 3 – Esquema ilustrando a interatividade da variante do CD44 com o receptor tirosina quinase. A ligação do complexo CD44v/AH com o receptor tirosina quinase desregula a via apoptótica, resultando em proliferação e sobrevivência celular

Outros componentes da matriz extracelular também podem ligar-se ao CD44, como a osteopontina, colágeno e metaloproteinases (MMP). (Desai et al., 2009). Este mesmo autor mostrou que a interação do CD44 e MMP-9 é um evento importante na ativação e expressão de MMP9, contribuindo assim para a migração das células tumorais no CaP.

Supostamente a ligação do AH é influenciada pelo domínio citoplasmático, que é ancorado no citoesqueleto e se liga a proteínas como as ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) e ankyrin. Essas proteínas são importantes na regulação e migração celular, sendo que a sua fosforilação pela proteína tirosina quinase desregula a via de sinalização do CD44 (Misra et al., 2011).

Harrison et al (2002), concluíram que CD44 e Ezrin interagem no endotélio vascular no CaP e localizam-se em áreas de contato do tumor. O complexo Erzin-CD44 tem papel essencial na invasão das células endoteliais pelas células do CaP.

A expressão de variantes do CD44 ativado tem sido implicada na progressão tumoral em ampla variedade de neoplasias humanas incluindo o linfoma não-Hodgkin (Joensuu et. al., 1993), melanoma (Birch et. al., 1991), bem como os carcinomas do cólon (Wielenga et. al., 1993), mama (Joensuu, et. al., 1993), estômago (Heider et. al., 1993), pâncreas (Rall CJ et. al., 1995), bexiga (Matsumura Y et. al., 1994), colo do útero (Dall P et. al., 1994) e ovário (Uhlsteidl M et. al., 1995).

Raros estudos exploraram alterações de expressão do CD44 e suas isoformas no CaP utilizando técnica de qRT-PCR e nenhum deles estudou amostras clínicas de pacientes tratados por CaP, não sendo conhecido ainda o seu papel no comportamento desta neoplasia.

2. Objetivos

Objetivo primário

Avaliar o perfil de expressão do CD44s e das variantes CD44v2, CD44v3, CD44v4, CD44v5, CD44v6, CD44v7, CD44v8, CD44v9 e CD44v10, resultante do *splicing* alternativo, do gene CD44 em pacientes com CaP clinicamente localizado submetidos a cirurgia.

Objetivos Secundários

Correlacionar a expressão dessas variantes resultante de *splicing* alternativo e do CD44s com o prognóstico e recidiva da neoplasia.

3. Material e Métodos

3.1 Pacientes e amostras

Estudamos o perfil de expressão de RNAm mensageiro (RNAm) em espécimes cirúrgicos de 94 pacientes com CaP tratados por prostatectomia radical entre dezembro de 1997 a agosto de 2001 no Hospital Sírio Libanês pela equipe do Prof. Dr. Miguel Srougi (anexo A). Como controle, estudamos 14 amostras de tecido prostático benigno, provenientes de glândulas hiperplásicas de pacientes operados por cirurgia aberta também do hospital Sírio Libanês.

As características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes estão expostas na Tabela 1. Os pacientes foram informados sobre o uso do material em pesquisa científica, e assinaram o termo de consentimento.

3.2 Ética

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMUSP nº 0340/10 (Anexo B).

Tabela 1 – Dados demográficos clínicos e laboratoriais dos pacientes com CaP e do grupo controle

	Casos de Cap N=94	Controles HPB N= 14
Idade (anos)	41-84	66-74
Média	63,6	70,1
Desvio padrão	8,00	6,18
PSA (ng/mL)	2,98-25,5	0,3-6,4
Média	9,04	2,41
Desvio padrão	4,77	1,39
< 10	55	
≥ 10	28	
Estágio patológico		
pT2	54	
pT3	41	
Escore de Gleason	4-10	
Média	7,09	
Desvio padrão	1,25	
≤6	30	
≥ 7	65	

3.3 Método de extração do RNA total

Para extração do RNA total, utilizamos amostras de tecido prostático que foram enviados a fresco, até 15 minutos após sua remoção. Foi retirado um fragmento de 1cm² representativo do tumor ou do tecido benigno. As amostras foram submetidas imediatamente ao congelamento em nitrogênio líquido e estocado em freezer -80°C até o processamento.

Os espécimes congelados a -80 °C foram cortados em criostato a -30 °C, sendo retirados 10 cortes de 10 µm colocados em tubo de

microcentrífuga de 1,5 ml estéril. Um fragmento foi colocado em lâmina de vidro e corado pela hematoxilina e eosina para garantia da presença de pelo menos 75% de tumor no fragmento. O RNA total foi extraído com o uso do Kit Ambion AM1912 (Applied Biosystems, CA, EUA). Ao tecido fresco congelado, foram adicionados 200 µl de solução de lise, logo depois, o tecido foi macerado utilizando o equipamento Tissue Laser LT Qiagen, e acrescentado 200 µl de etanol a 64% com homogenização, a solução foi vortexada. Em seguida, foi transferida para a coluna GFX, centrifugadas a 14.000 RPM por 1 min e, foram então feitas lavagens com soluções de lavagens próprias do kit, sendo no intervalo das lavagens as amostras submetidas a centrifugação. Ao final o RNA foi diluído em 50 µl de solução de eluição pré-aquecida (80 °C) livre de RNase/DNase.

A pureza e concentração do RNA foram mensuradas em Nanodrop (Thermo Scientifica, DE, EUA) (260/280 nM).

3.4 Transcrição reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 5µg de RNA utilizando-se a enzima MultiScribe™ transcriptase reversa e iniciadores randômicos (Applied Biosystems, CA, EUA).

O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20 µL. A este volume foram acrescentados 4 µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 µL do mix de dNTPs (100 mM), 4 µL do tampão da enzima (10X), e 8,4 µl de água RNA/DNA nuclease free. As soluções foram então submetidas a ciclos de temperaturas: 10 min a 25°C, 120 min a 37 °C

e 5 min a 85 °C. Após o termino dos ciclos o cDNA foi então armazenado a – 20 °C até o uso.

3.5 Análise de expressão do CD44s e das variantes por PCR em tempo real quantitativo

A expressão dos genes estudados foi avaliada a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase em tempo real (qRT-PCR).

Os *primers* que foram utilizados para amplificação dos genes estão na Tabela 2, e as reações foram realizadas no termociclador ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, CA, EUA) no modo *standard*. Para quantificação das amostras foi utilizado o reagente *Sybrgreen®* (Applied Biosystems, CA, EUA). Como controle endógeno, utilizamos β -2 microbulina (B2M).

O sistema *Sybergreen* utiliza o corante fluorescente *sybergreen* para detectar produtos da reação em cadeia de polimerase (PCR) através da sua incorporação ao DNA de dupla-fita formado durante a reação. Conforme a PCR progride, mais amplicons são criados resultando um aumento na intensidade da fluorescência proporcional à quantidade de produto gerado pela PCR (Figura 4).

As reações ocorreram nas seguintes concentrações: 0,75 μ l do primer reverse e 0,75 de primer forward específico, 5 μ l de master mix *sybergreen®* (Applied Biosystems, CA, EUA), 2,5 μ l de água livre de nuclease RNA e 1 μ l de cDNA. Ao fina, o produto da qRT-PCR era também submetido à eletroforese.

O nível de expressão dos genes foi obtido pela quantificação relativa e dos níveis de expressão em vezes determinado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Esse método utiliza a seguinte fórmula: $\Delta\Delta CT = (CT \text{ do gene alvo, amostra de CaP} - CT \text{ do controle endógeno, B2M}) - (CT \text{ do gene alvo, HPB} - CT \text{ do controle endógeno, B2M})$. O número de vezes que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak et al. 2001). No gráfico logarítimo, a expressão do controle normal é dada como uma linha basal (representada pelo número 1) e a expressão relativa de cada variante para cada amostra tumoral é demonstrada em vezes o controle para mais nos casos de superexpressão e para menos nos de subexpressão.

Figura 4 – Desenho esquemático do sistema de amplificação utilizando *sybergreen*, onde o corante se liga ao DNA fita-dupla durante a amplificação do gene se esse estiver expresso possibilitando sua quantificação pela técnica de qRT-PCR

3.6 Eletroforese do produto final do qRT-PCR para confirmação da expressão das variantes

O gel de agarose foi preparado em uma concentração de 2,5 % de agarose, utilizando uma solução salina TBE 1x, nele foi acrescentado 10 µl de brometo de etídeo para marcar os ácidos nucleicos.

Nas amostras resultantes da amplificação pelo qRT-PCR, adicionamos 2 µl de loading buffer 6x em cada, para aumentar a densidade das amostras e impedir que elas saiam dos poços formados no gel por um pente durante a sua preparação.

Foram adicionados 10 µl da amostra já preparada em cada poço, cada uma representando uma variante do CD44, sendo que em um poço foi colocado o marcador de peso molecular de 50 pb (pares de bases). O gel foi submetido a 120 volts durante 1 hora em tampão TBE 1x. Depois o gel foi levado para análise no transluminador Gel Logic 100 Imaging System.

Tabela 2 – *Primers* utilizados para quantificação da expressão das 94 amostras e do controle endógeno

Gene	Primers
CD44v2	5' TTG ATG AGC ACT AGT GCT ACA GCA 3' 5' CAT TGT GTT GTT GTG TGA AGA TG 3'
CD44v3	5' TAC GTC TTC AAA TAC CAT CTC AGC 3' 5' GGT GCT GGA GAT AAA ATC TTC ATC 3'
CD44v4	5' TCA ACC ACA CCA CGG GCT TTT GAC 3' 5' AGT CAT CCT TGT GGT TGT CTG AAG 3'
CD44v5	5' TGT AGA CAG AAA TGG CAC C 3' 5' CTT GTG CTT GTA GAA TGT GG 3'
CD44v6	5' AGG AAC AGT GGT TTG GCA AC 3' 5' CGA ATG GGA GTC TTC TCT GG 3'
CD44v7	5' TGC AAG GAA GGA CAA CAC CAA 3' 5' GGG TGT GAG ATT GGG TTG AAG AAA 3'
CD44v8	5' TCA GCC TAC TGC AAA TCC AA 3' 5' GAG GTC CTG TCC TGT CCA AA 3'
CD44v9	5' GGC TTG GAA GAA GAT AAA GAC C 3' 5' TGC TTG ATG TCA GAG TAG AAG TTG 3'
CD44v10	5' GGA ATG ATG TCA CAG GTG GA 3' 5' AGG TCA CTG GGA TGA AGG TC 3'
CD44s	5' TGT GTC TTG GTC TCT GGT AGC 3' 5' AAA GGA GCA GCA CTT CAG GA 3'
β2M	5' TCT CTG CTG GAT GAC GTG AG 3' 5' TCT CTC TTT CTG GCC TGG AG 3'

3.7 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram resumidas através da média e desvio padrão. Já as variáveis qualitativas foram expressas através do número e porcentagem.

Para análise dos níveis de expressão das nove variantes de acordo com estágio patológico, Escore de Gleason, e PSA pré-operatório, foi

utilizado o teste T de student, pois todas as variáveis analisadas apresentavam padrão de expressão homogênea que foi confirmada pelo teste de homogeneidade de variância (Teste de levene).

Para análise estatística foi utilizado o software SPSS 19.0. Em toda análise estatística foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram p-valor inferior a 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Comparação do perfil de expressão do gene CD44 e suas Variantes.

Quando analisamos as variantes pelo método qRT-PCR, interessante observamos superexpressão de todas as variantes de CD44 no tecido maligno da próstata, quando comparado a HPB (figura 5) e uma diminuição de expressão da CD44s em 71,2% dos casos. A variante 5 demonstrou maior porcentagem de superexpressão 94,7% (tabela 3). Por outro lado as variantes CD44v3 e CD44v7 comportaram-se de maneira diferente com metade dos casos exibindo superexpressão e outra metade subexpressão.

Figura 5 – Perfil de expressão das variantes do CD44 em 94 pacientes com CaP quando comparado ao controle HPB

Tabela 3 – Porcentagem de super e subexpressão de CD44s e suas variantes e média de expressão dos 94 pacientes com CaP quando comparado ao HPB

CD44										
N(94)	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	S
Superexpresso	79.8%	53.2%	73.5%	94.7%	75.6%	54.3%	88.3%	89.4%	86.2%	28.8%
subexpresso	20.2%	46.8%	26.5%	5.3%	24.4%	45.7%	11.7%	10.6%	13.8%	71.2%
Média	6.2	11.4	3.1	11.5	3.3	2.8	3.5	3.2	4.7	0.8
Desvio padrão	10.7	22.5	5.0	15.8	4.5	5.9	3.9	3.3	5.7	0.77

4.2 Determinação da expressão das variantes de CD44 por eletroforese

Associando a quantificação da expressão de CD44s e suas variantes pela técnica de qRT-PCR, confirmamos os achados por eletroforese em gel de agarose em todos os espécimes e no controle HPB (figura 6). É possível, em análise apenas visual, demonstrar que CD44s está subexpressa no câncer de próstata em relação a HPB assim como as suas variantes estão superexpressas.

Figura 6 – (a) Expressão do CD44s e das variantes no CaP. **(b)** Expressão do CD44s e das variantes na HPB

4.3 Expressão das variantes do CD44 e os fatores prognósticos

A análise de expressão das nove variantes e do CD44s de acordo com os fatores prognósticos clássicos está descrita na tabela 4. Não encontramos nenhuma correlação estatisticamente significativa quando relacionamos a expressão de CD44s e suas variantes com o estadiamento patológico, escore de Gleason e os níveis de PSA pré operatório.

Tabela 4 – Expressão das variantes do CD44 de acordo com o estadiamento patológico, PSA pré-operatório e escore de Gleason

	Estadiamento pTNM			PSA Ng/mL		Escore de Gleason			
	pT2	pT3	p	<10	≥10	p	< 7	≥7	p
CD44V2									
Média	5,66	6,79	0,617	5,97	6,67	0,790	5,59	6,85	0,576
Desvio Padrão	6,01	14,90		11,90	8,96		6,14	14,67	
CD44V3									
Média	11,24	11,71	0,922	10,56	12,57	0,715	10,89	12,14	0,791
Desvio Padrão	18,03	27,58		22,91	24,34		18,41	27,05	
CD44V4									
Média	3,21	2,95	0,808	3,35	2,55	0,520	3,18	3,00	0,895
Desvio Padrão	5,31	4,80		5,93	2,72		5,37	4,73	
CD44V5									
Média	11,43	11,52	0,978	11,30	11,92	0,872	10,57	12,57	0,546
Desvio Padrão	13,38	18,67		16,33	16,30		13,41	18,46	
CD44V6									
Média	3,29	3,30	0,991	3,35	3,23	0,921	3,16	3,47	0,746
Desvio Padrão	3,61	5,64		5,09	3,61		3,61	5,59	
CD44V7									
Média	1,92	3,90	0,746	3,46	1,32	0,395	1,86	3,93	0,802
Desvio Padrão	3,01	8,19		7,08	1,22		2,44	8,32	
CD44V8									
Média	3,53	3,45	0,926	3,76	3,04	0,454	3,49	3,50	0,997
Desvio Padrão	4,02	3,95		4,59	2,30		4,02	3,94	
CD44V9									
Média	3,03	3,48	0,530	3,46	2,75	0,387	3,11	3,37	0,713
Desvio Padrão	2,73	4,04		3,86	2,01		2,76	3,99	
CD44v10									
Média	5,12	4,13	0,414	4,39	5,08	0,623	4,95	4,36	0,627
Desvio Padrão	7,12	3,26		5,35	7,10		7,23	3,17	
CD44S									
Média	0,76	0,90	0,393	0,67	1,08	0,079	0,88	0,76	0,594
Desvio Padrão	0,83	0,69		0,56	1,09		0,92	0,54	

4.4 Expressão das variantes do CD44 e a recidiva bioquímica

Noventa pacientes foram seguidos por um período médio de 53,3 meses e 19 (21,1%) recidivaram (PSA>0,2ng/ml). Interessantemente observamos que todas as variantes estão menos expressas nos pacientes que recidivaram, com exceção da variante 7. A variante 2 foi a única isoforma que mostrou significância estatística, sua maior expressão esteve associada a menor chance de recidiva ($p=0,044$) (tabela 5).

Tabela 5 – Expressão de CD44s e suas variantes de acordo com a recidiva bioquímica

	Recidiva Bioquímica		p
	Não	Sim	
CD44v2			
Média	7,17	3,41	0,044
Desvio padrão	12,27	5,14	
CD44v3			
Média	12,24	8,60	0,516
Desvio padrão	25,81	11,45	
CD44v4			
Média	3,55	1,99	0,227
Desvio Padrão	5,86	1,72	
CD44v5			
Média	12,33	9,54	0,476
Desvio Padrão	17,95	8,67	
CD44v6			
Média	3,79	2,18	0,184
Desvio Padrão	5,24	1,91	
CD44v7			
Média	2,48	3,85	0,300
Desvio Padrão	4,18	9,64	
CD44v8			
Média	3,75	3,06	0,479
Desvio Padrão	4,42	2,59	
CD44v9			
Média	3,40	2,94	0,580
Desvio Padrão	3,67	2,53	
CD44v10			
Média	4,86	4,20	0,642
Desvio Padrão	6,46	3,58	
CD44s			
Média	0,80	0,77	0,857
Desvio Padrão	0,79	0,70	

Curva de sobrevida livre de recidiva (Kaplan-Meyer) para a variante 2 está exposta na figura 7. A média de expressão foi definida como ponto de corte. Pacientes que tiveram uma expressão maior de CD44v2 tiveram tempo médio de sobrevida livre de recidiva de 133 meses e aqueles com menor expressão desse período foi de 90 meses ($p=0,044$).

Figura 7 – Curva de sobrevida dos 90 pacientes em relação a expressão da CD44v2. Pacientes que tinham uma maior expressão da CD44v2 tinham um tempo médio de sobrevida maior comparado aos pacientes com a expressão menor que a média ($p=0,044$)

De acordo com a tabela 6, podemos observar que em 100% dos pacientes que recidivaram 87% tinha uma expressão menor que 6,16, e a chance desses pacientes recidivarem foi 4 vezes maior quando comparada aos pacientes que tiveram uma expressão maior que 6,16.

Tabela 6 – Chance de recidiva em relação à expressão da variante 2

v2	ausência	presença	OR	Intervalo de confiança
≤ 6,16	87%	62,70%	3,96	1,07 - 14,71
> 6,17	13%	37,30%		

5. Discussão

Encontramos uma mudança no perfil de expressão de CD44 no CaP com uma perda de expressão da forma padrão em 71,2% dos casos e superexpressão de todas as suas variantes. Esse é o primeiro estudo que utiliza a técnica de qRT-PCR para análise de todas as variantes do gene CD44 no CaP localizado tratado com cirurgia. Além disso, interessante encontramos uma relação da maior expressão da CD44v2 com melhor chance de sobrevida livre de recidiva bioquímica.

A perda de expressão de CD44 já foi previamente descrita na literatura com o auxílio de outras metodologias, em geral imuno-histoquímica (Goodison et al., 1999). Aaltomaa et al (2001) estudaram 209 espécimes de CaP e demonstraram por imuno-histoquímica que a subexpressão de CD44s se relacionou com fatores prognósticos desfavoráveis como alto escore de Gleason, alta atividade proliferativa e com o desenvolvimento de metástases. O mesmo resultado foi encontrado por Noordzij et al (1997) que analisando 97 espécimes cirúrgicos de CaP demonstraram perda de expressão de CD44s associada de modo independente com estágios mais avançados da neoplasia.

Autores afirmam que o CD44s é expresso somente no tecido prostático benigno e sua expressão é perdida durante o processo de carcinogênese no CaP Yang et al (2010).

De acordo com Myiake et al (1998) em experimento *in vitro* com células PC3 foi observado que o CD44s desempenha um papel importante no desenvolvimento do CaP, através da redução da capacidade para se ligar ao HA. A maior expressão das variantes do CD44 no CaP já foi previamente descrita em vários cânceres, porém pouco estudada no CaP. Essa troca do

perfil de expressão de CD44 com subexpressão de CD44s e superexpressão de suas variantes pode ser importante na carcinogênese da próstata. Iczkowski et al (2006) enfatizam a importância do splicing alternativo do CD44 no CaP, onde mostraram que a re-expressão de CD44s e a inibição das variantes do CD44 através do RNA de interferência em linhagens celulares diminuiu a invasão in vitro.

O mecanismo de perda de expressão de CD44s ainda não é bem conhecido, porém pode estar relacionada com a metilação de sua área promotora.

Lou et al (1999) demonstraram que a metilação na região 5' da ilha CpG do gene CD44 está intimamente associada com a inativação da transcrição, resultando em uma expressão reduzida de CD44s no CaP. Iczkowski et al., (2011) mostraram que a redução da expressão do CD44s por metilação se relacionou com a progressão do CaP.

Além disso, já foram descritos micro RNA que tem como alvo CD44 regulando sua expressão. Yang et al (2009) demonstraram que a subexpressão de CD44s e a superexpressão de CD44v7-10 estão correlacionadas com a expressão de miR-373 e miR-520c e que a perda de expressão de CD44s tem um importante papel na invasão tumoral no CaP.

A estrutura do CD44 se torna diferente em células cancerosas porque as condições patológicas promovem o splicing alternativo e modificações pós transcricionais para produzir diversas moléculas de CD44 com uma maior afinidade pelo AH (Naor et al., 2002).

Esta interação de CD44v/AH ativa vários RTK, que através da via PI3K/AKT, inibe a apoptose e facilita a invasão tumoral. As células epiteliais do CaP superexpressam o fator de crescimento HGF que está associado a ativação do receptor cMet e aumento da interação CD44v/AH (Naughton et al., 2001; Ghatak et al., 2010).

Os éxons variáveis presentes nas diversas variantes resultado de *splicing* se encontram na região extracelular e possuem sulfato e/ou sulfato de heparina que permite a ligação a fatores de crescimento e ativação dos RTK. Já o CD44s se liga as proteínas ERM no domínio citoplasmático, e não aos fatores de crescimento (Orian-Rousseau et al., 2010).

Ghatak et al. (2010) observou em cultura de células que o HGF induz a ativação do receptor cMet e estimula a sinalização do AH/CD44v9 demonstrando a importância desse complexo na atividade de CD44 durante o processo de carcinogênese.

CD44v6 atua como um co-receptor durante a ativação de cMet pelo HGF, sendo essencial para a autofosforilação do receptor, sendo que o domínio intracitoplasmático de CD44v6 se liga as proteínas ezrina, radixina e moesina (ERM) ativando Ras promovendo a proliferação celular (Orian-Rousseau et al., 2007).

Segundo Shah et al. (2009) o crescimento e invasão do CaP, também se dá pelo o aumento de expressão de calcitonina, que age através do seu receptor a proteína G α , ativando a via da proteína quinase. Células que tem

um alto nível de calcitonina tem uma maior nível de RNAm e proteínas de CD44v7-10.

De acordo com os autores Yu et al. (2002) e Lynch et al. (2007) a interação CD44/RTK também pode acontecer através de proteases, por exemplo, CD44v3 se liga ao fator de crescimento HBEGF, que é clivado pela MMP7. O HBEGF clivado se liga ao receptor ERBB4 que ativa vias de sobrevivência celular.

No carcinoma maligno e melanoma o CD44 concentra proteases na superfície da célula, onde a produção de MMP2 e MMP9 é estimulada pela interação entre CD44/AH (Yu et al., 1999). A superexpressão MMP9 já foi estudada no CaP em nosso laboratório, mostrando que esta protease está relacionado com o CaP de alto grau (Reis et al., 2011).

De acordo com os nossos resultados, podemos observar que as variantes do CD44 apesar de serem importantes para a formação do fenótipo maligno, perdem sua função na progressão do câncer, por não terem nenhuma correlação com os marcadores prognósticos, PSA, escore de Gleason e o estadiamento patológico.

Paradis et al. (1998) também não acharam nenhuma relação entre expressão de CD44 com escore de Gleason em estudo por Imuno-histoquímica. Porém Lipponen et al. em 2001 mostraram uma relação entre a positividade de CD44 com Gleason de alto grau.

Interessantemente observamos que todas as variantes com exceção da variante 7, se mostraram menos expressas em pacientes que recidivaram,

sendo que a menor expressão de CD44v2 relacionou-se com menor sobrevida livre de recidiva bioquímica ($p=0,044$).

Não existem estudos relacionando a expressão dessa variante com a recidiva bioquímica no CaP, porém ela já foi descrita no carcinoma de células de esôfago. Gotoda et al. (2000) mostrou que expressão da CD44v2 por imuno-histoquímica foi relacionada ao melhor prognóstico em comparação com os tumores que foram CD44v2 negativos.

Talvez essa correlação da baixa expressão da variante 2 com a recidiva bioquímica possa se dever a perda de adesão celular promovida pela perda de CD44v2 permitindo a invasão e disseminação da neoplasia.

De acordo com Stewart et al. (2004) a maior mobilidade e menor adesão são acompanhadas por mudanças na expressão das MAC.

Demonstramos pioneiramente alteração no perfil de expressão de CD44 no CaP com troca de expressão da forma standard pelas suas variantes. Também mostramos que a menor expressão de CD44v2 está relacionada ao risco de recidiva bioquímica. Esse é o primeiro estudo que utiliza a técnica de qRT-PCR para avaliar todas as variantes de CD44 resultado de *splicing* alternativo e a única a usar espécimes clínicos em CaP.

Acreditamos que a troca de expressão de CD44s por suas variantes seja importante para a iniciação e promoção da neoplasia e ocorre precocemente no CaP. Por outro lado, talvez a perda de expressão das variantes de CD44 durante a progressão do CaP pode estar relacionada com a disseminação da doença. Novos estudos devem ser realizados no intuito de desvendar o papel de CD44 e suas variantes na disseminação metastática do CaP.

6. Conclusões

No câncer localizado de próstata existe uma alteração no perfil de expressão de CD44 com subexpressão de CD44s e superexpressão de todas as suas variantes, CD44v2, CD44v3, CD44v4, CD44v5, CD44v6, CD44v7, CD44v8, CD44v9 e CD44v10.

Não há relação entre a expressão de CD44s e suas variantes com os fatores prognósticos clássicos, PSA, escore de Gleason e o estadiamento patológico.

Embora a superexpressão das variantes de CD44 seja a regra no CaP, demonstramos que a maior expressão de CD44v2 correlacionou-se com melhor sobrevida livre de recidiva bioquímica pós-prostatectomia radical.

7. Perspectivas

Estudar em modelos in vitro a atividade de CD44 na ativação de cMet e os seus efeitos na proliferação, sobrevivência e motilidade celular.

Avaliar o papel de micro RNA no controle de CD44 em estudos in vitro.

8. *Anexos*

Anexo A – Tabela demonstrando as características de todos os pacientes estudados

Paciente	Idade	PSA Pré-operatório ng/mL	Escore de Gleason	Estadiamento (pT2 ou pT3)	Recidiva (0 ou 1)	Data da cirurgia
22	51	3,56	5	2	0	10/jan/98
27	73	10	5	2	0	17/jan/98
36	62	6,2	4	2	0	10/fev/98
75	74	19,6	5	3	0	19/mai/98
84	54	7,4	8	2	0	16/jun/98
89	60	4,6	5	2	0	23/jun/98
155	58	8	5	2	1	05/dez/98
171	52	12,2	8	2	0	09/jan/99
176	44	8,6	8	3	0	16/jan/99
201	60	11,3	8	3	1	16/mar/99
278	52	4	5	2	0	25/mai/99
264	59	-	8	3	-	05/ago/99
272	59	6,5	7	2	0	17/ago/99
277	59	18,1	8	2	0	24/ago/99
281	60	6,2	5	2	0	31/ago/99
284	84	4,8	7	3	0	11/set/99
293	65	10	9	2	0	21/set/99
303	73	-	8	3	-	07/out/99
321	60	4	7	2	1	23/nov/99
384	69	-	8	2	-	08/abr/00
385	57	10,37	7	2	0	08/abr/00
405	71	6,9	8	3	0	26/mai/00
406	69	12,4	7	2	0	31/mai/00
422	60	21	7	2	0	08/jul/00
459	50	6,9	8	2	0	16/jun/01
461	74	-	7	2	-	30/jun/01
469	71	-	8	2	-	17/jul/01
476	54	-	9	2	-	21/ago/01
477	63	-	7	3	-	06/jan/98
478	68	-	6	2	-	06/jan/98
481	51	-	5	2	-	10/jan/98
485	66	-	8	3	-	04/set/01
491	61	-	7	2	-	22/jan/98
492	71	8	5	2	0	03/fev/98
499	63	8,2	6	2	0	17/fev/98
501	59	13,6	8	3	0	17/fev/98
672	60	11	8	3	0	11/mai/99
746	58	12,2	7	3	0	23/set/99
560	41	6,5	5	2	0	08/jul/98
829	64	9,6	7	3	1	11/mar/00
741	60	25	8	3	1	16/set/99
551	68	8,3	6	2	1	27/jun/98
447	68	25,5	6	2	1	14/out/97
431	77	8	8	3	0	03/ago/00
432	61	4,08	7	3	0	05/ago/00
433	65	3,6	8	3	1	08/ago/00
436	49	8,7	5	2	0	14/ago/00
442	65	10	8	3	1	12/mai/01
443	49	6,39	8	2	0	12/mai/01
444	55	5,7	6	2	0	15/mai/01
445	70	15	7	3	0	15/mai/01
446	69	9	7	3	0	15/mai/01

448	63	10,2	8	3	0	17/mai/01
449	76	20	9	3	0	19/mai/01
450	72	7,77	6	2	0	22/mai/01
470	67	5,9	8	3	1	19/jul/01
480		4,9	5	2	0	28/ago/01
487	71	3,39	8	2	0	12/set/01
489	62	9,5	7	3	0	25/set/01
490	69	6	6	3	0	06/out/01
496	70	5,5	8	2	0	19/out/01
497	56	14,5	6	3	1	25/out/01
498	69	5,27	6	3	0	30/out/01
500	71	7,34	6	2	0	06/nov/01
503	73	7,7	7	2	0	17/nov/01
505	63	15,1	7	2	0	23/nov/01
506	52	2,98	8	2	0	24/nov/01
507	56	3,2	5	2	0	24/nov/01
508	69	10	6	2	0	27/nov/01
509	68	6,57	6	2	1	27/nov/01
512	71	3,4	7	2	0	13/dez/01
514	59	6,4	6	2	0	18/dez/01
515	66	14	9	3	1	03/jan/02
518	68	6,65	8	3	1	12/jan/02
519	69	-	8	3	-	15/jan/02
521	66	6,4	8	3	1	15/jan/02
522	52	5,39	9	3	1	17/jan/02
523	69	16	7	3	0	17/jan/02
524	76	7,8	8	3	0	19/jan/02
525	62	10,5	10	3	0	24/jan/02
526	73	14,2	7	2	0	07/fev/02
527	61	8,5	7	2	0	07/fev/02
528	76	9,7	7	2	0	09/fev/02
532	64	5,32	6	2	0	22/fev/02
533	73	8,06	7	2	1	22/fev/02
534	52	10,3	8	3	0	23/fev/02
535	71	4,7	8	3	0	23/fev/02
538	70	6,5	8	3	1	05/mar/02
543	65	4,8	8	2	0	30/mar/02
544	58	-	8	2	-	02/abr/02
547	64	11	8	2	0	02/abr/02
549	58	9,1	10	3	0	09/abr/02
556	58	9	8	3	0	30/abr/02
554	63	8	7	3	1	25/abr/02
448	63	10,2	8	3	0	17/mai/01

Anexo B – Aprovação do comitê de Ética

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/06/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0340/10**, intitulado: "**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA MOLÉCULA CD44 E SUAS ISOFORMAS NO CÂNCER DE PRÓSTATA**" apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Katia Ramos Moreira Leite**

Pesquisador (a) Executante: **Caio Martins Moura**

CAPPesq, 24 de Junho de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Anexo C – Tabela demonstrando a expressão de cada variante para cada paciente

Pacientes	v2	v3	v4	v5	v6	v7	v8	v9	v10	CD44S
22	2,46	7,66	0,86	3,77	1,46	0,80	1,85	2,10	2,59	0,10
27	11,17	20,57	2,43	12,70	3,94	2,70	4,16	3,40	3,39	2,71
36	13,37	23,47	3,37	18,47	4,14	1,94	5,06	3,19	4,64	0,68
75	4,37	11,47	1,36	6,66	2,57	1,33	3,76	4,48	6,94	0,22
84	6,97	15,11	1,84	7,75	1,98	3,39	3,01	1,92	2,00	0,26
89	9,76	9,08	35,76	4,42	5,07	4,93	4,39	2,99	4,00	
155	4,64	9,22	1,26	6,27	2,65	1,918	3,05	2,57	2,32	0,17
171	3,83	13,46	2,34	10,02	1,96	1,05	1,73	1,62	3,5	0,07
176	7,43	10,29	2,94	13,76	5,07	2,32	5,45	3,54	3,79	0,70
201	1,66	8,42	1,30	4,49	2,16	0,62	1,97	2,38	2,96	1,00
278	6,49	10,07	1,23	7,67	1,90	0,53	1,93	2,63	2,62	0,18
264	8,35	23,63	3,62	18,03	1,64	4,07	2,69	3,61	9,69	0,98
272	1,87	6,92	0,99	3,16	1,17	0,50	0,68	0,64	0,93	0,17
277	1,80	1,71	0,28	2,29	0,70	0,46	1,03	1,10	0,94	0,39
281	3,40	7,18	1,83	4,93	0,85	0,50	1,59	1,95	2,41	0,28
284	7,22	15,55	2,23	7,09	0,99	1,10	2,43	1,94	2,97	0,30
293	8,47	8,94	1,89	7,02	3,95	0,81	1,80	1,52	3,30	1,14
303	33,31	34,77	6,11	22,05	4,91	1,09	2,11	1,33	3,96	1,80
321	7,66	20,68	1,94	13,49	4,27	2,50	3,06	2,10	3,70	0,43
384	6,26	15,72	2,39	12,89	2,25	1,82	3,42	4,09	6,41	0,65
385	20,86	37,08	7,95	43,07	7,24	3,72	3,42	3,41	34,96	4,63
405	23,37	98,48	14,85	53,62	11,79	2,20	4,34	4,03	6,12	1,16
406	27,83	112,58	11,83	76,99	18,16	4,96	9,25	6,95	8,31	1,34
422	3,05	14,82	1,56	6,16	2,12	0,61	2,32	0,84	1,32	0,20
459	6,43	9,76	1,63	10,91	1,06	18,70	2,18	1,79	5,38	0,85
461	0,88	3,41	0,32	2,20	0,70	0,37	0,80	0,96	0,71	0,30
469	1,91	6,54	0,876	4,14	0,82	0,45	0,72	0,80	2,26	0,50
476	0,008	24,09	4,24	19,72	3,60	2,57	4,16	3,10	8,17	0,36
477	12,03	27,13	4,83	13,12	5,50	2,89	3,13	3,39	7,83	1,67
478	8,47	35,47	3,30	18,50	2,03	1,05	4,33	3,92	8,49	2,45
481	4,60	13,86	1,69	7,56	1,39	1,87	1,51	1,27	3,43	2,59
485	1,36	4,32	0,52	1,81	0,80	0,62	1,32	1,28	1,20	1,29
491	5,50	16,52	1,97	4,48	2,00	0,76	1,14	1,91	3,68	1,17
492	10,43	28,49	2,63	9,94	1,41	0,30	2,35	3,24	5,92	0,90
499	8,80	38,50	2,23	11,17	3,08	0,79	25,75	2,77	7,20	1,95
501	20,86	42,39	5,38	19,60	4,22	1,67	5,84	5,30	7,26	1,92
672	6,68	20,46	2,15	16,61	4,44	3,05	7,78	5,92	10,55	1,39
746	3,47	6,91	0,69	4,17	1,08	0,16	0,84	0,45	1,64	3,35
560	3,78	15,35	1,92	5,52	1,15	0,51	1,08	1,51	3,20	0,84
829	5,33	16,62	1,52	6,90	1,18	0,20	2,34	2,98	4,95	1,92
741	2,80	6,98	0,92	4,59	0,68	0,11	0,69	0,54	1,59	2,75
551	3,34	7,78	0,74	3,56	0,71	0,13	0,69	0,77	1,48	0,79
447	0,29	0,02	0,14	0,66	0,14	0,20	0,73	0,83	1,89	1,01
431	0,34	0,08	0,27	1,05	0,39	0,47	0,88	1,02	1,30	0,55
432	0,51	0,02	0,39	1,20	0,43	0,48	1,69	1,93	0,09	0,61
433	0,71	0,30	1,08	3,20	1,17	0,46	1,02	1,10	1,66	0,58
436	4,26	0,29	4,30	11,00	7,34	2,44	3,39	1,81	2,91	1,17
442	2,58	0,14	1,43	5,83	2,16	1,17	3,15	4,22	6,17	0,31
443	0,35	2,22	0,47	1,84	0,42	0,20	0,70	1,03	3,49	0,36
444	2,10	0,07	0,54	2,56	1,33	0,39	1,30	1,32	0,00064	0,12

445	4,81	1,44	1,57	6,28	2,09	3,44	1,68	1,69	0,00068	0,31
446	3,44	0,14	1,69	8,11	2,11	1,48	1,98	2,23	3,47	0,30
448	1,45	0,04	0,80	2,98	5,36	0,30	2,65	2,05	2,82	0,37
449	6,70	0,001	1,39	6,59	3,11	0,94	3,28	2,40	1,94	0,69
450	0,29	0,40	4,14	7,11	13,48	12,18	10,56	11,27	4,98	0,06
470	0,20	0,01	0,18	0,58	0,14	0,08	0,22	0,38	0,90	0,87
480	3,92	0,13	2,08	13,95	3,79	2,02	4,71	5,15	6,38	0,55
487	3,44	0,001	1,51	6,01	3,89	0,93	2,14	2,54	2,80	0,18
489	0,01	0,037	0,17	0,63	0,35	0,48	1,34	1,55	1,32	0,46
490	0,74	0,23	3,18	8,51	2,79	12,53	3,81	3,63	5,30	1,08
496	7,79	0,56	2,75	16,01	5,32	1,19	4,44	3,91	2,97	0,19
497	0,69	0,041	0,64	1,57	1,10	0,23	1,02	1,33	1,52	0,34
498	1,44	0,001	1,82	5,18	0,45	1,48	2,91	7,06	9,67	0,71
500	5,75	0,02	3,09	15,07	3,62	1,26	2,87	1,06	6,93	0,43
503	0,36	0,005	0,21	0,92	0,06	0,64	1,37	1,39	0,33	1,37
505	7,80	0,08	1,99	8,81	5,08	1,10	3,56	3,38	0,001	0,39
506	4,60	0,17	1,60	6,51	0,68	0,96	2,15	2,34	2,50	0,50
507	0,93	0,03	0,82	3,25	0,23	0,26	1,59	1,67	3,51	0,84
508	1,55	0,12	1,60	7,30	0,85	0,43	1,67	2,38	2,81	0,14
509	1,18	5,53	1,08	7,36	2,71	0,84	3,24	3,10	4,27	0,29
512	1,77	0,047	1,58	2,98	1,36	1,41	3,00	3,12	5,55	0,35
514	1,22	0,01	1,88	6,98	1,48	1,13	2,80	3,76	4,11	0,39
515	1,18	0,41	3,96	17,91	0,89	1,07	7,59	7,64	13,24	0,58
518	0,15	0,01	0,30	0,42	1,20	22,06	3,11	1,08	0,21	0,40
519	2,33	0,16	1,77	6,55	2,17	0,85	3,48	2,66	2,94	0,26
521	1,33	2,76	1,29	3,96	1,43	1,37	1,64	1,87	3,40	0,29
522	2,04	0,07	2,56	8,07	2,36	0,81	1,77	1,42	2,68	1,27
523	2,74	0,53	2,85	9,55	3,11	1,64	2,11	1,81	0,0005	0,89
524	1,61	0,21	2,00	6,31	2,00	0,88	2,38	3,40	3,72	0,87
525	4,85	0,27	3,76	7,96	4,42	0,96	3,48	4,51	6,46	0,53
526	0,86	0,26	0,42	1,91	0,74	1,48	1,91	1,80	3,83	0,63
527	7,47	0,07	7,64	21,95	9,43	1,64	11,98	14,30	12,32	0,47
528	18,54	0,20	14,12	49,34	12,63	3,74	10,48	11,43	40,95	1,69
532	0,35	0,04	0,28	0,93	0,16	0,34	0,40	0,84	1,07	0,27
533	24,60	39,66	7,48	33,00	7,36	3,19	5,17	6,67	0,004	0,32
534	2,41	0,001	1,60	7,02	2,02	0,67	2,53	3,24	6,97	1,18
535	4,05	0,059	2,91	12,99	4,52	21,62	2,20	2,47	5,21	0,96
538	1,63	1,51	2,74	20,71	1,06	43,07	11,32	10,50	9,25	0,168
543	2,71	0,73	4,44	14,92	3,22	1,15	3,46	4,22	7,80	0,39
544	3,62	11,07	3,76	22,86	7,03	1,04	5,85	5,37	11,07	0,53
547	0,20	0,04	0,99	3,62	0,40	1,24	1,13	1,03	1,43	0,86
549	0,07	0,01	0,44	1,92	2,24	15,79	1,79	2,03	3,17	1,30
556	89,88	143,79	28,71	112,89	35,98	0,73	24,28	25,20	0,03	0,34
554	2,30	0,38	3,17	11,73	3,36	3,42	3,53	2,91	4,46	0,33

9. Referências

Aaltomaa S, Lipponen P, Ala-Opas M, Kosma VM. Expression and prognostic value of CD44 standard and variant v3 and v6 isoforms in prostate cancer. *Eur Urol.* 2001;39:138-44.

Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* 1993;68:4-17.

Birch M, Mitchell S, Hart IR: Isolation and characterization of human melanoma cell variants expressing high and low levels of CD44. *Cancer Res.* 1991; 51:6660–67.

Corrêa LA, Bendhack ML, Souza AAO, Sabaneeff J. Câncer de Próstata: Fatores prognósticos. Sociedade Brasileira de Urologia 2006.

Crawford ED. Epidemiology of prostate cancer. *Urology* 2003; 62:3-12.

Dall P, Heider KH, Hekele A, von Minckwitz G, Kaufmann M, Ponta H, Herrlich P: Surface protein expression and messenger RNA-*splicing* analysis of CD44 in uterine cervical cancer and normal cervical epithelium. *Cancer Res* 1994; 54:3337–41.

Dall'Oglio MF, Crippa A. Câncer de Próstata Localmente Avançado. In: Nardozza A, Zerati M, Reis RB (Ed). Urologia fundamental. São Paulo: *Planmark*, 2010; 215-20.

Denmeade, S.R. and Isaacs, J.T. A history of prostate cancer treatment.

Nat. Rev. Cancer 2002; 2:389-36.

Desai B, Ma T, Zhu Z, Chellaiah M. Characterization of the Expression of Variant and Standard CD44 in Prostate Cancer Cells: Identification of the Possible Molecular Mechanism of CD44/MMP9 Complex Formation on the Cell Surface. *J Cell Biochem.* 2009;108:272–84.

Djavan B, Zlotta A, Remzi M, Ghawidel K, Basharkhah A, Schumal CC, Marberger M. Optimal predictors of prostate cancer on repeat prostate biopsy: a prospective study of 1,051 men. *J Uro.* 2000;163:1144-48.

Ghatak S, Hascall VC, Markwald RR, Misra S. Stromal hyaluronan interaction with epithelial CD44 variants promotes prostate cancer invasiveness by augmenting expression and function of hepatocyte growth factor and androgen receptor. *J Biol Chem.* 2010;285:19821-32.

Giovannucci EL, Liu Y, Platz EA, Stampfer MJ, Willett WC. Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *Int J Cancer* 2007;121:1571 – 8.

Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: A perspective. *Hum Pathol.* 1992;23:273-279.

Goodison S, Urquidi V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol.* 1999;52:189-96.

Gotoda T, Matsumura Y, Kondo H, et al. Expression of CD44 variants and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut* 2000;46:14-19.

Harrison GM, Davies G, Martin TA, Jiang WG, Mason MD. Distribution and expression of CD44 isoforms and Ezrin during prostate cancer-endothelium interaction. *Int J Oncol*. 2002;21:935-40.

Heider KH, Dammrich J, Skroch-Angel P, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP, Herrlich P, Ponta H: Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res*. 1993;53:4197–4203.

Iczkowski KA, Bai S, Pantazis CG. Prostate cancer overexpresses CD44 variants 7-9 at the messenger RNA and protein level. *Anticancer Res*. 2003;23:3129-40.

Iczkowski KA. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. *Am J Transl Res*. 2011;3:1-7.

Iczkowski KA, Omara-Opyene AL, Shah GV. The predominant CD44 splice variant in prostate cancer binds fibronectin, and calcitonin stimulates its expression. *Anticancer Res*. 2006; 26:2863-72.

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Ministério do Brasil, Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Dados de 2012.

Isaacs, W., De Marzo, A. and Nelson, W.G. (2002) Focus on prostate cancer.

Cancer Cell 2002; 2:113-116.

Joensuu H, Klemi PJ, Toikkanen S, Jalkanen S. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol.* 1993;143:867-74.

Joensuu H, Ristamaki R, Klemi PJ, Jalkanen S. Lymphocyte homing receptor (CD44) expression is associated with poor prognosis in gastrointestinal lymphoma. *Br J Cancer* 1993;68: 428–432.

Jonathan L. Wright, MD, MS, Paul H. Lange Md, FACS. Newer potential biomarkers in prostate cancer. *Rev Urol.* 2007;9:207-213.

Lesley J, English N, Charles C, Hyman R. The role of the CD44 cytoplasmic and transmembrane domains in constitutive and inducible hyaluronan binding. *Eur J Immunol.* 2000;30:245–253.

Lipponen P, Aaltomaa S, Tammi R, Tammi M, Agren U, Kosma VM. High stromal hyaluronan level is associated with poor differentiation and metastasis in prostate cancer. *Eur J Cancer* 2001;37:849-56.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^(-Delta Delta CT) Method. *Methods.* 2001;25:402-8.

Loeb S, Carter HB, Berndt SI, et al. Complications after prostate biopsy: data from SEER-medicare. *J Urol.* 2011;186:1830-4.

Lou W, Krill D, Dhir R, Becich M, Dong JT, Frierson, Jr., William B. Isaacs, John T. Isaacs, and Allen C. Gao. Methylation of the CD44 Metastasis Suppressor Gene in Human Prostate Cancer . *Cancer Res.* 1999;59: 2329–31.

Lynch CC, Vargo-Gogola T, Martin MD, Fingleton B, Crawford HC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase 7 mediates mammary epithelial cell tumorigenesis through the ErbB4 receptor. *Cancer Res.* 2007;67:6760–67.

Matsumura Y, Hanbury D, Smith J, Tarin D: Non-invasive detection of malignancy by identification of unusual CD44 gene activity in exfoliated cancer cells. *BMJ* 1994;308:619–24.

Misra S, Heldin P, Hascall VC, Karamanos NK, Skandalis SS, Markwald RR, Ghatak S. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J.* 2011;278:1429-43.

Miyake H, Hara I, Okamoto I, Gohji K, Yamanaka K, Arakawa S, Saya H, Kamidono S. Interaction between CD44 and hyaluronic acid regulates human prostate cancer development. *J Urol.* 1998;160:1562-6.

Moreira-Leite K et al. Upgrading the Gleason score in extended prostate biopsy: implications for treatment choice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;73:353-6.

Moul JW, Kane CJ, Malkowicz SB. The role of imaging studies and molecular markers for selecting candidates for radical prostatectomy. *Urol Clin North AM* 2002; 8:459-472

Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2002;39:527-79.

Naughton M, Picus J, Zhu X, Catalona WJ, Vollmer RT, Humphrey PA. Scatter factor-hepatocyte growth factor elevation in the serum of patients with prostate cancer. *J Urol*. 2001;165:1325-8.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™ Prostate Cancer Early Detection, V.2.2010. Page 15. www.nccn.org.

Noordzij MA, van Steenbrugge GJ, Verkaik NS, Schröder FH, van der Kwast TH. The prognostic value of CD44 isoforms in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Clin Cancer Res*. 1997;3:805-15.

Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer* 2010;46:1271-77.

Orian-Rousseau V, Morrison H, Matzke A, Kastilan T, Pace G, Herrlich P, Ponta H. Hepatocyte growth factor-induced Ras activation requires ERM proteins linked to both CD44v6 and F-actin. *Mol Biol Cell* 2007;18:76-83.

Paradis V, Eschwege P, Loric S, Dumas F, Nathalie B, Benoit G, Jardin A, Bedossa P. De novo expression of CD44 in prostate carcinoma is correlated with systemic dissemination of prostate cancer. *Clin. Pathol*. 1998;51:798-802.

Partins AW, Feneley MR indicators of pathologic stage of prostate cancer and their use in clinical practice. *Urol Clin North Am* 2001;28:3.

Perrer SI, et al. Cancer Statistics, 1996. *Cancer J Clin*. 1996;46:5-27.

Pontes J Jr, Srougi M, Borra PM, Dall' Oglio MF, Ribeiro-Filho LA, Leite KR. E cadherin and beta-catenin loss of expression related to bone metastasis in prostate cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18:179-84.

Qiu SD, Young CY, Bilhartz DL, Prescott JL, Farrow GM, He WW, Tindall DJ. In situ hybridization of prostate-specific antigen RNAm in human prostate. *J Urol*. 1990;144:1550-6.

Rall CJ, Rustgi AK: CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1995;55:1831–35.

Reis RB, Cassini MF. Antígeno Prostático Específico (PSA). In: Nardozza A, Zerati M, Reis RB (Ed). *Urologia fundamental* 2010. São Paulo: Planmark, p. 189-194.

Reis ST, Pontes J Jr, Villanova FE, Borra PM, Antunes AA, Dall'oglio MF, Srougi M, Leite KR. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases: susceptibility and prognostic implications for prostate cancer. *J Urol*. 2009; 181:2320-5.

Roehl KA, Loeb S, Antenor JA, Corbin N and Catalona WJ: Characteristics of patients with familial versus sporadic prostate cancer. *J Urol*. 2006;176:2438.

Roobol MJ, Steyerberg EW, Kranse R, et al. A risk-based strategy improves prostate-specific antigen-driven detection of prostate cancer. *Eur Urol*. 2010;57:79-85.

Schmid H-P, Engeler DS, Pummer K, et al. Prevention of prostate cancer: more questions than data. *Recent Results Cancer Res*. 2007;174:101-7.

Schröder FH, van der Maas P, Beemsterboer P, Kruger AB, Hoedemaeker R, Rietbergen J, Kranse R. Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. Rotterdam section of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:1817-23.

Schulz WA, Burchardt M, Cronauer, MV. Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod.* 2003;9: 437-48.

Shah GV, Muralidharan A, Thomas S, Gokulgandhi M, Mudit M, Khanfar M, El Sayed K. Identification of a small molecule class to enhance cellcell adhesion and attenuate prostate tumor growth and metastasis. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:509-520.

Srougi M, Ribeiro LA, Piovesan AC, Colombo JR, Nesrallah A. Doenças da próstata. *Rev Med.* 2008;87:166-77.

Stewart DA, Cooper CA, Sikes RA. Changes in extracellular matrix (ECM) and ECM-associated proteins in the metastatic progression of prostate cancer. *Repr Biol Endocr* 2004;2:1-13

Thomas, GJ, Jones J, Speight MP. Integrins and Oral Cancer. *Oral Oncol.* Oxfor 1999;6:365-399.

Thompson IM, Pauler DK, Goodman PJ, et al. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med.* 2004;350:2239-46.

Thorne, R.F., Legg, J.W., Isacke, C.M. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J. Cell Sci.* 2004;26:373-80.

Toole BP. HyaluronN IN MORPHOGENESSIS. *Semin Cell Dev Biol.* 2001;12:79-87.

Uhlsteidl M, Mullerholzner E, Zeimet AG, Adolf GR, Daxenbichler G, Marth C, Dapunt O: Prognostic value of CD44 splice variant expression in ovarian cancer. *Oncology* 1995;52:400–06.

Welsh HG, Fisher ES, Gottlieb DJ, Barry MJ. Detection of prostate cancer via biopsy in the medicare- SEERpopulation during the PSA era. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:1395-400.

Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST: Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* 1993;53:4754–4756.

Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA. MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol.* 2009;2:361-9.

Yang K, Tang Y, Habermehl G, Iczkowski K. Stable alterations of CD44 isoform expression in prostate cancer cells decrease invasion and growth and alter ligand binding and chemosensitivity. *BMC Cancer* 2010;14:10-16.

Yu WH, Woessner JF Jr, McNeish JD, Stamenkovic I. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev.* 2002;16:307-23.

Yu, Q, Stamenkovic, I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* 1999;13, 35–48.

Zequi SC, Madeica Campos RS. Câncer de Próstata Localizado. In: Nardozza A, Zerati M, Reis RB (Ed). *Urologia fundamental* 2010. São Paulo: Planmark, p. 205-214.

Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature Reviews Cancer* 2011;11:254-267.

Apêndices

Artigo Científico Submetido

1. Urologic Oncology

CD44 expression and prognosis in prostate cancer – Evaluation of the standard CD44 form and all of the CD44 isoforms by quantitative real time PCR

Congressos

1. XXVIII Congresso brasileiro de Patologia

Isoformas de CD44, resultado de splicing alternativo e os fatores prognóstico no câncer de prostate

2. XXXIII Congresso Brasileiro de Urologia

Perfil da expressão das variantes do CD44 no câncer de próstata

Ética

1. Aprovação no comitê de Ética sob número 0340/10

CD44 expression and prognosis in prostate cancer – Evaluation of
the standard CD44 form and all of the CD44 isoforms by
quantitative real time PCR

Caio M. Moura, Jose Pontes Jr, Sabrina T. Reis, Nayara Viana, Miguel
Srougi, Katia R. M. Leite

Laboratory of Medical Research, Department of Urology – LIM55

University of Sao Paulo Medical School

Correspondent author

Katia R. M. Leite, MD, PhD
Av. Dr. Arnaldo 455, Room 2145
01246-903, Sao Paulo, Brazil
Tel 55 11 30617183
katiaamos@uol.com.br

Abstract

Objectives: Our aim in this study was to analyze the expression of CD44s and the variants v2, v3, v4, v5, v6, v7, v8, v9 and v10 in surgical specimens of localized PCa to determine if there is a relationship between the expression profile and the classical prognostic factors and biochemical recurrence.

Methods: Ninety-four surgical specimens from patients who underwent radical prostatectomy between October 1997 and April 2002 were analyzed in this study. The expression levels of CD44s and all nine variants were analyzed by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The control group consisted of 14 specimens from patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) who underwent open surgery. We correlated the expression of the variants with the Gleason score, pathological stage and pre-operative Prostate Specific Antigen (PSA) levels of the patient. Moreover, we correlated the expression profile with biochemical recurrence, as defined by a PSA higher than 0.2 ng/ml in a mean follow-up of 53.3 months.

Results: CD44s was underexpressed, and all isoforms were overexpressed in PCa. The mean expression of most variants was higher in patients who have not recurred, and a higher expression of CD44v2 correlated with a better survival rate ($p=0.044$). There was no correlation between the expression of any of the CD44 isoforms and the Gleason score, pre-operative PSA or pathological stage.

Conclusion: In PCa, there is a change in the expression of CD44 with a loss of CD44s and an overexpression of all of the CD44 variants. However, during cancer progression, there is a loss of expression of all variants, with a relationship between lower expression of CD44v2 and biochemical recurrence. Based on our results, we propose CD44v2 as a prognostic marker for prostate cancer.

Introduction

Prostate cancer (PCa) is a non-cutaneous cancer and is the second leading cause of cancer death in men in Brazil, with 60.180 new cases estimated for 2012 [1]. With the introduction of prostate-specific antigen (PSA) as a diagnostic marker and screening programs for early diagnosis, the stage at which these tumors are diagnosed has shifted [2]. However, while PSA is an organ-specific marker, it is not disease-specific, and levels of PSA also rise in benign conditions [3]. Therefore, efforts are being made to discover new diagnostic and prognosis markers.

CD44 is a multifunctional cell surface molecule and a transmembrane glycoprotein that is involved in various cellular activities, such as cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, cell trafficking, cell migration, lymph node homing, presentation of growth factors, regulation of chemokines and cytokines, signal transmission from the cell surface to the interior of the cell, apoptosis and cell survival [4,5]. Because of its broad role in cellular homeostasis, CD44 has been studied as a potential marker of aggressiveness in various neoplasms.

Tumorigenesis promote alternative splicing and post-transcriptional modifications in the CD44 RNAm to produce a number of CD44 isoforms, including isoforms that have a higher affinity for hyaluronic acid (HA), a factor that is implicated in tumorigenesis [6]. The CD44 RNAm consists of 20 exons, and 10 of these 20 exons undergo alternative splicing to form 10 different variants (v1-v10), which are collectively known as CD44v. The other

10 exons comprise the standard form of CD44, known as CD44s (Figure 1) [7].

CD44v expression was previously found to be associated with the development and aggressiveness of breast cancer [8], bladder cancer [9] and colorectal carcinoma [10]. However, only a few studies have explored CD44 expression in PCa, mostly using immunohistochemistry.

Our aim is to evaluate the expression profile of CD44s and the variants v2, v3, v4, v5, v6, v7, v8, v9 and v10 in specimens from men with localized PCa who underwent radical prostatectomy and to correlate the expression of these variants and CD44s with prognostic factors and biochemical recurrence.

Materials and Methods

The study population consisted of 94 patients with PCa who underwent radical prostatectomy from December 1997 to August 2001. The mean age was 63.6 years-old (SD 8 years), the mean PSA serum levels were 9.4 ng/ml (SD 4.8 ng/ml), 56.8% were staged pT2 and the mean Gleason score was 7.1 (SD 1.3). Fourteen cases of BPH were used as controls. The mean age of the control subjects was 70.1 years-old (SD 6.2 years), and the mean PSA was 2.4 ng/mL (SD 1.4 ng/ml). All patients underwent surgery by the same surgeon and all subjects provided informed consent to participate in the study and to donate their biological samples for analysis. Approval for the study was given by the Institutional Board of Ethics n° 0340/10.

RNA Extraction

Fresh surgical specimens were examined immediately after resection by the pathologist, and 1 cm² fragments were frozen and stored at -170 °C in liquid nitrogen.

Total RNA was isolated with an RNAaqueous Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined by measuring absorbance at 260/280 nm using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA). cDNA was generated using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reactions

were incubated at 25°C for 10 min., followed by 37°C for 120 min and 85° C for 5 min. The cDNA was stored at -20°C until use.

Quantitative Real-Time PCR and Gene Expression

Expression levels of all variants and CD44s were analyzed by qRT-PCR using an ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Target sequences were amplified in a 10 µL reaction containing: 0.75 µl of the reverse primer and 0.75 µl of the isoform-specific forward primer (Table 1), 5 µl of SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 2.5 µl of RNA and 1 µl of cDNA. The PCR cycling conditions were 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 1 min at 60°C, 20 seconds at 58 °C . The β2M assay was used as the endogenous control.

Statistical Analysis

The $\Delta\Delta CT$ method was used to calculate the relative expression of the target genes using the formula $\Delta\Delta CT = (CT \text{ target gene, PCa sample} - CT \text{ endogenous control, PCa sample}) - (CT \text{ target gene, BPH tissue sample} - CT \text{ endogenous control, BPH})$. The fold change in gene expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta CT}$.

To analyze expression with respect to pathological stage, grade, PSA value and recurrence, we used the T Student test for homogeneous variables or the Mann–Whitney test for heterogeneous variables. Statistical analysis

was performed using SPSS 19.0 for Windows, and the results were considered significant if $p \leq 0.05$.

Results

There was a decrease in the expression of CD44s in 71.2% of the cases, and an overexpression of all variants generated by alternative splicing in PCa compared to the BPH control (Figure 2, Table 2).

We did not observe a correlation between the expression profile of CD44 and the Gleason score, pathological stage or pre-operative PSA levels (Table 3).

The relationship between the expression of CD44v and the recurrence-free survival rate was examined in 90 patients with PCa during a mean follow-up period of 53.3 months. Biochemical recurrence was considered to occur when the PSA level was >0.4 ng/mL. In addition to a change in expression of CD44 from the standard form to the variant forms, the mean expression of all variants, except CD44v7, was higher in patients who did not experience recurrence (Table 4). In addition, the Kaplan-Meier curve demonstrated that patients with higher expression levels of CD44v2 had a better survival rate ($p=0.044$) (Figure 3).

Discussion

This is the first study to quantify all variants of CD44 by qRT-PCR in prostate cancer. Our results corroborate those of previous studies that used immunohistochemistry to demonstrate a loss of CD44s in PCa and higher levels of the variant forms [11,12]. In addition, we were able to show that higher levels of CD44v2 correlated with a better survival rate without biochemical recurrence, which has previously been observed in other neoplasias.

CD44 is the main receptor for the glycosaminoglycan hyaluronan, which is the major component of the extracellular matrix in mammalian tissues. During the rapid matrix remodeling that occurs during embryogenesis, inflammation and tumorigenesis, there is an increase in the amount of hyaluronan that is attached to enzymes and receptors. The regulation of the interaction between hyaluronan and hyaluronan-binding proteins is crucial for several physiological processes, and the disturbance of these interactions has been related to tumorigenesis. In order for hyaluronan to be able to function in signaling, it must bind to the constitutively active CD44 variant, which is one of three forms of CD44. The other two forms of CD44 include a form that is unable to bind to hyaluronan and a form that can bind only when activated by physiological stimuli. CD44 is encoded by only one gene, but it undergoes alternative splicing to generate many different isoforms. The shortest form is CD44s, which is expressed in normal tissues, while the variants contain a variable number of exon insertions at the proximal plasma membrane external region and are expressed in cancer

cells. The additional exons in the ectodomain can be decorated with chondroitin sulfate and/or heparin sulfate, which enables CD44 to bind to growth factors. The standard and smaller form binds only to ankyrin and ezrin-radixin-moesin proteins to provide a link to the cytoskeleton while abrogating binding to growth factors. However, the interaction between CD44 and hyaluronan synthases and hyaluronidases is much more complex and is variable in different organs. This complexity may explain why CD44 is related to a poor prognosis in some neoplasias, but not in prostate cancer [13].

Previous research suggested that CD44s is only expressed in benign prostate tissue and that this expression is lost during carcinogenesis [12]. It is expected that methylation of the CD44s promoter would be the mechanism through which CD44s expression is downregulated, and methylation of the CD44 promoter and has been correlated with PCa progression [14,15]. For example, Lou and colleagues demonstrated that methylation of the CD44 promoter occurs in 77.5% of primary prostate cancer specimens, 75% of distant metastases, but in only 10% of matched normal tissues [16].

In addition, microRNA (miRNA)-mediated post transcriptional regulation may play an important role in CD44s downregulation in cancer. A previous study published by Yang and colleagues showed that the miRNAs 373 and 520c are expected to target CD44s to promote its downregulation, and overexpression of these miRNAs is related to carcinogenesis [17].

Methylation, however, cannot account for the increased expression of the variant isoforms. CD44v expression is characteristic of cancer; thus, alternative splicing must also play a major role in tumorigenesis. These

variants have an increased ability to interact with HA, which in turn activates several tyrosine kinase receptors and can serve as co-receptors for growth factors, such as hepatocyte growth factor (HGF), fibroblasts growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF). These interactions with growth factors upregulate the MAPK and PI3K pathways, facilitating cell invasion of tissues [4]. However, while some studies have tried to address the mechanism through which CD44 variants interfere with tumor behavior, the role of CD44 variants is not completely understood. CD44v9 forms a complex with HGF and its receptor c-Met, which activates the tyrosine kinase signaling pathway to promote cell proliferation. HGF promotes the synthesis of CD44v9, which interacts with stromal-derived hyaluronan to stabilize the androgen receptor and inhibit apoptosis [18].

Furthermore, Robbins et al (2008) demonstrated that calcitonin acts as a paracrine growth factor to up-regulate CD44 variants in PCa by facilitating the splicing process through the protein kinase A and p38 pathways [19].

There was no correlation between CD44s and CD44v expression and the prognostic factors. We believe that the change in expression from the CD44s form to the alternative forms is a precocious event in prostate carcinogenesis that is related to cancer initiation and promotion but not to tumor progression.

Interestingly, when we analyzed the biochemical recurrence, we observed that all variants, with the exception of CD44v7, were downregulated compared to patients who did not experience biochemical recurrence. In addition, by analyzing the biochemical recurrence-free survival Kaplan-Meier

curve, we observed that a higher expression of CD44v2 correlated with less aggressiveness tumor ($p=0.044$). While this is the first study to correlate CD44v2 with PCa free of biochemical recurrence survival rate behavior, Gotoda et al showed by immunohistochemistry that in esophageal squamous cell carcinoma, CD44v2 expression correlates with a significantly better prognosis compared to tumors without CD44v2 expression [20].

We conclude that during prostate tumorigenesis, there is a loss of CD44s expression, and as a result of alternative splicing, there is a corresponding increase in the expression of its variants. We expect that this phenomenon is important in the early stages of carcinogenesis due to modifications of signaling pathways and changes in cellular activities. We believe that during cancer progression, these variants are also lost and that this loss facilitates tumor recurrence and dissemination. Based on our results, we propose CD44v2 as a prognostic marker for prostate cancer.

References

- [1] INCA (Instituto Nacional do Câncer). Ministério do Brasil, Brasil. Available at <http://www.inca.gov.br> data 2012.
- [2] Carter HB, Pearson JD, Metter EJ, et al. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 1992;267:2215-20.
- [3] Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994;151:1283-90.
- [4] Misra S, Heldin P, Hascall VC, et al. Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS J* 2011;278:1429-43.
- [5] Zoller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nature Reviews Cancer* 2011;11:254-267.
- [6] Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002;39:527-79
- [7] Borland G, Ross JA, Guy K. Forms and functions of CD44. *Immunology* 1998;93:139-48.
- [8] Krishnamachary B, Penet MF, Nimmagadda S, et al. Hypoxia Regulates CD44 and Its Variant Isoforms through HIF-1 α in Triple Negative Breast Cancer. *PLoS One* 2012; 7:44078.
- [9] Omran OM, Ata HS. CD44s and CD44v6 in diagnosis and prognosis of human bladder cancer. *Ultrastruct Pathol* 2012;36:145-52.
- [10] Al-Maghrabi J, Gomaa W, Buhmeida A, Al-Qahtani M, Al-Ahwal M. Decreased Immunoexpression of Standard Form of CD44 Is an Independent Favourable Predictor of Nodal Metastasis in Colorectal Carcinoma. *Anticancer Res* 2012;32:3455-61.
- [11] Iczkowski KA, Bai S, Pantazis CG. Prostate cancer overexpresses CD44 variants 7-9 at the messenger RNA and protein level. *Anticancer Res*. 2003;23:3129-40.
- [12] Iczkowski KA. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer. *Am J Transl Res* 2011;3:1-7.

- [13] Orian-Rousseau V. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur J Cancer* 2010;46:1271-77.
- [14] Verkaik NS, van Steenbrugge GJ, van Weerden WM, Bussemakers MJ, van der Kwast TH. Silencing of CD44 expression in prostate cancer by hypermethylation of the CD44 promoter region. *Lab Invest* 2000;80:1291-8.
- [15] Kito H, Suzuki H, Ichikawa T, et al. Hypermethylation of the CD44 gene is associated with progression and metastasis of human prostate cancer. *Prostate* 2001;49:110-5.
- [16] Lou W, Krill D, Dhir R, et al. Methylation of the CD44 metastasis suppressor gene in human prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59:2329-31.
- [17] Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA. MicroRNAs 373 and 520c are downregulated in prostate cancer, suppress CD44 translation and enhance invasion of prostate cancer cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol* 2009;2:361-9.
- [18] Ghatak S, Hascall VC, Markwald RR, Misra S. Stromal hyaluronan interaction with epithelial CD44 variants promotes prostate cancer invasiveness by augmenting expression and function of hepatocyte growth factor and androgen receptor. *J Biol Chem* 2010;285:19821-32.
- [19] Robbins EW, Travanty EA, Yang K, Iczkowski KA. MAP kinase pathways and calcitonin influence CD44 alternate isoform expression in prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2008;8:260.
- [20] Gotoda T, Matsumura Y, Kondo H, et al. Expression of CD44 variants and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut* 2000;46:14-9.

Figure 1. Structure of the CD44 gene, which includes 20 exons, 10 of which (exons 6-15) undergo alternative splicing to form the variants v1-v10. The exons that do not undergo alternative splicing form CD44s.

Figure 2. CD44v and CD44s profile expression in 94 patients with PCa compared to the BPH control.

Figure 3. Recurrence-free survival curve of 90 patients in relation to CD44v2 expression. Patients who did not experience biochemical recurrence had a higher expression of CD44v2 ($p=0.044$).

Table 1. Primers used for quantification of the expression of CD44.

Gene	Primers
CD44v2	5' TTG ATG AGC ACT AGT GCT ACA GCA 3' 5' CAT TGT GTT GTT GTG TGA AGA TG 3'
CD44v3	5' TAC GTC TTC AAA TAC CAT CTC AGC 3' 5' GGT GCT GGA GAT AAA ATC TTC ATC 3'
CD44v4	5' TCA ACC ACA CCA CGG GCT TTT GAC 3' 5' AGT CAT CCT TGT GGT TGT CTG AAG 3'
CD44v5	5' TGT AGA CAG AAA TGG CAC C 3' 5' CTT GTG CTT GTA GAA TGT GG 3'
CD44v6	5' AGG AAC AGT GGT TTG GCA AC 3' 5' CGA ATG GGA GTC TTC TCT GG 3'
CD44v7	5' TGC AAG GAA GGA CAA CAC CAA 3' 5' GGG TGT GAG ATT GGG TTG AAG AAA 3'
CD44v8	5' TCA GCC TAC TGC AAA TCC AA 3' 5' GAG GTC CTG TCC TGT CCA AA 3'
CD44v9	5' GGC TTG GAA GAA GAT AAA GAC C 3' 5' TGC TTG ATG TCA GAG TAG AAG TTG 3'
CD44v10	5' GGA ATG ATG TCA CAG GTG GA 3' 5' AGG TCA CTG GGA TGA AGG TC 3'
CD44s	5' AAA GGA GCA GCA CTT CAG GA 3' 5' TGT GTC TTG GTC TCT GGT AGC 3'
B2M	5' TCT CTG CTG GAT GAC GTG AG 3' 5' TCT CTC TTT CTG GCC TGG AG 3'

Table 2. Expression of CD44s and its variants in prostate cancer compared to BPH.

	CD44									
N(94)	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10	S
Overexpression	79.8%	53.2%	73.5%	94.7%	75.6%	54.3%	88.3%	89.4%	86.2%	28.8%
Underexpression	20.2%	46.8%	26.5%	5.3%	24.4%	45.7%	11.7%	10.6%	13.8%	71.2%
Mean	6.2	11.4	3.1	11.5	3.3	2.8	3.5	3.2	4.7	0.8
Standard deviation	10.7	22.5	5.0	15.8	4.5	5.9	3.9	3.3	5.7	0.77

Table 3. CD44 expression related to biochemical recurrence after radical prostatectomy.

	Recurrence	Mean	Std. Deviation	p
CD44v2	no	7.17	12.27	0,044
	yes	3.41	5.14	
CD44v3	no	12.24	25.81	0,516
	yes	8.60	11.45	
CD44v4	no	3.55	5.87	0,227
	yes	1.99	1.72	
CD44v5	no	12.33	17.95	0,476
	yes	9.54	8.68	
CD44v6	no	3.79	5.24	0,184
	yes	2.18	1.91	
CD44v7	no	2.48	4.18	0,300
	yes	3.85	9.64	
CD44v8	no	3.76	4.42	0,479
	yes	3.06	2.59	
CD44v9	no	3.40	3.67	0,580
	yes	2.94	2.53	
CD44v10	no	4.87	6.46	0,642
	yes	4.20	3.58	
CD44s	no	0.80	0.79	0,857
	yes	0.77	0.71	

Ms. Ref. No.: URO-D-12-00383

Title: CD44 expression and prognosis in prostate cancer - Evaluation of the standard CD44 form and all of the CD44 isoforms by quantitative real time PCR
Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations

Dear Mr Moura,

Thank you for submitting your manuscript entitled
"CD44 expression and prognosis in prostate cancer - Evaluation of the standard CD44 form and all of the CD44 isoforms by quantitative real time PCR". We have assigned it Number URO-D-12-00383.

Please use this manuscript number in any correspondence with us.

Your manuscript will be reviewed by experts in the field, according to the keywords you have provided. You will hear from us as soon as their reviews are completed (usually approximately 4-6 weeks).

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/uro/>
2. Enter your login details

Certificado

13 e 14 de outubro de 2011 - Centro de Eventos Raul Cardoso Maciel - Alagoas - Brasil

Certificamos que

Moura, CM; Reis, ST; Moraes, DR; Viana, NI; Amorim, JS; Dallooglio, MF; Canavez, JS; Strougi, M; Pontes, J;

Leite, KRM;

apresentaram o trabalho

**ISOFORMAS DE CD44 RESULTADO DE SPLICING ALTERNATIVO E OS FATORES PROGNÓSTICOS NO
CÂNCER DE PRÓSTATA**
na Sessão Pôsteres de UROPATOLOGIA.

Maceió, 15 de outubro de 2011.

Fernando Augusto Soares
Presidente do XXVIII Congresso Latino-Americano de Patologia

Henrique de Oliveira Costa
Presidente do XXVIII Congresso Brasileiro de Patologia

Promoção e Realização

Sociedade Brasileira de Patologia

Sociedade
Latinoamericana
de Patologia

CERTIFICADO

Certificamos que

Caio Martins Moura

participou do XXXIII Congresso Brasileiro de Urologia, realizado no período de 22 a 26 de novembro de 2011, no Centro de Convenções de Florianópolis, Santa Catarina.

Na qualidade de Autor do trabalho *"Perfil da Expressão das Variantes do CD44 no Câncer de Próstata"*.

Florianópolis, 26 de novembro de 2011

Edmar Melchior
Presidente do Congresso

Alexandre M. de Araújo
Presidente do Sindicato Nacional
de Urologia

Uma ponte para o futuro.

FLORIANÓPOLIS - SC - BRASIL
Centro de Convenções de Florianópolis
22 a 26 de novembro de 2011

Realização:

patrocinador oficial