

**Vanessa Karen de Sá**

**Identificação do perfil de expressão dos  
*splicings* alternativos dos genes das  
hialuronidases em adenocarcinoma de próstata**

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

Área de concentração: Urologia

Orientadora: Dra. Kátia Ramos Moreira Leite

São Paulo

2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sá, Vanessa Karen de

Identificação do perfil de expressão dos *splicings* alternativos dos genes das hialuronidases em adenocarcinoma de próstata / Vanessa Karen de Sá. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Urologia.

Orientadora: Kátia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata 2.Hialuronoglucosaminidase 3.Ácido hialurônico 4.Processamento alternativo

USP/FM/SBD-317/08

## *Dedicatória*

Aos meus pais, Pedro e Inez (*In memoriam*), por me proporcionarem a vida e pelo exemplo de dedicação, coragem e perseverança, fonte de inspiração nas horas de dificuldade.

Às minhas irmãs, Tania e Elaine, apoio perene, alicerce de meu porto seguro.

Aos meus sobrinhos, Vinicius, Renato e Luiza, fonte de alegria e descanso.

Ao meu noivo, Felipe, por tudo que representa em minha vida.

Aos meus amigos, em especial, a Rose e Leonardo, pelas palavras de conforto e pelos momentos de alegria e descontração.

## *Agradecimentos*

À **Dra. Kátia Ramos**, pela orientação e por todos os ensinamentos não apenas científicos.

Ao caríssimo **Prof. Dr. Miguel**, a quem devo respeito e gratidão por todo auxílio e carinho durante este percurso.

Ao **Prof. Dr. Álvaro Sadek Sarkis** e **Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho**, pela oportunidade a mim franqueada de ingresso ao Laboratório de Biologia Molecular, origem de minha dissertação de mestrado.

Ao **Prof. Dr. Roger Chammas**, ao **Dr. Carlo Passerotti** e à **Dra. Walcy Teodoro**, pela contribuição científica no exame de qualificação.

À **Adriana Sañudo** pela precisão e rapidez nas análises estatísticas.

Aos amigos do Laboratório, **Iran, Mario, José Pontes** e **Célia**, pelo incentivo, apoio e amizade.

À **Prof. Dra. Vera Capelozzi** e ao **Dr. Edwin Roger Parra-Cuentas**, pelo acolhimento e contribuição.

À **Dra. Marta Privato**, pelo auxílio na elaboração dos desenhos.

Às secretárias da Urologia **Ionis, Elisa, Maria Aparecida** e **Inisabete**, pela prestatividade.

À **CAPES**, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Aos pacientes, pela valiosa contribuição.

# Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Generalidades.....	2
1.2 Conceitos gerais sobre glicosaminoglicanos e proteoglicanos .....	6
1.3 Ácido Hialurônico .....	10
1.4 Hialuronidases .....	14
1.5 <i>Splicing</i> Alternativo.....	17
1.6 <i>Splicing</i> alternativo das HYAL.....	22
2. OBJETIVOS.....	26
3. MÉTODOS.....	28
3.1 Casuística .....	29
3.2 Exame anátomo-patológico.....	30
3.2.1 Exame Macroscópico .....	30
3.2.2 Exame Microscópico.....	31
3.2.3 Processamento da amostra.....	32
3.2.4 Cultura de Células Tumerais .....	32
3.3 Extração do RNA total.....	34
3.3.1 Tratamento do RNA total com DNase.....	35
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase da Transcriptase Reversa (RT-PCR).....	36
3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) qualitativa.....	37
3.6 Purificação de DNA.....	40
3.6.1 Re-amplificação de DNA purificado .....	41
3.7 Seqüenciamento de DNA.....	41
3.7.1 Precipitação da Reação de Seqüenciamento com glicogênio .....	42

4. RESULTADOS.....	44
4.1 Pacientes .....	45
4.2 Expressão das HYAL 1, 2 e 3 .....	45
4.3 Associação entre expressão das HYAL1, 2 e 3 e recidiva tumoral ..	47
4.4 Associação entre expressão das HYAL1, 2, e 3 e escore de Gleason.....	51
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÕES.....	59
7. ANEXOS.....	61
8. REFERÊNCIAS .....	67
Apêndice.....	79

## *Lista de abreviaturas*

$\mu$ l	-	Microlitro
$\mu$ m	-	Micrometro
cDNA	-	DNA complementar
CP	-	Câncer de próstata
DEPC	-	Dietil Pirocarbonato
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DNase	-	Deoxiribonuclease
dNTPs	-	deoxinucleotídeos
DTT	-	Ditiotreitol
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG	-	Escore de Gleason
HYAL	-	Gene da hialuronidase
Hyal	-	Proteína da hialuronidase
kDa	-	Kilodalton
LNCaP	-	Câncer de próstata linfonodo-positivo
MgCl <sub>2</sub>	-	Cloreto de magnésio
mM	-	Milimolar
NaCl	-	Cloreto de sódio
NaOAc	-	Acetato de sódio
pb	-	Pares de bases
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
pRS	-	Proteína rica em serina
PSA	-	Antígeno prostático específico
RNA	-	Ácido ribonucléico
RNAm	-	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA <sub>h</sub>	-	Ácido ribonucléico nuclear heterogêneo
RNA <sub>p</sub>	-	Ácido ribonucléico nuclear pequeno
Rnase	-	Ribonuclease
RNP <sub>h</sub>	-	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea

RNPnp	-	Ribonucleoproteína nuclear pequena
Rpm	-	Rotações por minuto
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	-	Reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa
SPAM	-	Sperm adhesion molecule
TE	-	Tris EDTA
TNM	-	Tumor Nodes Metastasis
Tris EDTA	-	Ácido acético diaminoetileno
Tris	-	Trishidroximetilaminometano
TrisCl	-	Tris hidrocloreídrico
U/mL	-	Unidades por mililitros
Wt	-	<i>Wild type</i>



## *Lista de Figuras*

<b>Figura 1.</b>	Unidade estrutural dos glicosaminoglicanos.....	8
<b>Figura 2.</b>	Demonstração esquemática das unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) e Àcido $\beta$ -glucourônico (GlcA) que compõem a molécula de HA.....	13
<b>Figura 3.</b>	(A) Esquema de distribuição dos genes das hialuronidases no genoma. (B) Genes e seus produtos protéicos.....	15
<b>Figura 4.</b>	Estrutura genômica dos genes das hialuronidases 1, 2 e 3.....	17
<b>Figura 5.</b>	Representação do processo de retirada do intron pelo spliceossomo .....	20
<b>Figura 6.</b>	Tipos de <i>Splicings</i> Alternativos .....	21
<b>Figura 7.</b>	Esquema de representação das variantes da HYAL 1 originadas por <i>splicing</i> . .....	22
<b>Figura 8.</b>	Esquema de representação das variantes da HYAL 3 originadas por <i>splicing</i> . .....	25
<b>Figura 9.</b>	Padronização dos primers para HYAL em LNCaP.....	33
<b>Figura 10.</b>	Verificação da qualidade do RNA total em gel de agarose 1%.....	35
<b>Figura 11.</b>	(A) Perfil de expressão de HYAL em carcinoma de próstata que não sofreu recidiva. (B) Perfil de HYAL em adenocarcinoma grau 6 de Gleason.....	43
<b>Figura 12.</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência <i>versus</i> tempo de seguimento em meses em pacientes com Câncer de Próstata em relação a expressão de HYAL1-v3.....	49
<b>Figura 13.</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência <i>versus</i> tempo de seguimento em meses em pacientes com Câncer de Próstata em relação a expressão de HYAL3-v1.....	50
<b>Figura 14.</b>	Curva de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência <i>versus</i> tempo de seguimento em meses em pacientes com Câncer de Próstata em relação a expressão de HYAL3-v2.....	50

## *Lista de Tabelas*

<b>Tabela 1-</b> Características estruturais dos Glicosaminoglicanos .....	9
<b>Tabela 2-</b> Seqüência de primers para os genes das HYAL 1, 2 e 3 e seus produtos .....	39
<b>Tabela 3-</b> Frequência de expressão das HYAL nos 66 espécimes estudados .....	46
<b>Tabela 4-</b> Características dos 55 pacientes com Câncer de Próstata em relação a recidiva bioquímica.....	47
<b>Tabela 5-</b> Expressão das HYAL nos 55 pacientes com Câncer de Próstata em relação a recidiva Bioquímica .....	48
<b>Tabela 6-</b> Características dos 55 pacientes em relação ao Escore de Gleason .....	51
<b>Tabela 7-</b> Expressão das HYAL de acordo com escore de Gleason .....	52

## Resumo

Sá VK. *Identificação do perfil de expressão dos splicings alternativos das hialuronidases em adenocarcinoma de próstata* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 78p.

Ácido Hialurônico (HA) é um componente da matriz extracelular, responsável pela hidratação e manutenção do equilíbrio osmótico tecidual. Concentrações de HA estão elevadas em vários tipos de cânceres, incluindo próstata. Hialuronidases (HAases), são uma família de enzimas relacionadas com a propagação de infecções bacterianas, toxinas de venenos e progressão tumoral. A quebra do HA em pequenos fragmentos (3-25 dissacarídeos) promovidos pela ação das HAases tipo Hyal1, Hyal2 e Hyal3, está relacionada à promoção do câncer através da indução da angiogênese e estímulo a proliferação através de ativação da via tirosina quinase. Algumas isoformas de HAases, descritas como produto de splicing alternativo, possuem atividade enzimática diversificada. A heterogeneidade de expressão das HAases foi identificada em alguns tipos de câncer e pode ser correlacionada com o comportamento diferenciado dos tumores. Para este trabalho estudamos amostras de 55 pacientes submetidos a prostatectomia radical por carcinoma de próstata (CP). A média de idade foi 66 anos e o tempo médio de seguimento 73,7 meses. Os pacientes foram divididos em dois grupos para análise dos resultados: 1- Escore de Gleason (EG)  $\geq 7$  (30) e EG  $\leq 6$  (25). 2- Comportamento tumoral (recidiva-19, e não recidiva-36), considerando o nível sérico de Antígeno Específico da Próstata (PSA) 0,2 ng/mL. O grupo controle foi representado por 11 pacientes com hiperplasia prostática benigna, submetidos à ressecção retropúbica. As HYAL foram identificadas por PCR, com uso de primers específicos para as variantes 1, 2, 3, 4 e 5 e wt da HYAL1, wt da HYAL2, e wt e variantes 1, 2 e 3 da HYAL3. As HYAL mais frequentemente expressas pelo CP foram HYAL2-wt (65,4%), HYAL1-v1 (63,3%) e HYAL3-wt (47,2%). Em tecidos prostáticos benignos, a HYAL3-v1 foi expressa em 90,9% dos casos, estando presente em 36% dos tumores com EG baixo, e não expressa em tumores com EG alto ( $p < 0,001$ ). Nos tumores sem recidiva HYAL1-v3 foi expressa em 30,5% dos casos versus 5,2% em casos que recorreram ( $p = 0,041$ ). HYAL3 v2, foi expressa por 33,3% dos tumores que não recorreram e não expressa em tumores que recorreram ( $p = 0,002$ ). Concluímos que a expressão de HYAL1-v3, HYAL3-v1 e HYAL3-v2 está relacionada a tumores mais diferenciados e com menores taxas de recidiva, podendo ser utilizadas como marcadores na prática clínica identificando candidatos a terapias mais conservadoras.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata 2.Hialuronoglucosaminidase 3.Ácido hialurônico 4.Processamento alternativo.

## Summary

Sá VK. *Identification of the expression profile of alternative hyaluronidases splicing forms in prostate adenocarcinoma* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 78p.

Hyaluronic acid (HA) is a component of the extracellular matrix that hydrates and maintains the osmotic balance of tissues. HA concentration is elevated in several cancers including prostate. Hyaluronidases (HAases) are a family of enzymes related to the spread of bacterial infections, toxins of venoms and probably cancer progression. Small fragments of HA are generated by HAase Hyal1, Hyal2 and Hyal3, stimulating endothelial proliferation and activating mitogen-activated protein kinase pathway. Several isoforms of HAases have been described as a product of alternative splicing, and are responsible for differences in the enzyme activity. The heterogeneity of HAases expression has been identified in tumors and could be related to the differences in their biological behavior. Fifty-five patients submitted to radical prostatectomy for prostate cancer (PC) were the subject of this study. The mean age was 66 years old and the mean follow-up was 73,7 months. Patients were divided into two groups for the analyses: 1- High Gleason score (GE)  $\geq 7$  (30) and low Gleason score  $\leq 6$  (25). 2- Tumor behavior; recurrence – 19 and nonrecurrence –36. Biochemical recurrence was considered when PSA was higher than 0.2 ng/mL. The control was represented by 11 patients submitted to retropubic prostate resection for benign prostatic hyperplasia. The alternative splicing forms of HYAL were identified by PCR, and the primer sequences identified variants 1, 2, 3, 4, 5 e wt of HYAL1, wt of HYAL2, wt and variants 1, 2 and 3 of HYAL3. The HYAL more frequently expressed by PC was HYAL2-wt (65.4%), HYAL1-v1 (63.3%) and HYAL3-wt (47.2%). In benign prostate tissue the main expressed HAase was HYAL3-v1 in 90.9%, being present in 36% of low Gleason score tumors and not expressed by tumors with high Gleason score ( $p < 0.001$ ). For tumors that not recurred there was expression of HYAL1-v3 in 30.5% of the cases vs. 5.2% in cases that recurred ( $p = 0.041$ ). The same difference was noted regarding the expression of HYAL3-v2, that was expressed by 33.3% of tumors that not recurred and not expressed by tumors that recurred ( $p = 0.002$ ). We conclude that there is a profile of HAase related to low Gleason score and non-recurrent PC that is characterized by expression of HYAL1-v3, HYAL3-v1 and HYAL3-v2 that could be used in clinical practice to choose a better treatment.

Descriptors: 1.Prostate neoplasms 2.Hyaluronoglucosaminidase 3.Hyaluronan 4.Alternative splicing.

# 1

## Introdução

---

## 1.1 Generalidades

O câncer de próstata (CP) é uma das principais causas de morte no Brasil, nos Estados Unidos e Europa Ocidental, representando a segunda causa de óbitos por câncer em homens, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão (Nelson et al., 2003).

A incidência do CP varia entre os diferentes grupos étnicos. Nos Estados Unidos, é maior entre os afro-americanos (250/100.000). Na Europa, a Escandinávia possui índices de mortalidade maiores em relação aos países localizados ao Sul do continente. Nações asiáticas têm os menores índices de incidência e mortalidade por câncer de próstata no mundo (Nelson et al., 2003).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer estima a incidência de 49.530 casos novos para 2008 (INCA, 2008), correspondendo a um risco estimado de 52,43/100.000 homens. Considerando as diferentes regiões do país, o CP apresenta risco estimado de 69/100.000 na região Sul, 63/100.000 na região Sudeste, 46/100.000 na região Centro-Oeste, 34/100.000 na região Nordeste e 20/100.000 na região Norte.

O CP atinge principalmente os homens acima dos 50 anos de idade. O aumento da sua incidência na população é também decorrente do aumento da expectativa de vida do brasileiro verificada ao longo deste século, cuja tendência é ultrapassar os 70 anos no ano 2020 (INCA, 2005).

História familiar de pai ou irmão com CP antes dos 60 anos de idade é outro marcador importante, podendo aumentar o risco em 3 a 10 vezes em relação à população geral (Bratt, 2002).

Enquanto a incidência do CP está ligada às características demográficas da população, a mortalidade alta é causada pelo retardo do diagnóstico, que favorece a ocorrência de tumores com alta capacidade biológica de invasão local e de disseminação para outros órgãos. Tais tumores são incuráveis em fase metastática (Stamey et al., 1999; Coldman et al., 2003).

A maioria dos pacientes com diagnóstico de CP possui a doença confinada ao órgão.

O toque retal (TR) e a dosagem do antígeno específico da próstata (PSA) são exames de primeira linha para se estimar o risco de doença em um indivíduo. O TR tem alta especificidade (94%) e baixa sensibilidade (50%), assim como baixo valor preditivo positivo (Perrer et al., 1996; Greenlee et al., 2001; Grubb et al., 2007).

O PSA é encontrado normalmente em baixos níveis no sangue, menor que 2,5 ng/ml (Catalona et al., 2000). Dentre as principais patologias prostáticas que resultam em elevação do PSA, citamos a hiperplasia prostática benigna (HPB), a prostatite e o CP, demonstrando que os níveis sanguíneos elevados do PSA não é condição específica do CP.

Devido ao rastreamento com PSA, houve um aumento da proporção de homens em que foram detectados CP localizados, assegurando tratamento curativo (Cooperberg et al., 2005). Atualmente, três opções de tratamento são consideradas curativas: cirurgia, radioterapia externa e radioterapia intersticial.

Acredita-se que em alguns casos, com a identificação de fatores que demonstrem baixa agressividade da neoplasia e o seu curso indolente, opta-se apenas por observação vigilante sem tratamento (Klotz , Nam, 2006).

O diagnóstico definitivo de CP é dado pela biópsia de próstata, sendo o mais importante fator prognóstico a graduação histológica de Gleason.

A Graduação Histológica de Gleason (Gleason et al., 1977; Gleason et al., 1992), revisto por Epstein et al, 2006, é o fator prognóstico isolado mais poderoso e mais frequentemente utilizado para graduação de CP; leva-se em consideração a heterogeneidade histológica do CP, valorizando-se o padrão glandular e a relação entre as glândulas e o estroma prostático. Neste sistema, os tumores são classificados em 5 padrões de acordo com a arquitetura glandular. O diagnóstico final na Escala de Gleason é dado pela soma dos padrões primário (predominante) e secundário (áreas menos representativas), de forma que as neoplasias sejam classificadas em um escore variável de 2 a 10.

Associado ao Gleason na definição do prognóstico está o estadiamento que é fundamental na escolha da terapia. O sistema TNM (do inglês, Tumor-Nodes-Metastasis), foi adotado para o CP pela American Joint Committee For Cancer Staging (AJCC) em 1975 , foi posteriormente modificado em 1992, 1997 e em 2002 e é o mais amplamente utilizado para o estadiamento da doença na atualidade (Carter , Partin, 2002) (Quadro 1). Este sistema baseia-se na extensão do tumor primário, na presença de comprometimento linfonodal e na existência ou não de metástases em órgãos à distância.



Quando utilizado isoladamente, o valor prognóstico de qualquer critério em predizer a extensão e a progressão tumoral é limitado.

Visando melhor acurácia na determinação do prognóstico no CP, pode-se recorrer ao uso de nomogramas, onde são combinados todos os fatores prognósticos conhecidos no CP. Um dos nomogramas mais empregado, e já validado internacionalmente é o de Kattan, que utiliza principalmente os níveis de PSA, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação histológica de Gleason para predizer a chance de cura quando o CP é tratado através de cirurgia, radioterapia externa ou braquiterapia (Kattan et al., 2003).

São candidatos a observação vigilante, pacientes com idade inferior a 75 anos, expectativa de vida maior que 10 anos, estadiamento tumoral T1a, T1c ou T2a, PSA < 5-8 ng/ml e Gleason  $\leq 6$  (Schröder et al., 2003).

No entanto, existem muitos fatores de erro. Um deles se refere ao grau histológico de Gleason, que caracteristicamente apresenta acurácia insatisfatória quando se compara a biópsia de próstata e a peça cirúrgica. O erro é de aproximadamente 30%, sendo o evento mais comum a subgradação (Hyoung et al., 2006). Deste modo, pode-se estar considerando um tumor indolente, com escore de Gleason  $\leq 6$ , um carcinoma na realidade Gleason  $\geq 7$ . Este é um problema universal, menor entre patologistas dedicados a uropatologia, mas que ainda representa uma grande fonte de erro. Nestes casos, a discrepância pode ser tão significativa que limita a definição do comportamento biológico do tumor e, conseqüentemente a melhor escolha terapêutica. Para tanto, se faz necessária a utilização de marcadores moleculares que possam identificar, principalmente, tumores candidatos a terapias conservadoras.

## 1.2 Conceitos gerais sobre glicosaminoglicanos e proteoglicanos

Glicosaminoglicanos são polímeros lineares de açúcares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas. Estas unidades dissacarídicas são formadas alternadamente, por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) unidas através de ligação glicosídica a um ácido urônico (D-glucourônico o L-idurônico) ou um açúcar neutro (galactose). A maioria destes compostos apresentam grupamentos sulfatados, que juntamente com os grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos conferem a esses polissacarídeos uma alta densidade aniônica (Mathews, 1975; Lindhal et al., 1994).

Os glicosaminoglicanos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, quanto ao grau de sulfatação e a posição em que são sulfatados, bem como quanto ao tipo de ligação glicosídica inter e intrassacarídica (Mathews, 1975).

Essa variedade resulta nos seguintes glicosaminoglicanos: heparina, heparam sulfato, condroitim-4-sulfato, condroitim-6-sulfato, dermatam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico. A unidade estrutural dos glicosaminoglicanos está representada na Figura 1. As diferenças entre eles estão representadas na Tabela 1.

Esses polissacarídeos, com exceção do ácido hialurônico, são sintetizados na forma de proteoglicanos, nos quais cadeias sacarídicas estão ligadas covalentemente ao “core” protéico. (Kjellén , Lindhal, 1991).

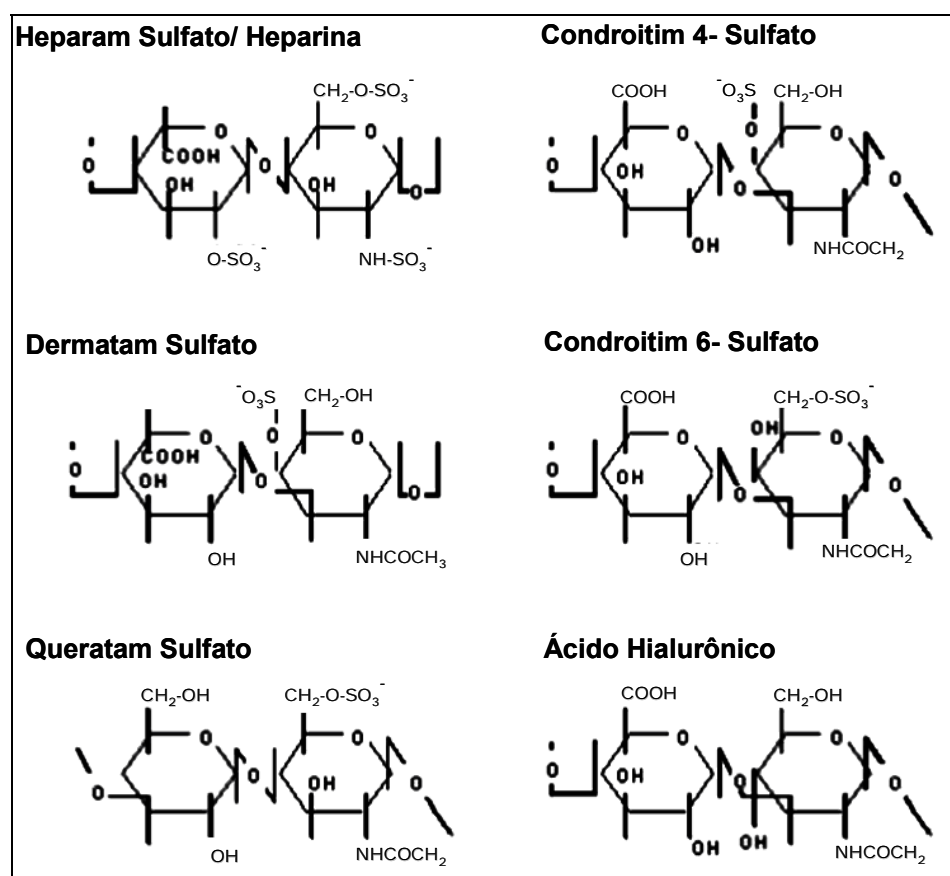
Os proteoglicanos são, portanto, compostos de alto peso molecular formados por um esqueleto protéico ao qual ligam-se, covalentemente, cadeias de glicosaminoglicanos e oligossacarídeos N- e/ou O-ligados (Thonar e Sweet, 1977; Lohmander et al., 1980; Nilsson et al., 1982).

Os proteoglicanos estão presentes na matriz extracelular, membrana basal, superfície celular como também intracelularmente em grânulos secretórios (Dietrich, 1984; Poole, 1986; Nader e Dietrich, 1989; Esko 1991; Iozzo, 1998).

A atividade biológica de cada proteoglicano depende das propriedades do seu esqueleto protéico, da estrutura química do glicosaminoglicano covalentemente ligado e sua localização. No entanto, o tipo de cadeia de glicosaminoglicanos ligada exerce uma grande importância na função biológica (Dietrich, 1984; Esko, 1991; Yanagishita e Hascall, 1992; Porcionatto, Nader e Dietrich, 1999). Os proteoglicanos são capazes de interagir com várias moléculas, o que confere a estes compostos a participação em muitos mecanismos celulares (Kjellén e Lindahl, 1991). Muitas das propriedades funcionais dos proteoglicanos dependem da interação entre o glicosaminoglicano e proteínas (Kjellén e Lindahl, 1991; Lindahl et al., 1994; Bernfield et al., 1992; 1999). Estas interações são geralmente de natureza eletrostática, podendo ocorrer outros tipos de ligação (Lindahl et al., 1994).

Os proteoglicanos atuam como organizadores de tecidos, influenciam o crescimento celular e a maturação dos tecidos especializados, têm um importante papel como filtro biológico, modulam a atividade de determinados

fatores de crescimento, regulam a fibrinólise de colágeno, afetam o crescimento e invasão tumoral. O estudo de suas funções biológicas, utilizando animais transgênicos, tem indicado que certos proteoglicanos são essenciais para a vida (Iozzo, 1998; Bernfield et al., 1992; 1999).



**Figura 1.** Unidade estrutural dos glicosaminoglicanos. A figura ilustra a unidade estrutural dos glicosaminoglicanos. A D-glucosamina é a hexosamina da heparina, heparam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico e a D-galactosamina está presente em condroitim 4 e 6-sulfatos e dermatam sulfato. O açúcar não nitrogenado é um ácido urônico (D-glicourônico e L-idurônico), exceto no queratam sulfato que apresenta D-galactose. A posição dos grupamentos sulfatados podem estar em C-2 e C-6 na hexosamina e C-2 no ácido urônico. A hexoxamina está unida ao ácido urônico por ligação  $\alpha$  em heparina e heparam sulfato e  $\beta$  nos demais compostos (Dietrich, 1989)

**Tabela 1-** Características estruturais dos Glicosaminoglicanos

<b>Glicosaminoglicano</b>	<b>Açúcares<sup>1</sup></b>	<b>Posição do sulfato</b>	<b>Ligação glicosídica</b>
Ácido Hialurônico	N-acetilglucosamina	-	$\beta$ (1→4)
	ácido glucourônico	-	$\alpha$ (1→3)
Condroitim 4-sulfato	N-acetilgalactosamina	4	$\beta$ (1→4)
	ácido glucourônico	-	$\alpha$ (1→3)
Condroitim 6-sulfato	N-acetilgalactosamina	6	$\beta$ (1→4)
	ácido glucourônico	-	$\alpha$ (1→3)
Dermatam sulfato	N-acetilgalactosamina	4	$\beta$ (1→4)
	ácido idurônico	-	$\alpha$ (1→3)
	ácido glucourônico	-	$\beta$ (1→3)
Queratam sulfato	N-acetilglucosamina	6	$\beta$ (1→3)
	Galactose	-/6	$\beta$ (1→4)
Heparam sulfato	Glucosamina	2/6	$\alpha$ (1→4)
	N-acetilglucosamina	6	$\alpha$ (1→4)
	ácido glucourônico	-	$\beta$ (1→4)
	ácido idurônico	-	$\beta$ (1→4)
Heparina	Glucosamina	2/6	$\alpha$ (1→4)
	ácido glucourônico	-	$\beta$ (1→4)
	ácido idurônico	2	$\beta$ (1→4)

1- Todos os açúcares estão na configuração D, exceto o ácido idurônico que está na configuração L.

### 1.3 Ácido Hialurônico

Estruturalmente, o ácido hialurônico (HA) é o mais simples dos glicosaminoglicanos. É um polímero linear longo de dissacarídeos repetidos, constituído por unidades alternadas de ácido  $\beta$ -D-N-acetilglucosamina, unidos por ligações glicosídicas do tipo (1-3) e (1-4), respectivamente (Laurent et al., 1970; Laurent e Fraser, 1992; Scott e Heatley, 2002) (Figura 2). O número de repetições do dissacarídeo pode atingir 10.000 ou mais, chegando a massa molecular do composto a 4.000 kDa (cada dissacarídeo pesa aproximadamente 400 daltons) e medindo aproximadamente 2  $\mu$ m, dependendo do tecido de origem (Laurent, Fraser, 1992; Lee, Spicer, 2000).

O HA apresenta uma estrutura helicoidal, mantida por pontes de hidrogênio e interações com o solvente, possuindo, portanto uma forma não-polar, hidrofóbica e uma forma polar hidrofílica que fazem com que assumam uma forma expandida em soluções fisiológicas; está presente em todos os vertebrados, bem como na cápsula de algumas bactérias estreptocócicas, que usam de seus hospedeiros para sintetizá-lo.

É o único glicosaminoglicano que não apresenta sulfatação e também não se encontra associado a um esqueleto protéico, formando proteoglicano.

Nos tecidos, o HA apresenta-se como uma estrutura espiral polidispersa de alto peso molecular e interage através de ligações não covalentes com regiões específicas do esqueleto protéico de proteoglicanos de condroitim sulfato e queratam sulfato (agrecam), formando agregados presentes na cartilagem, que são estabilizados por uma proteína

denominada proteína de ligação. Este mesmo tipo de interação ocorre entre o HA e proteoglicanos de condroitim sulfato e dermatan sulfato (versicam), presentes na matriz de fibroblastos (Krusius, Gehlsen e Ruoslahti, 1987; Zimmerman e Ruoslahti, 1989).

O HA é um dos principais constituintes da matriz extracelular (MEC) dos tecidos diferenciados, sendo, portanto um componente essencial de tecidos maduros (Fraser et al., 1997), como por exemplo, humor vítreo, fluido da articulação sinovial, e cartilagem hialina.

O metabolismo do HA é muito dinâmico, sendo que em algumas células, como condrócitos e queratinócitos, há síntese e catabolização ao mesmo tempo. A síntese e o catabolismo são balanceados, mantendo, portanto a concentração no tecido. Estudos metabólicos mostraram que a vida média na cartilagem está ao redor de 3 semanas e, surpreendentemente, na epiderme a vida média é inferior a 1 dia. Algumas células, predominantemente, sintetizam mais do que catabolizam e uma grande porção escapa do tecido para ser capturada em receptores de células reticulo-endoteliais nos linfonodos e no fígado para subsequente catabolismo nos lisossomos. Apenas 10% do HA do tecido sinovial atinge o sistema vascular.

Estima-se que cerca de 10 a 100 mg/dia de HA entre na circulação de um homem adulto.

A concentração sérica de HA normalmente encontrado é menor que 0,1 mg/l, sendo a média de 30 a 40 µg/litro (Engström-Laurent et al., 1985), refletindo um metabolismo extremamente rápido. A vida média do HA no

sangue é muito curta, apenas alguns minutos. Estima-se que quase um terço do total do HA no corpo humano seja metabolizado e repostado em média em um dia (Fraser et al., 1997).

Muitas funções foram atribuídas ao HA, como estabilizador de matriz extracelular, lubrificação articular, homeostasia aquosa, regulação da distribuição das proteínas plasmáticas, barreira contra disseminação de infecções e macromoléculas, formação de grandes agregados quando unido aos agregans, bem como a regulação da atividade celular pela interação com proteínas receptoras da superfície celular (Fraser et al., 1997).

Interação do HA com outras proteínas de matriz e com receptores na superfície celular regula muitos aspectos do comportamento das células, tais como a migração, a adesão célula-célula e a diferenciação celular (Knudson, Knudson, 2004; Knudson et al., 2002).

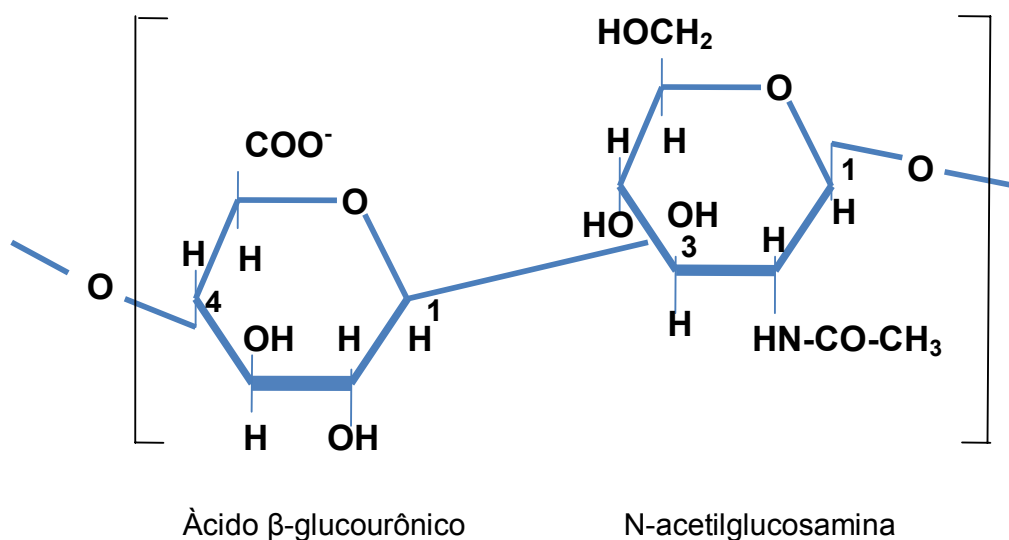
Segundo Toole (1990), proteínas que se ligam ao HA são denominadas como hialaderinas.

A primeira etapa na degradação do HA ocorre sob a ação das hialuronidasas (HAases), levando à formação de oligossacarídeos. As HAases foram detectadas e caracterizadas em diversos tecidos e fluidos animais (Frost et al., 1996; Stern, 2003) estando presente normalmente no interior dos lisossomos (Vaes, 1967). Os oligossacarídeos são então, clivados a partir do terminal não redutor da molécula, por ação da  $\beta$ -glucoridase e  $\beta$ -N-acetilhexosaminase, resultando em ácido D-glucourônico e N-acetil-D glucosamina, respectivamente. As HAases também participam do catabolismo de condroitim sulfatos (Roden et al., 1989).



Existe uma aparente contrariedade na literatura quanto a associação do HA a neoplasias. Alguns estudos defendem que o HA aumentado na MEC está envolvido na promoção da migração das células tumorais pela suas características hidrofílicas, auxiliando ainda na perda de inibição por contato, comportamento típico dos tecidos normais, promovendo o crescimento tumoral e facilitando a ocorrência de metástases (Tammi et al., 2002; Delpech et al., 1997; Turley et al., 2002). Outros autores porém defendem que a migração das células tumorais na matriz celular rica em HA ocorre após a sua degradação em fragmentos de 2-25 dissacarídeos e é mediada por receptores de superfície celular específicos, CD44 e RHAMM (receptor de ácido hialurônico mediador de motilidade) (Ichikawa et al., 1999; Herrlich et al., 2000). Por outro lado, acredita-se que o HA intacto possa atuar como uma barreira para neovascularização, conseqüentemente inibindo o crescimento e progressão tumoral (Rahmnaiam, 2002).

## Ácido Hialurônico



**Figura 2.** Demonstração esquemática das unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) e Ácido β-glucourônico (GlcA) que compõem a molécula de HA.

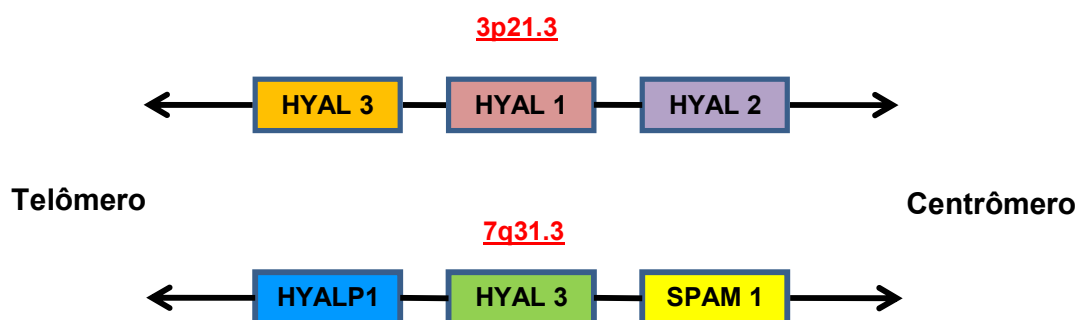
## 1.4 Hialuronidases

As HAases são enzimas que degradam o HA (Roden et al.,1989). Existem três tipos de HAases, originalmente classificadas de acordo com a análise bioquímica das enzimas e seus produtos de reação.

1. Hialuronidases de mamíferos – são endo-beta-N-acetilglicosaminases com tetrassacarídeos e hexassacarídeos como principal produto final. Possuem atividade de hidrólise e transglicosidase e podem degradar HA e condroitim sulfato (CS), especificamente C4-S and C6-S, bem como Dermatan Sulfato (DS).
2. Hialuronidases bacterianas - degrada HA, CS e DS. Também são endo-beta-N-acetilglicosaminases que operam pela reação de beta eliminação que produz primeiramente dissacarídeos como produtos finais.
3. Hialuronidases de crustáceos e de parasitas são endo-beta-glucoronidases que geram tetrassacarídeos e hexassacarídeos como produtos finais.

As HAases humanas são codificadas por uma família composta por seis genes agrupados em dois cromossomos, onde: HYAL1, HYAL2 e HYAL3 estão localizados no cromossomo 3p21.3 e, PH20, HYAL4 e HYALP1 no cromossomo 7q31.3 (Figura 3). Com exceção de HYAL4 e HYALP1, as demais HAases degradam HA (Stern, 2003; Csóka et al., 1997).

### A. Orientação Cromossômica dos Genes das Hialuronidasas



### B. Genes das Hialuronidasas e seus produtos

	<u>Gene</u>	<u>Proteína</u>
<u>3p21.3</u>	HYAL 1	Hyal-1
	HYAL 2	Hyal-2
	HYAL 3	Hyal-3
<u>7q31.</u>	HYAL 4	Hyal-4
	SPAM 1	PH-20
	HYALP 1	None

**Figura 3.** (A) Esquema de distribuição dos genes das hialuronidasas no genoma. HYAL 3, HYAL 1 e HYAL 2 são codificados no locus 3p21.3. HYALP 1, HYAL 4 e SPAM 1, são codificados no locus 7q31.3. (B) Genes e seus produtos protéicos. HYAL 3, HYAL 1 e HYAL 2, originam proteínas que degradam HA. HYALP 1 é um pseudogene que não é traduzido em proteína. HYAL 4, origina a proteína hyal 4, responsável pela degradação de condroitim sulfato. SPAM 1 é traduzido em PH-20, proteína responsável pela degradação do HA presente na zona pelúcida do oócito.

A HAase tipo Hyal 1 foi originalmente purificada de urina e plasma humano (Frost et al., 1997; Csoka et al., 1997). Entretanto, a Hyal 1 é a principal HAase identificada em tumores, expressa em tecidos tumorais de bexiga e próstata (Lokeshwar et al., 2001; Ekici et al., 2004; Pham et al., 1997). O pH ideal para atividade desta enzima é de 4.5 (Lokeshwar et al., 2001).

A perda de sua função resulta em uma desordem chamada mucopolissacaridose IX (Triggs-Raine et al., 1999).

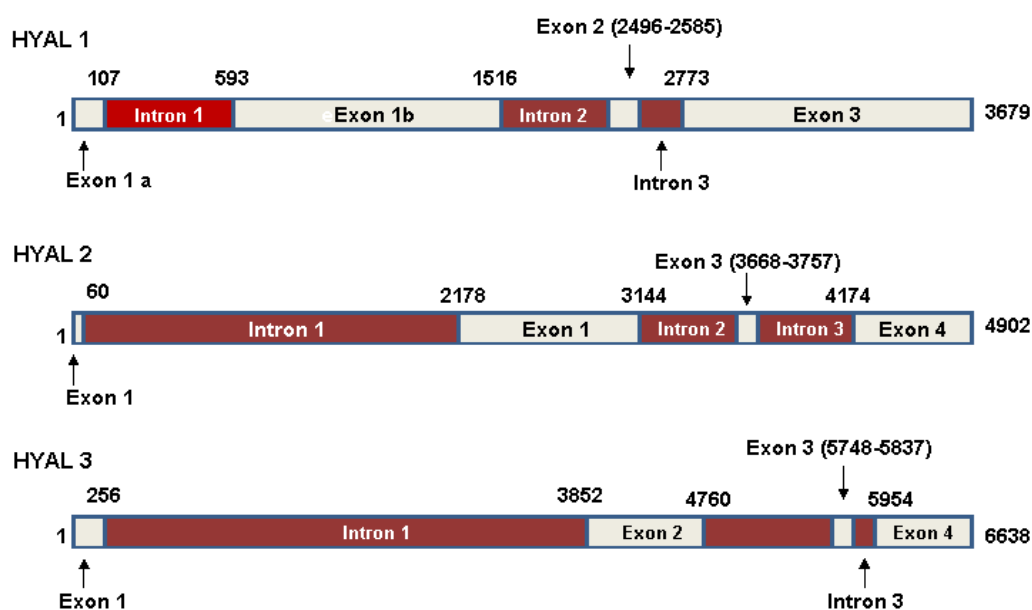
A Hyal2 é codificada em um sítio cromossômico adjacente. É uma HAase lisossômica que participa da primeira etapa de degradação do HA, dando origem a fragmentos de 50 kDa.

A Hyal 3 ainda é muito pouco conhecida no que diz respeito as suas atividades nos tecidos. Já foi identificada em testículo de mamíferos e em medula óssea (Csóka et al., 1999).

Quanto a estrutura genômica dos genes das hialuronidases, o gene HYAL1 possui três exons separados por dois introns, HYAL 2 é constituído por 4 exons e 3 introns, onde o primeiro exon é subdividido pelo intron 1 e, HYAL3 constituído por 4 exons separados por três introns (NT\_006014.7/HS3\_6171, homo sapiens, cromossomo 3) (Figura 4).

Os três genes dão origem a variantes produzidas por um processo denominado *splicing* alternativo, que será explanado no próximo item.

## Estrutura Genômica dos Genes das Hialuronidasases



**Figura 4.** Estrutura genômica dos genes das hialuronidasases 1, 2 e 3. O gene HYAL 1 possui 3679 pb e é composto por 3 exons e 3 introns. HYAL 2 possui 4902 pb e é constituído por 4 exons e 3 introns. O primeiro exon é subdividido pelo intron 1. HYAL 3 possui 4 exons e 3 introns, compondo um DNA de 6638 pb.

### 1.5 *Splicing* Alternativo

Nas células, a molécula de RNA mensageiro (RNAm), recém transcrita a partir do DNA, é denominada RNA primário ou precursor. Esses RNA precursores de RNAm são chamados de RNA nuclear heterogêneo (RNAnh). As RNAnh são moléculas grandes e instáveis que se encontram associadas a proteínas, as ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (RNPnh), que por sua vez fazem parte da matriz nuclear. O processamento

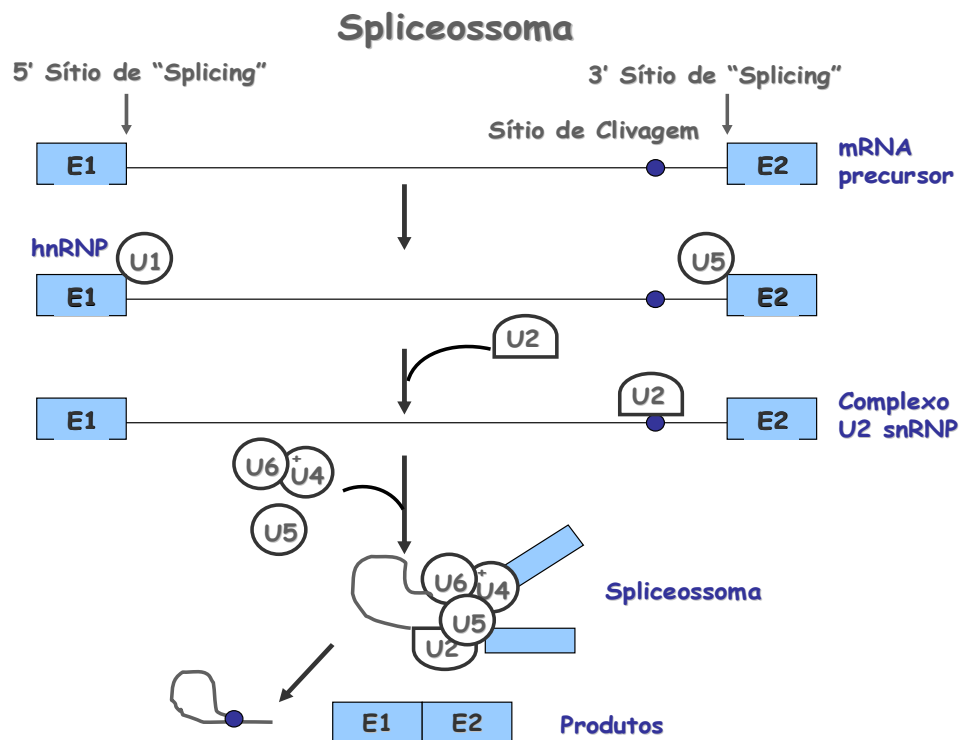
desses RNAnh envolve modificações que acabam por aumentar a estabilidade do RNAm e transformá-lo em RNAm maduro. Dentre essas modificações podemos citar a adição de quepe (capping-CAP) 7-metil guanosina (7mG) na extremidade 5' do RNAnh. Esse quepe tem um papel importante na iniciação da síntese protéica e também na proteção de degradação do RNA recém transcrito. Esta mudança ocorre em todos os RNAm eucarióticos presentes no citoplasma. Outro processamento é a adição da cauda poli-A (poliadenilação) na extremidade 3' do RNAnh. Um aspecto comum que ocorre em eucariotos (exceto levedura) é a presença da seqüência conservada AAUAAA, 11 a 30 nucleotídeos antes do sítio de poliadenilação, denominada seqüência sinal para poliadenilação. A cauda poli-A parece ter várias funções, entre elas a de auxiliar no transporte do RNAm maduro do núcleo para o citoplasma. Acredita-se também que ela afeta a estabilidade de pelo menos alguns RNAm no citoplasma e ainda pode servir como um sinal de reconhecimento para o ribossomo (Clark, 2005). Há um grupo de RNAm em células de mamíferos que é transportado ao citoplasma e não possui cauda poli-A, são os RNAm das histonas, proteínas que participam do empacotamento do DNA. Muitos organismos vivos, na maioria mamíferos, possuem o nitrogênio 6 dos resíduos de adenina metilado, sendo que essa metilação ocorre apenas nos exons antes da retirada dos introns.

O RNAnh sofre frequentemente outro processamento denominado *splicing*, que consiste na retirada e digestão de segmentos denominados introns (seqüências não codificadoras), e a junção e permanência de

segmentos funcionais, os exons (seqüências codificadoras), que vão constituir a molécula de RNAm maduro (Watson et al, 2004).

O *splicing* é um processo muito complexo e preciso, pois a molécula inicialmente transcrita deve ser cortada em locais exatos e as partes funcionais (exons) ligadas também de maneira exata. A retirada de um intron da molécula de RNAnh ocorre após duas reações de transesterificação. Esse processo é mediado por estruturas complexas denominadas spliceossomos que são constituídos pela associação de pequenas ribonucleoproteínas (RNPnp) e outras proteínas como as ricas em serina (pRS) (Watson et al, 2004). As RNPnp são formadas por 6 a 10 proteínas associadas a pequenas moléculas de RNA nuclear (RNAnp). Há seis tipos de RNAnp: U1, U2, U3, U4, U5 e U6. As U1, U2 e U5 formam separadamente o core de uma determinada RNPnp, enquanto que a U4 e U6 fazem parte de uma única RNPnp (Figura 5). O spliceossomo começa a ser montado assim que o intron é transcrito para que o *splicing* ocorra. Essa associação pode ser auxiliada pelo pareamento de bases que ocorre entre as seqüências conservadas do intron e os RNAnp (Reed et al., 2000). A formação do spliceossomo está associada a hidrólise do ATP, embora esta estrutura seja montada ainda durante a síntese do RNA, e, geralmente o intron não é retirado antes do término da transcrição. O spliceossomo impede que o exon 5' afaste-se do exon 3' após a primeira clivagem. Por ser uma estrutura grande e estável, o spliceossomo não atravessa os poros nucleares, e talvez por isso os RNAm não passem ao citoplasma antes de serem processados (Zhou et al., 2002). Após estas transformações o RNAm

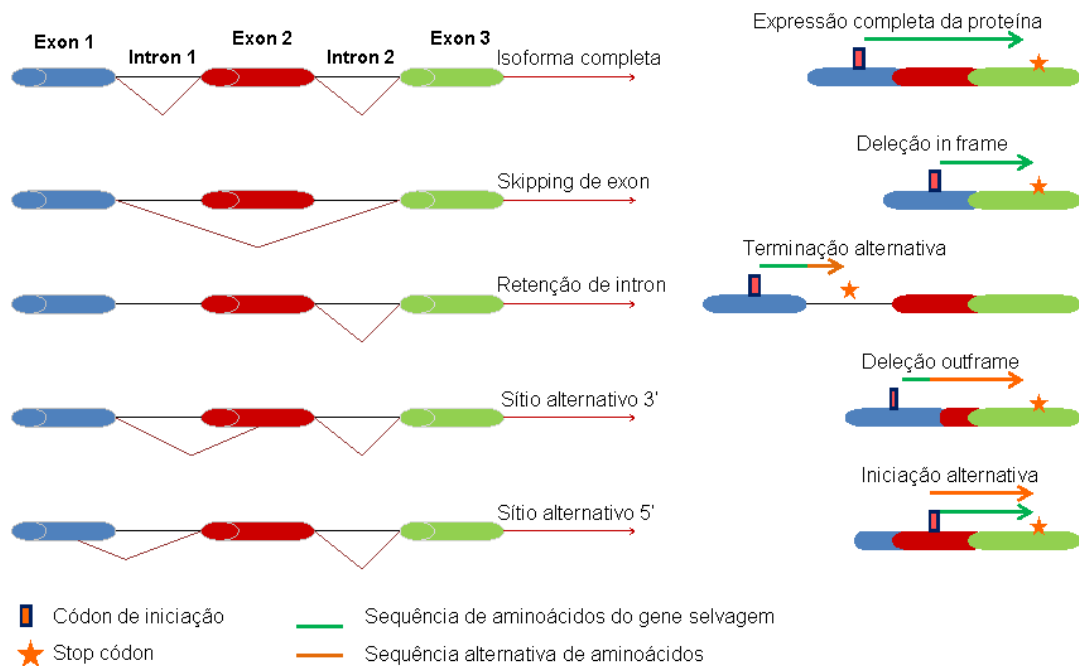
maduro é transportado para o citoplasma, onde ocorre a tradução das proteínas através dos ribossomos, RNA transportadores e RNA polimerases. O RNAm pode sofrer um processamento diferenciado e ou alternativo, assim um mesmo transcrito primário pode ser processado de diferentes maneiras. Deste modo um mesmo RNAm pode gerar RNAm maduros de tamanhos diferentes e conseqüentemente proteínas com funções fisiológicas diferentes (Graveley et al., 2001), (Figura 6).



**Figura 5.** Representação do processo de retirada do intron pelo spliceossoma onde U1, U2, U4, U5 e U6 são diferentes ribonucleoproteínas que constituem o complexo. A primeira linha mostra os sítios de *splicing* 5' e 3' do intron e o sítio de clivagem. A U1 liga-se à região 5' do intron e U5 se liga provavelmente na região 3' do intron. A seguir, há a ligação da U2 no sítio de clivagem e U4+U6 se unem ao complexo formando o spliceossoma. Após a primeira clivagem entre o primeiro exon e a região 5' do intron ocorre a segunda clivagem. Os exons são unidos e o intron liberado na forma de laço.



## Tipos de *Splicings* Alternativos

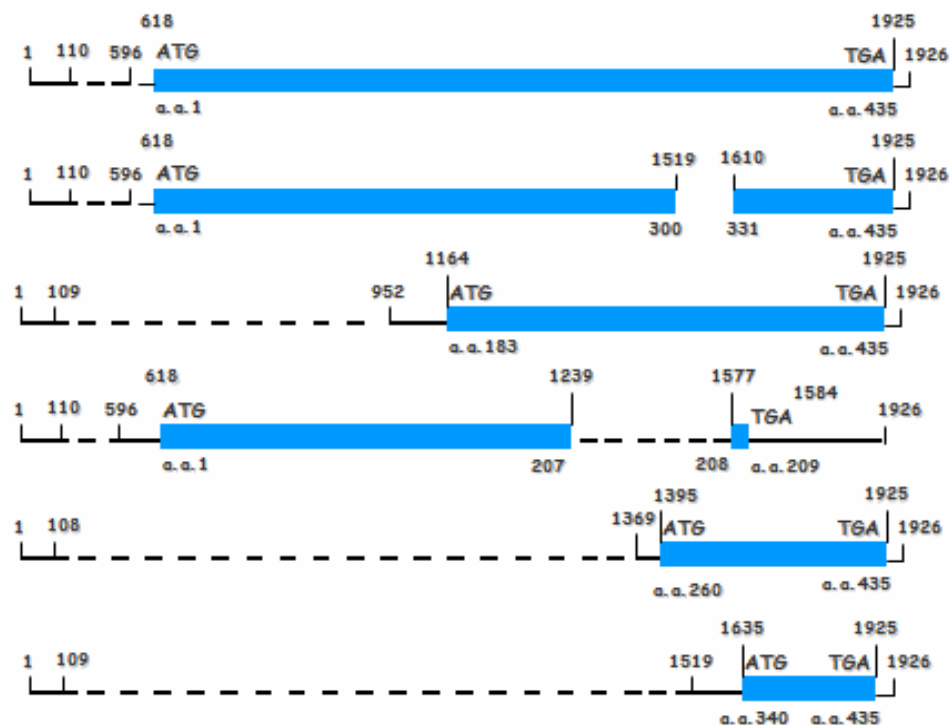


**Figura 6.** No topo da figura é demonstrado um transcrito primário de RNAm constituído por 3 exons. O primeiro exemplo mostra a transcrição completa do RNAm do gene selvagem. O segundo exemplo mostra o processo chamado de *skipping* onde o exon 1 é unido ao exon 3, desconsiderando o exon 2, originando um RNAm incompleto maduro. No terceiro exemplo, o intron 1 é retido completamente, permanecendo ligado ao exon 1 e ao exon 2 no RNAm maduro. O quarto exemplo mostra a união do exon 1 com uma parte do exon 2 que contém um sítio de terminação de *splicing* aberrante, também chamado de deleção out frame. Por outro lado, o primeiro exon pode conter um sítio de iniciação de *splicing* aberrante, provocando a deleção de uma parte do primeiro exon e sua ligação com os demais exons, como é demonstrado no último exemplo. Todos esses processos alternativos dão origem a proteínas com estruturas e atividades diversificadas.

## 1.6 *Splicing* alternativo das HYAL

O gene HYAL1 possui cinco variantes originadas por *splicing*: HYAL1-v1, HYAL1-v2, HYAL1-v3, HYAL1-v4 e HYAL1-v5, e o transcrito completo HYAL1-wt. A proteína Hyal1-wt possui 435 aminoácidos (aa), as isoformas possuem alterações em suas seqüências: Hyal 1-v1: deleção de 30 aminoácidos (aa) (301-330 aa). Hyal1-v2: deleção de 182 aa (1-182 aa), Hyal1-v3: deleção de 226 aa (210-435 aa), Hyal1-v4: deleção de 259 aa (1-259 aa) e Hyal1-v5: deleção de 339 aa (1-339 aa), (Figura 7).

### HYAL 1 e Variantes



**Figura 7.** Esquema de representação das variantes da HYAL 1 originadas por *splicing*. A figura mostra as estruturas dos RNAm de HYAL1-wt e as variantes 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente. As regiões codificadoras são representadas pelas caixas azuis. Regiões não codificantes são representadas pelas linhas contínuas e as regiões que foram excisadas, estão demonstradas pelas linhas pontilhadas.

Estas variantes não são ativas devido a perda de regiões do gene responsáveis pela codificação de sítios de atividade das HAases (Lokeshwar et al., 2002). Mais especificamente, a seqüência de 30 aa que é perdida nas variantes Hyal1-v1, v3 e v5 é codificada por um único exon composto por 90 pares de bases, presente em ambos os genes HYAL1 e 3, é responsável pela composição do substrato de ligação ao sítio de clivagem do HA (Markovic-Housley et al., 2000). O sítio catalítico do HA está localizado nas pontes glicosídicas entre N-acetil-D-glucosamina e ácido D-glucurônico (Markovic-Housley et al., 2000) Como o HA é um polímero longo, constituído dessas unidades repetidas, as isoformas de Hyal1 e 3, originadas por splicing, não conseguem degradá-lo, tornando esta função restrita as Hyal selvagens. Os produtos originados pela degradação do HA em fragmentos constituídos por 2 a 25 dissacarídeos estimulam a proliferação de células endoteliais, sendo esse um processo essencial para indução de angiogênese, fundamental no processo de progressão das neoplasias (Halici et al., 2004). Digestão da matriz extracelular pela HAase tumoral, libera fatores de crescimento contidos no microambiente, alguns desses como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator básico de crescimento de fibroblasto (FGFb) são essenciais para promoção do crescimento tumoral e vascularização (Lokeshwar et al., 2000; Rahmnaiam, 2002) .

Recentemente, Chao et al., 2007, caracterizaram um novo domínio EGF-like (fator de crescimento epidérmico) presente na estrutura das HAases, que está provavelmente envolvida em interação proteína-proteína e outros processos regulatórios como crescimento e desenvolvimento tecidual.

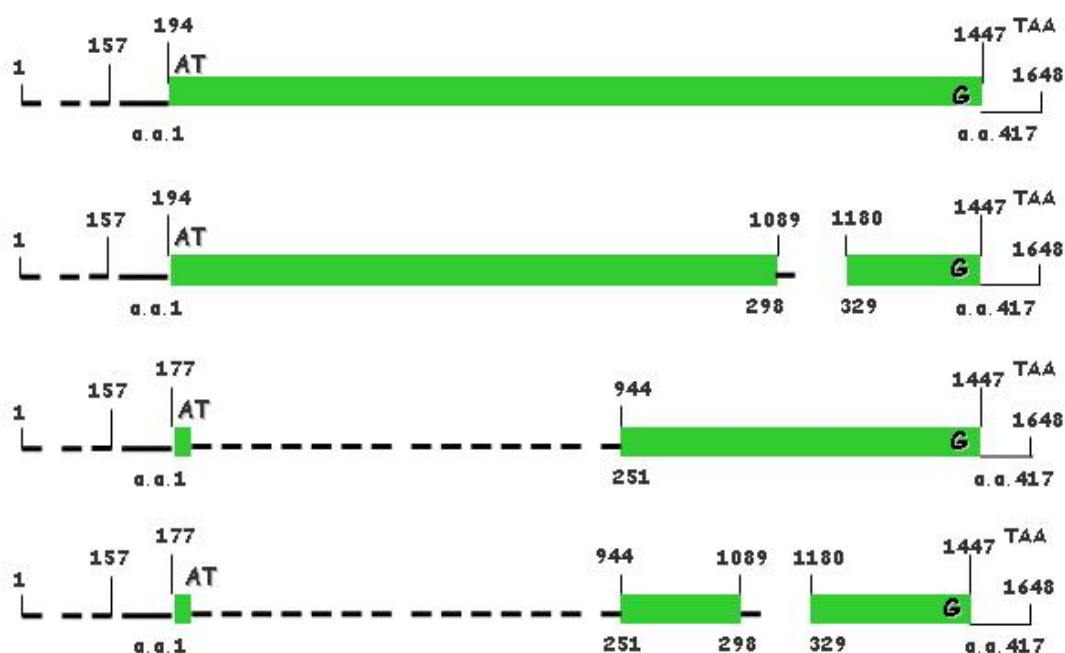
Este domínio EGF-like permanece intacto em quatro variantes, visto que o domínio catalítico está comumente apresentado nestas isoformas. As variantes Hyal1 v1, v2 e v4 retêm o domínio EGF-like, enquanto a Hyal1-v3 perde este domínio EGF-like juntamente com uma parte do domínio catalítico.

Lokeshwar et al. (2002), identificaram que há expressão das variantes de HYAL1 e 3 em tecidos normais e linhagens de carcinomas de baixo grau da bexiga, enquanto o tipo selvagem HYAL 1 é expressa por linhagens de tumores de alto grau e invasivos.

O gene HYAL2 possui duas variantes que, possivelmente, não perdem atividade devido à perda de apenas dois nucleotídeos na região não traduzida (UTR). A expressão do gene HYAL2 foi identificada em modelos animais de astrocitomas cerebrais (Novak et al., 1999). Mais recentemente foi descoberto que, a determinação da deleção de HYAL2 e FHIT (*fragile histidine triad*) em tabagistas, pode constituir um perfil marcador diagnóstico para estágio inicial de câncer de pulmão (Li et al, 2007).

O gene HYAL3 possui três variantes: HYAL3-v1, HYAL3-v2 e HYAL3-v3 que dão origem a isoformas: Hyal3-v1 com perda de 30 aa (299-328) presente na proteína da Hyal3-wt (417 aa), que é homólogo aos 30 aa da seqüência da Hyal1-wt. Hyal3-v2 com perda de 250 aa (2-250), presente no tipo selvagem da Hyal3 e Hyal3-v3 com perda de 281 aa (2-250 e 299-328) (Lokeshwar et al., 1999; Lokeshwar et al., 2002), (Figura 8).

## HYAL 3 e variantes



**Figura 8.** Esquema de representação das variantes da HYAL 3 originadas por splicing. A figura mostra as estruturas dos RNAm de HYAL3-wt e as variantes 1, 2 e 3, respectivamente. As regiões codificantes são representadas pelas caixas verdes. Regiões não codificantes são representadas pelas linhas contínuas e as regiões que foram excisadas, estão demonstradas pelas linhas pontilhadas.

Através dos achados da literatura em que o padrão de expressão das HYAL apresenta-se diferenciado dentre os tipos de tumores, é possível que as variantes originadas por *splicing* possam estar relacionadas com o comportamento tumoral, devido a sua incapacidade de degradar o HA auxiliando na inibição do desenvolvimento neoplásico.

Apesar de todo este conhecimento, as funções específicas dessas variantes no processo de crescimento e invasão tumoral ainda permanecem desconhecidas e a relação com os fatores prognósticos e comportamento do CP nunca foi antes estudada.

# 2

## Objetivos

---

1. Avaliar o perfil de expressão das formas alternativas de RNAm dos genes HYAL 1 e HYAL 3 e HYAL 2-wt no câncer de próstata.
2. Correlacionar os resultados de expressão das diferentes formas de HYAL, resultado de *splicing* alternativo com o grau histológico de Gleason.
3. Correlacionar os resultados de expressão das HYAL, resultado de *splicing* alternativo com a evolução do câncer de próstata.

# 3

## Métodos

---



### 3.1 Casuística

Foram objetos deste estudo 55 pacientes com CP tratados por prostatectomia radical de dezembro de 1997 a agosto de 2000 pela equipe do Prof. Dr. Miguel Srougi. A idade média foi de 66, mediana 66, variável de 48 a 83 anos. Foram primariamente divididos em quatro grupos com as seguintes características:

Histologia favorável sem recidiva – 17 pacientes

Histologia favorável com recidiva – 8 pacientes

Histologia desfavorável sem recidiva – 19 pacientes

Histologia desfavorável com recidiva – 11 pacientes

Por histologia desfavorável entenda-se Gleason  $\geq 7$ .

A recidiva foi considerada quando o PSA pós-operatório atingiu níveis superiores a 0,2 ng/ml.

O tempo médio de seguimento foi de 73,7 meses.

Como controle foi utilizado tecido de 11 pacientes portadores de hiperplasia prostática benigna que sofreram ressecção retropúbica, também pela equipe do Prof. Miguel Srougi. A idade média foi 70 anos, mediana 65 variável de 62 anos a 80 anos.

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Protocolo de Pesquisa 369/06.

## **3.2 Exame anátomo-patológico**

### **3.2.1 Exame Macroscópico**

Os espécimes cirúrgicos foram recebidos a fresco, após 15 a 30 min da sua ressecção, sendo identificada à palpação, área provável de tumor, sendo efetuado um corte de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, 3 a 4mm de espessura que foi congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado a -80°C. Após este procedimento a glândula foi fixada em formalina tamponada 10% por um período variável de 4 a 16 h. Toda a glândula foi submetida a estudo histológico seguindo recomendações previamente descritas por Bostwick e Foster, 1999. Após a pesagem e medição da glândula, foram realizados cortes transversais finos nas margens cirúrgicas referentes ao colo vesical e ápice da próstata. As vesículas seminais foram seccionadas na base e cortes longitudinais foram submetidos a exame histológico. Toda a glândula foi incluída para estudo após suas margens serem pintadas com tinta nanquim. Os lobos direito e esquerdo foram separados, sendo realizados cortes transversais seqüenciais a cada 3 mm, designados da região proximal em direção a distal.

De 8 a 10 cortes de cada lobo foram incluídos para estudo histológico. Foram dissecados linfonodos da gordura referente a ressecção da cadeia inguinal e cortes representativos de cada estrutura nodular foram incluídos para estudo.

### **3.2.2 Exame Microscópico**

Os espécimes foram submetidos a processamento habitual com desidratação em álcool e clareamento em xilol, seguido por inclusão em parafina. Cortes de 4 a 6  $\mu\text{m}$  foram corados pela Hematoxilina e Eosina e analisados em microscópio óptico.

Foram analisados os seguintes parâmetros prognósticos:

**Grau Histológico** – O grau histológico de Gleason foi utilizado para avaliação de diferenciação histológica. Foram considerados os dois padrões predominantes de Gleason, variáveis de 1 a 5, que somados resultam no escore de Gleason, variável de 2 a 10 (Epstein et al., 2006)

**Envolvimento das Margens Cirúrgicas** – Consideramos margens positivas o tumor infiltrativo nos cortes finos realizados no ápice da próstata e alo vesical, como também o tumor que foi interrompido junto a borda pintada com tinta nanquim.

**Infiltração do Tecido Extra prostático** – A invasão do tecido adiposo e do plexo vaso-nervoso periprostático foi considerado como envolvimento do tecido extraprostático e, portanto doença não órgão-confinada.

Infiltração das Vesículas Seminais – Somente a infiltração do parênquima da vesícula seminal foi considerada, não sendo considerados os tumores invasivos na região adventicial.

Metástases Linfonodais – Linfonodos inguinais com tumor foram considerados positivos, não havendo discriminação quanto à micro ou macrometástases.

Estadiamento: Foi utilizado sistema TNM 2002 de estadiamento.

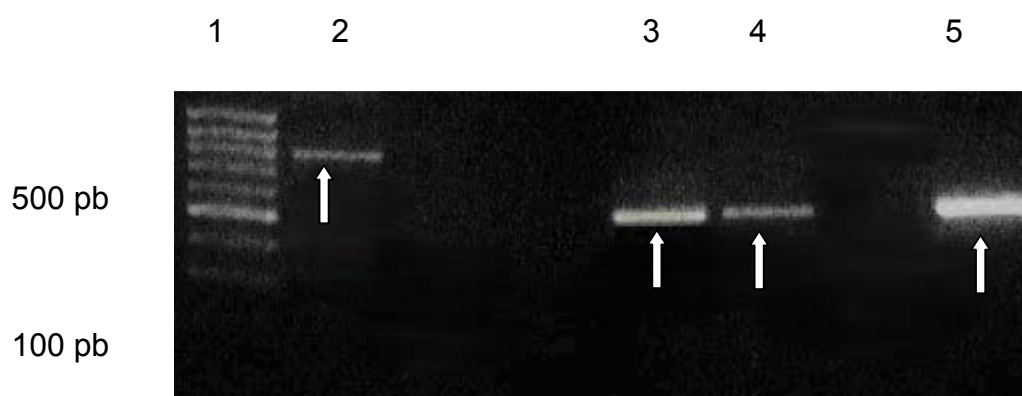
### **3.2.3 Processamento da amostra**

Dez cortes de 10 µm foram feitos em criostato, com temperatura de – 20°C, e acondicionados em microtubos de 1,5 ml, autoclavados, sendo tomados todos os cuidados para evitar a contaminação entre as amostras ou degradação do RNA. Um dos cortes foi colocado em lâmina, fixado em formalina 10%, corado pela Hematoxilina e Eosina e examinado ao microscópio para comprovação da existência de tumor com a porcentagem mínima de 75%.

### **3.2.4 Cultura de Células Tumorais**

Para a padronização da reação de PCR, foi utilizado o RNA da linhagem celular comercial LNCaP. A linhagem celular LNCaP foi obtida da American Type Culture Collection (Rockville, MD) e cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino 10%, 100mg/mL de

estreptomicina e 100U/mL de penicilina a 37°C, numa atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias até que a cultura atingisse subconfluência em monocamada (70% da área cultivável recoberta por células). Depois de atingida subconfluência as células foram desprendidas da garrafa através de tratamento com tripsina 0,25% e EDTA 0,02% e utilizadas para extração de RNA seguindo o protocolo de extração no item 3.3 e transcrição reversa segundo o protocolo descrito no item 3.4. Nesta linhagem, obtivemos a expressão dos três genes wt, onde pudemos acertar as melhores concentrações e condições de ciclagem (Figura 9).



**Figura 9.** A partir de cDNA de linhagem celular (LNCaP) foi realizada a reação de PCR para padronização dos primers para HYAL-1 wt, v2, v3, v4 e v5, HYAL-2 wt e HYAL-3 wt, v1, v2 e v3 e (controle positivo). (1) padrão de peso molecular de 100 pb, (2) HYAL1-wt (736 pb), (3) HYAL2-wt (510 pb), (4) HYAL3-wt (512 pb), e (5)  $\beta$ -actina (311pb). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2%.

### 3.3 Extração do RNA total

O RNA total foi extraído dos tecidos prostáticos, criopreservados, a - 80°C, usando o reagente Trizol (solução monofásica de isoticianato de guanidina) (Invitrogen Co., Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, a partir de aproximadamente 100mg de tecido congelado, o qual foi macerado e alocado em um microtubo juntamente com 1ml de Trizol sendo homogeneizado por inversão. Esperou-se o descongelamento da amostra e aguardou-se 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi acrescentado 0,2ml de clorofórmio (NUCLEAR, São Paulo, Brasil), homogeneizou-se por inversão aguardando 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Este procedimento foi baseado na habilidade do RNA permanecer solúvel na fase constituída por fenol e clorofórmio na presença de isoticianato de guanidina. Retirou-se o sobrenadante constituído pela fase aquosa adicionando-o a 0,6ml de álcool isopropílico (NUCLEAR, São Paulo, Brasil) em novo tubo, ficando em repouso a temperatura ambiente por 10 minutos para a fase de precipitação. E em seguida, centrifugou-se por 15 minutos a 12.000g e a 4°C, desprezou-se o sobrenadante, adicionando-se 1 ml de etanol 75% para lavagem, misturando bem e centrifugando a amostra por 5 minutos a 7.500g a 4°C descartando em seguida o sobrenadante e deixando os tubos escorrendo sobre papel absorvente até a secagem do pellet. Feito isso foi adicionada H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada tratada com DEPC (Merck, EUA) na quantidade suficiente para diluir o pellet de RNA.

A integridade e qualidade do RNA extraído foi controlada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e a concentração de absorvância foi feita em espectrofotômetro a 260nm e 280nm (Figura 10).



**Figura 10.** Verificação da qualidade do RNA total em gel de agarose 1%.

### 3.3.1 Tratamento do RNA total com DNase

O RNA total de tecido prostático foi tratado com DNase Rnase Free 1U/ $\mu$ l, com a finalidade de se evitar contaminação com qualquer tipo de DNA remanescente. A partir de 10 $\mu$ g de RNA total em um microtubo e acertado seu volume para 50 $\mu$ l com TE (10mM TrisCl, 1mM EDTA, pH8,0) pH7,4 sendo adicionado em seguida 1 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 1M, 1 $\mu$ l DTT 0,1M, 10U DNase (Promega Co., Madison, EUA) e 66U Rnasin (Promega Co., Madison, EUA) e incubando a 37°C por 30 minutos. Sendo adicionado em seguida 2 $\mu$ l proteinase K 2mg/ml e a reação foi incubada por 30 minutos a 37°C. Adicionado então 2,5 $\mu$ l de EDTA 0,5M, 12,5 $\mu$ l de acetato de sódio 3M pH5,4, 2,5 $\mu$ l de SDS 10% e 107,5 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O DEPC mais 125 $\mu$ l de fenol pH 5 e

125µl de clorofórmio, agitando a mistura em vortex por 15 segundos, a fim de retirar DNA e outras proteínas remanescentes.

A amostra foi submetida a uma centrifugação de 12.000g por 15 minutos a 4°C, depois foi recuperado o sobrenadante e transferido para outro microtubo novo ao qual foi adicionado 250µl de álcool isopropílico e NaCl para concentração final de 250mM, com a finalidade de precipitar o RNA. Este material permaneceu em freezer -20°C por 18 horas aproximadamente. Após esse período, o material foi centrifugado a 12.000g a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e em seguida foi adicionado etanol 75% para lavagem do pellet sendo então centrifugando a 12.000g a 4°C por 5 minutos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e o tubo foi invertido sobre uma toalha de papel para secagem, o pellet foi ressuspenso com 10µl de H<sub>2</sub>O DEPEC.

### **3.4 Reação em Cadeia da Polimerase da Transcriptase Reversa (RT-PCR)**

A síntese do cDNA foi feita a partir 2µg do RNA tratado com Dnase acertando o volume para 10,25µl com H<sub>2</sub>O miliQ autoclavada e adicionando 2,5µg de hexâmeros randômicos iniciadores pd(N)<sub>6</sub> (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England). A mistura dos hexâmeros randômicos e o RNA foi submetida a um aquecimento de 70°C por 10 minutos, em seguida colocada em gelo por 2 minutos e



então foi adicionado 5ul do tampão 5X da Super Script II (Invitrogen Co., Califórnia, EUA), 2,5µl de dNTPs 2,5mM. A mistura foi incubada a 42°C por 10 minutos sendo em seguida adicionado 200U da enzima Super Script II (Invitrogen Co., Califórnia, EUA), permanecendo a reação por 1 hora a 42°C, e após este período foi incubada por 15 minutos a 70°C para inativar a enzima transcriptase reversa. O cDNA foi mantido a – 20°C até o início da reação de PCR.

### 3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) qualitativa

A partir de ciclos determinados que estão descritos abaixo foi realizada a mesma reação de PCR para todos os pares de primers descritos na Tabela 1:

Ciclagem

94°C 5 minutos

94° C 30 segundos  
60° C 45 segundos  
72°C 45 segundos

} 40x

72°C 7 minutos

4.0°C ∞

Todas as reações de PCR foram feitas seguindo o protocolo descrito abaixo.

Para o preparo de 50ul de reação para PCR, foi utilizado 1ul de cDNA, 1ul de dntps (10 mM), 1,5 MgCl<sub>2</sub> (50mM), 5 ul tampão (10x), 1ul primer senso (10mM), 1ul primer reverso (10mM), 0,25 ul Taq polimerase (5U/μl) e 39,25 H<sub>2</sub>O estéril.

Os produtos foram aplicados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio, fotografados e digitalizados no Image Máster (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England) para análise de densidade óptica (DO).

Os primers senso e antisensos para HYAL1 wt,v1,v2,v3,v4 e v5; HYAL2 wt, HYAL3 wt, v1, v2 e v3 e β-actina foram desenhados no programa primer design e estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2-** Sequência de primers para os genes das HYAL 1, 2 e 3 e seus produtos

Gene *(CG)	Primer	Tamanho do produto (pb)
HYAL 1 wt (AR 097287)	F- 5' CCACGGCCCTGACATGACAA 3' R- 5' CGCACTCTCCCCAGGCTGTG 3'	736
	F- 5' CCACGGCCCTGACATGACAA 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	896
V1 (AF 502904)	F- 5' ACCACTTTCTGCCCCTGGAA 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	121
	F- 5' CCACGGCCCTGACATGACAA 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	807
V2 (AF 502905)	F- 5' GGCCCTTCAGCCCCAAGGA 3' R- 5' CGTGAGTGCTGCCGGTAAAT 3'	139
	F- 5' GGCCCT TCAGCCCCA AGG A 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	778
V3 (AF 502906)	F- 5' CTATGGCTTCCCTGACTGCTC 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	155
	F- 5' CCACGGCCCTGACATGACAA 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	560
V4 (AF 502907)	F- 5' GGCCCT TCAGCCCCA AGG A 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	361
V5 (AF 502908)	F- 5' GGCCCT TCAGCCCCA AGG A 3' R- 5' CCGGAGCACAGGGCTTGACT 3'	211
HYAL 2 wt (HSU 09577)	F- 5' GGCACAATATGAGTTTGAGTTCGC3' R- 5' TTGAGGTACTGGCAGGTCTCCG 3'	510
HYAL 3 wt (AF 036035)	F- 5' CCGAGCTTATCAGGCAGCCTCTT 3' R- 5' CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA 3'	512
V1 (AF 502909)	F- 5' CCGAGCTTATCAGGCAGCCTCTT 3' R- 5' CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA 3'	422
V2 (AF 5029010)	F- 5' CAACGTTGTCCGACCGAGGC 3' R- 5' CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA 3'	286
V3 (AF 5029011)	F- 5' CAACGTTGTCCGACCGAGGC 3' R- 5' CCCCTAGTGCTGCACTCACACCA 3'	196

\*CG- Código de acesso ao Gene (Gene Bank)

### 3.6 Purificação de DNA

Os fragmentos amplificados foram purificados com a utilização do kit GFX gel band purificator (Amershan Bioscience, Buckinghamshire, England).

Após a eletroforese em gel de agarose 2%, as bandas correspondentes as variantes das hialuronidasases foram recortadas do gel com ajuda de uma lâmina de bisturi e adicionadas, individualmente em tubos eppendorfs previamente identificados e pesados. Em seguida, os tubos com os géis foram novamente pesados e os valores dos pesos iniciais foram subtraídos.

Para cada 10 mg de gel, foi adicionados 10  $\mu$ L do *capture buffer* (máximo de 300  $\mu$ L para 300 mg).

O tubo foi fechado e vortexado fortemente e, em seguida Incubado à 65°C até a total dissolução da agarose (5-10 min), agitando o tubo eventualmente.

Durante a incubação, foi colocada uma coluna GFX em um tubo de coleta (do Kit) para cada purificação. Tanto a coluna quanto o tubo foram devidamente identificados.

Após a dissolução da agarose, os tubos foram centrifugados. Todo conteúdo de cada tubo foi transferido para cada coluna GFX e Incubado à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, as colunas foram centrifugadas em velocidade máxima por aproximadamente 35 segundos.

Descartou-se o filtrado e colocou-se as colunas de volta aos tubos.

Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de *wash buffer* em cada tubo. Centrifugou-se em velocidade máxima por 35 segundos. O filtrado foi descartado e repetiu-se a centrifugação para retirada de todo o buffer, descartando-se, novamente o filtrado. As colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 ml devidamente identificados.

Após a transferência, foi adicionado 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  mQ autoclavada em cada coluna, incubando-se à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, o DNA foi eluído e centrifugado em velocidade máxima por 1 minuto. Para verificar a purificação, 3  $\mu\text{L}$  do DNA eluído foi aplicado em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio.

### **3.6.1 Re-amplificação de DNA purificado**

Devido a pequena quantidade de material obtido após a purificação, foi realizada uma re-amplificação a partir de 1  $\mu\text{L}$  de DNA purificado, seguindo os mesmos padrões de concentração e ciclagem descritos anteriormente, a fim de adquirir-se a quantidade desejada de DNA para a realização do protocolo de seqüenciamento.

## **3.7 Seqüenciamento de DNA**

Para a realização do protocolo de seqüenciamento, foi utilizado em média 200 ng de DNA, 3  $\mu\text{L}$  de primer (3,2 pmoles/ $\mu\text{L}$ ), 3  $\mu\text{L}$  de 5X sequencing

buffer e 2 ul de BigDye v3.1 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA), completando-se o volume final com H<sub>2</sub>O para 15ul, dando, posteriormente, um pulso de 1000 rpm.

Ciclagem

96°C 2 min

96°C 45 seg }  
50°C 30 seg } 35 x  
60°C 4 min }

4°C ∞

### 3.7.1 Precipitação da Reação de Seqüenciamento com glicogênio

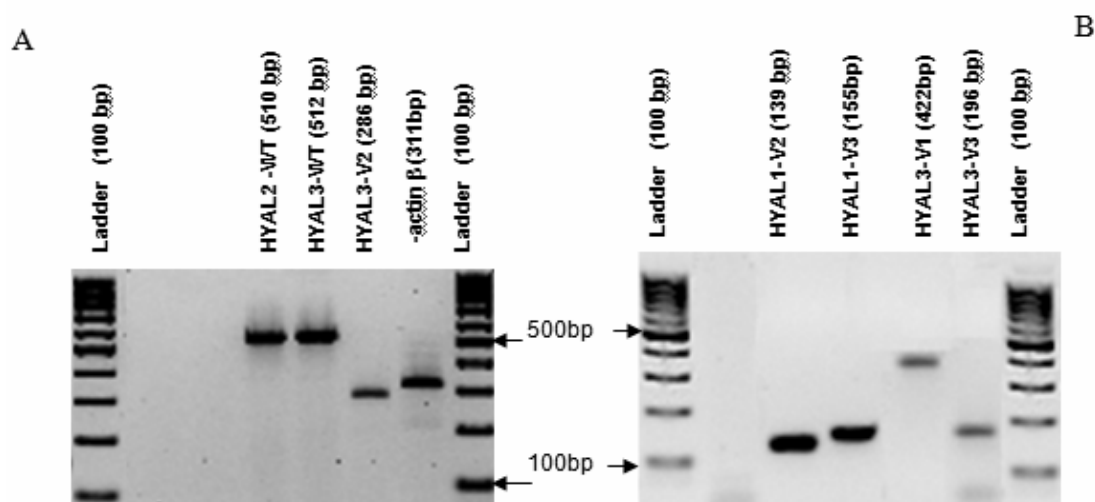
Aos 15 ul da reação de seqüenciamento, adicionou-se 25 ul do coquetel de precipitação, conforme descrito abaixo:

Para uma placa de 96 poços foi utilizado 2750ul de etanol 100% gelado, 110 ul de 3M NaOAc pH5,2 e 110ul de glicogênio 1mg/ml, vortexando e mantendo em gelo por 15 minutos. Em seguida foi centrifugado a 4.000 rpm por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente Inverteu-se e descartou-se o excesso, dando a seguir dois pulsos de 1000 rpm com a placa invertida.

Após os pulsos, foram adicionados 50ul de etanol 70% gelado por reação. Repetiu-se a centrifugação e a drenagem dos tubos, secando, posteriormente, por 1 hora em lugar protegido da luz.

Em seguida, as placas foram colocadas no seqüenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (HITACHI, London, UK). As sequências geradas, foram blastadas no GenBank). (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

A expressão da wt e das variantes 1, 2, da HYAL1, HYAL2-wt, HYAL3-wt e HYAL3-v2, estão demonstradas na figura11.



**Figura 11.** A partir de cDNA de tecido tumoral de próstata foi realizada a reação de PCR, utilizando primers específicos para HYAL 1 wt, v2, v3, v4 e v5, HYAL 2 wt e HYAL3 wt, v1, v2 e v3 e β-actina (controle positivo). Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 2%. Foi utilizado um padrão de peso molecular de 100 pb. (A) Perfil de expressão de HYAL em carcinoma de próstata que não sofreu recidiva. Nas canaletas, podemos visualizar os RNAm de HYAL1-v2 (139 bp), v3 (155 bp), HYAL3-v1(422bp) and v3 (196 bp). Foi utilizado um padrão de peso molecular de 100 pb. (B) Perfil de HYAL de adenocarcinoma grau 6 de Gleason. Quatro produtos de PCR são demonstrados. HYAL2-wt (510bp), HYAL3-wt (512bp), v2 (286bp) and β -actina (311bp).

# 4

## Resultados

---



## 4.1 Pacientes

Foram utilizados no estudo, espécimes de 11 pacientes com HPB como controle e, 55 pacientes com CP, divididos em relação ao grau histológico de Gleason e em relação a recidiva bioquímica.

Em relação ao grau histológico de Gleason: 30 (54,5%) pacientes foram diagnosticados com EG  $\geq 7$  e 25 (45,5%) com EG  $\leq 6$ . Em relação à recidiva bioquímica: 36 (65,4%) pacientes sofreram recidiva bioquímica e 19 (34,5%) não recidivaram. Todas as características anatomo-patológicas dos pacientes estão expostas no anexo 1.

## 4.2 Expressão das HYAL 1, 2 e 3

O resultado de expressão das HYAL em todos os pacientes e grupo controle estão detalhados no anexo 2.

O resultado da análise da freqüência de expressão das HYAL 1, 2 e 3 em todos os espécimes estudados está exposto na Tabela 3. As variantes mais expressas foram HYAL1-v1 (68,2%), HYAL2-wt (65,2%) e HYAL3-wt (40,9%) e as menos expressas foram HYAL 1-v4 (4,5%) e HYAL 1-v5 (4,5%). Quando avaliamos apenas a expressão das HYAL nos tecidos normais,

controles, a maior parte das HYAL foram expressas, exceto, HYAL1-v4, HYAL1-v5 e HYAL3-v2. Nos tumores, as variantes mais expressas foram HYAL2-wt (65,4%), HYAL1-v1 (63,6%) e HYAL3-wt (47,2%).

**Tabela 3-** Frequência de expressão das HYAL nos 66 espécimes estudados

<b>HYAL</b>	<b>Controle (11) n (%)</b>	<b>Tumor (55) n (%)</b>	<b>C+ T (66) n (%)</b>
HYAL 1 wt	7 (63,3%)	16 (29,09%)	22 (33,3%)
HYAL 1 v1	10 (90,9%)	35 (63,6%)	45 (68,2%)
HYAL 1 v2	7 (63,3%)	12 (21,8%)	19 (28,8%)
HYAL 1 v3	7 (63,3%)	12 (21,8%)	18 (27,3%)
HYAL 1 v4	-	3 (4,5%)	3 (4,5%)
HYAL 1 v5	-	3 (4,5%)	3 (4,5%)
HYAL 2 wt	7 (63,3%)	36 (65,4%)	43 (65,2%)
HYAL 3 wt	1 (9,09%)	26 (47,2%)	27(40,9%)
HYAL 3 v1	10 (90,9%)	9 (16,3%)	19 (28,8%)
HYAL 3 v2	-	13 (19,7%)	13 (19,7)
HYAL 3 v3	2 (18,2%)	10 (18,2%)	12 (18,2%)

### 4.3 Associação entre expressão das HYAL1, 2 e 3 e recidiva tumoral

Comparando as características do grupo que sofreu recidiva em relação ao que não apresentou recidiva, exceto pelos níveis de PSA sérico, todas as demais características foram semelhantes como expostas na Tabela 4.

**Tabela 4-** Características dos 55 pacientes com Câncer de Próstata em relação a recidiva bioquímica

Recidiva Bioquímica	Idade (anos)	PSA (ng/ml)	Estádio Patológico	Escore de Gleason
	Média Mediana Variação	Média Mediana Variação		Média Mediana Variação
Sim 19 (34,5%)	66,7	14	pT2 9 (47,7%)	6
	67	12	pT3 10 (52,6%)	7
	48-83	3,7-37		4-9
Não 36 (65,5%)	63,9	8,7	pT2 24 (66,7%)	6.5
	64	7,5	pT3 12 (33,3%)	7
	50-83	2,5-21		4-9
P	#0,117	#0,049	*0,247	*0,813

#Teste de Mann-Whitney.

\*Teste exato de Fisher.

Os resultados referentes a expressão das HYAL em relação a recidiva tumoral estão descritos na Tabela 5. Na análise da expressão de HYAL nos grupos com recidiva e sem recidiva verificamos uma diferença estatisticamente significativa na expressão das hialuronidases com maior proporção de pacientes do grupo sem recidiva expressando as variantes HYAL1-v3 (30,5%) (p=0,041), HYAL3-v1 (23%) (p=0,020) e HYAL3-v2 (33,3%) (p=0,002) em relação aos pacientes que sofreram recidiva.

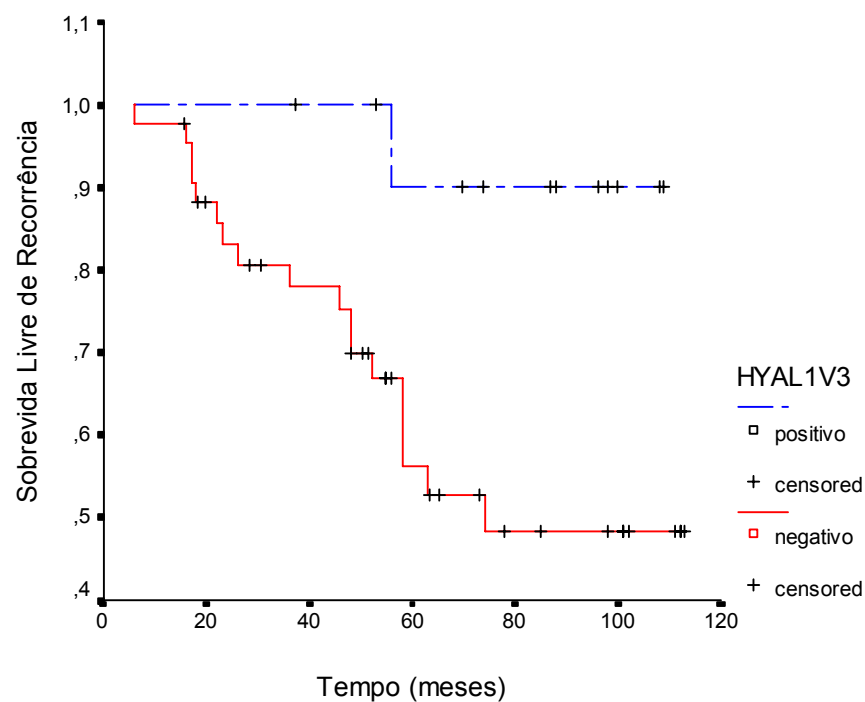
**Tabela 5-** Expressão das HYAL nos 55 pacientes com Câncer de Próstata em relação a recidiva Bioquímica

<b>HYAL</b>	<b>Com Recidiva (n=19)</b>	<b>Sem Recidiva (n=36)</b>	<b>p-valor</b>
<b>HYAL1</b>			
wt	6 (31,5%)	10 (27,7%)	0,765
v1	10 (52,6%)	26 (72,2%)	0,233
v2	4 (21,0%)	8 (22,2%)	1,000
v3	1 (5,2%)	11 (30,5%)	0,041
v4	1(5,2%)	2 (5,5%)	1,000
v5	2 (10,5%)	1 (2,7%)	0,272
<b>HYAL2</b>			
wt	10 (52,6%)	26 (72,2%)	0,233
<b>HYAL3</b>			
wt	6 (31,5%)	20 (51,3%)	0,155
v1	-	9 (23,0%)	0,020
v2	-	13 (33,3%)	0,002
V3	3 (15,8%)	7 (17,9%)	1,000

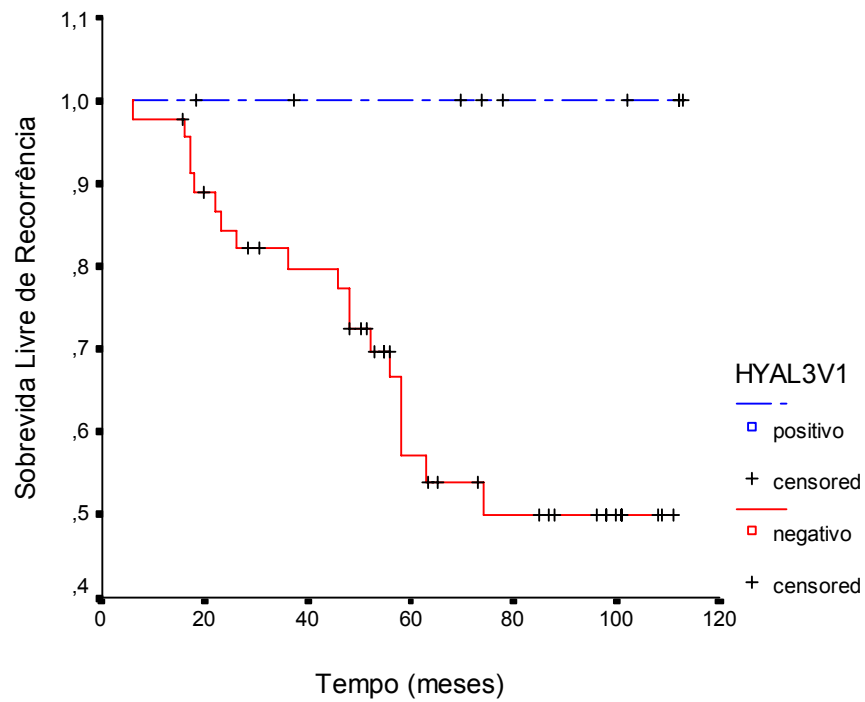
Teste de chi-quadrado.

As Figuras 12, 13 e 14 exibem as curvas de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência em relação a expressão das HYAL.

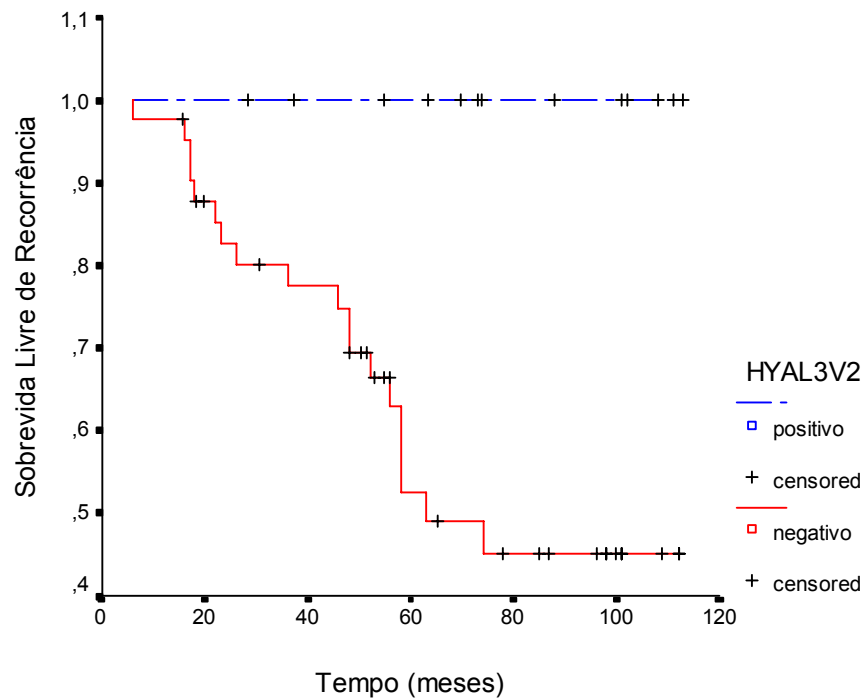
O grupo de pacientes com expressão da variante HYAL1-v3 apresentaram apenas 10% de recidiva em 120 meses em comparação com mais de 95% os pacientes que não expressaram esta variante (log rank = 5,18;  $p=0,02$ ). Em relação a HYAL3, nenhum dos pacientes que expressou HYAL3-v1 (log rank=4,96;  $p=0,02$ ), ou HYAL3-v2 (Log rank=8,31;  $p=0,004$ ) recidivou no acompanhamento de 120 meses.



**Figura 12.** Curva de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência *versus* tempo de seguimento em meses em pacientes com Câncer de Próstata em relação a expressão de HYAL1-v3.



**Figura 13.** Curva de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência *versus* tempo de seguimento em meses em pacientes com Câncer de Próstata em relação a expressão de HYL3-v1.



**Figura 14.** Curva de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência *versus* tempo de seguimento em meses em pacientes com Câncer de Próstata em relação a expressão de HYL3-v2.

#### 4.4 Associação entre expressão das HYAL1, 2, e 3 e escore de Gleason.

Comparando as características dos grupos  $EG \geq 7$  e  $EG \leq 6$ , exceto pelo estadiamento patológico, as demais características foram semelhantes como expostas na Tabela 6.

**Tabela 6-** Características dos 55 pacientes em relação ao Escore de Gleason

Escore de Gleason	Idade (anos) Média Mediana Variação	PSA (ng/mL) Média Mediana Variação	Estádio Patológico
EG $\geq$ 7 30 (54,5%)	66,9 66 57-83	11,2 9,7 2,8-37	pT2 13 (43,3%) pT3 17 (56,7%)
EG $\leq$ 6 25 (45,5%)	62,4 64 48-76	9,8 6,9 2,5-37	pT2 20 (80%) pT3 5 (20%)
<i>P</i>	#0,070	#0,302	*0,007

#*Teste de Mann-Whitney.*

\**Teste exato de Fisher*

O resultado de expressão das HYAL em relação ao EG está exposto na Tabela 7. Notamos uma maior expressão de HYAL3-v1 em tumores com  $EG \leq 6$  ( $p < 0,001$ ). Esta variante não foi expressa por nenhum paciente com  $EG \geq 7$ . As demais variantes não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 7-** Expressão das HYALs de acordo com escore de Gleason

<b>HYAL</b>	<b>Gleason <math>\geq 7</math> (n=30)</b>	<b>Gleason <math>\leq 6</math> (n=25)</b>	<b>p-valor</b>
<b>HYAL1</b>			
wt	9 (31,0%)	7 (28,0%)	1,000
v1	20 (66,7%)	16 (64,0%)	1,000
v2	8 (27,6%)	4 (16,0%)	0,268
v3	7 (24,1%)	5 (20,0%)	1,000
v4	1 (3,4%)	2 (8,0%)	0,585
v5	2 (6,9%)	1 (4,0%)	1,000
<b>HYAL2</b>			
wt	19 (65,5%)	17 (68,0%)	0,781
<b>HYAL3</b>			
wt	13 (44,8%)	13 (52,0%)	0,593
v1	-	9 (36,0%)	<0,001
v2	5 (16,7%)	8 (32,0%)	0,155
v3	4 (13,3%)	6 (24,0%)	0,484

Teste de qui-quadrado



# 5

## Discussão

---

Neste trabalho demonstramos um perfil de expressão de variantes das HYAL em CP, relacionado a baixo grau histológico de Gleason e a tumores não recorrentes. HYAL3-v1 foi encontrada somente em tumores com escore de Gleason baixo e não recidivantes, enquanto que a expressão de HYAL3-v2 e HYAL3-v1 foi positiva exclusivamente em tumores que não sofreram recidiva, seguida por HYAL1-v3 que foi expressa em 30,5% dos tumores não recidivantes e em apenas 5,2% dos casos que recidivaram. Esta correlação entre o perfil de expressão de HYAL e o comportamento tumoral favorável pode ser justificada por essas variantes se tratarem de formas enzimaticamente inativas.

Com o evento de splicing gerador dessas três variantes ocorre a perda de 30 aminoácidos (aa) na proteína que é codificada por um único exon composto por 90 pares de bases, presente em ambos os genes HYAL1 e 3, responsável pela composição do substrato de ligação ao sítio de clivagem do HA (Mackovic-Housley et al., 2000). O sítio catalítico do HA está localizado nas pontes glicosídicas entre N-acetil-D-glucosamina e ácido D-glucurônico (Mackovic-Housley et al., 2000). Como o HA é um polímero longo, constituído dessas unidades repetidas, as variantes de HYAL1 e 3, originadas por splicing, não conseguem degradá-lo, tornando esta função restrita as HYAL selvagens. Os produtos originados pela degradação do HA em fragmentos constituídos por 2 a 25 dissacarídeos, estimulam a

proliferação de células endoteliais através da indução da atividade da proteína tirosino-quinase e ativação de vias de transdução de sinal, sendo esse um processo essencial para indução de angiogênese, fundamental no processo de progressão das neoplasias (Halici et al., 2004; Slevin et al., 1998).

Além dessas interações, digestão da matriz extracelular pela HAase tumoral, pode liberar fatores de crescimento contidos no microambiente, alguns desses como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto (FGF) são essenciais para promoção do crescimento tumoral e neovascularização (Lokeshwar et al., 2000; Rahmnaian et al., 2002). O HA intacto poderia atuar como uma barreira para neovascularização e, conseqüentemente, inibir crescimento e progressão tumoral (Rahmnaian et al., 2002).

Estes mecanismos podem elucidar nossos achados em que tecidos benignos, CP não recorrente e com baixo escore de Gleason, expressam predominantemente algumas variantes em relação às wts.

Perfis de expressão de HYAL decorrentes de splicing têm sido correlacionados com comportamento de tumores. A avaliação do padrão de expressão dessas variantes em tecido normal de bexiga em linhagens de células uroteliais normais, e em linhagem de células de câncer de bexiga de baixo grau, mostram um predomínio de expressão das variantes das HYAL1 e 3, sobre a wt quando comparados aos tumores de alto grau e metastáticos em linfonodos (Lokeshwar et al., 2002).

Porém, diferente de nossos achados, este estudo descreve transcrição de HYAL1-wt, responsável pela codificação da HAase ativa,

somente em câncer de bexiga de alto grau, incluindo espécimes linfonodopositivos, e linhagens de CP. Nossos resultados, porém mostram que HYAL1-wt foi expressa de maneira indiscriminada nos tecidos controle e tumores, tanto com escore de Gleason alto quanto baixo, não se associando a presença ou comportamento da neoplasia.

Este resultado nos leva a crer que, mesmo presente, a proteína oriunda da HYAL1-wt pode ter sua atividade bloqueada ou atenuada pelas isoformas geradas por *splicing* alternativo. Como nosso estudo foi qualitativo, não pudemos avaliar a proporção entre gene selvagem e suas variantes nos casos que apresentaram as duas formas. Esta questão é merecedora de uma futura investigação, já que foi demonstrada em um recente estudo que a atividade da Hyal selvagem apresenta-se diminuída quando na presença de isoformas geradas por *splicing* (Chao et al., 2007). Este achado ajuda-nos a elucidar nossos resultados, em que mesmo na presença da HYAL1-wt, alguns tumores tiveram comportamento indolente. Possivelmente, essas variantes comportam-se como dominantes negativos, ou seja, capazes de inibir a ação do transcrito selvagem. Em estudos seguintes, seria interessante mensurar a concentração necessária para que haja este bloqueio.

Outro estudo, mencionado anteriormente, que caracterizou um domínio EGF-like, presente na estrutura das HAases, nos auxilia a compreender a correlação entre HYAL3-v1 e tumores de bom comportamento. Por esta variante ser a única que perde o domínio EGF-like, é possível que este domínio atue em processos de interação proteína-proteína, célula-célula e célula-matriz, promovendo a proliferação.

Outro fator que merece discussão diz respeito às proteínas envolvidas no mecanismo do *splicing*. Como já foi mencionado, para que haja a formação do spliceossomo é necessário o envolvimento de uma série de proteínas como as RNPnp, RNPnh e as proteínas ricas em serinas (pRS). Como estas proteínas possuem papéis distintos na montagem do complexo, suas concentrações em diferentes condições teciduais também podem estar alteradas, como nos casos dos tumores. Qualquer variação de concentração dessas proteínas poderia desencadear ou inibir o *splicing*, alterando o produto gênico e possivelmente, a evolução da doença.

Quanto a HYAL2-wt, como não houve diferença de expressão entre os tumores e pacientes controles, podemos aventar que a proteína originada por este gene, não interfere na fisiopatologia do CP. Não existem dados na literatura correlacionando HYAL2 a tumores de próstata. No entanto, foi demonstrada a correlação entre a presença de HA clivado em fragmentos de 50 a 60 dissacarídeos gerados pela HYAL2-wt e linfomas não Hodgkin B de bom prognóstico (Bertrand et al, 2006).

Apesar dessas demonstrações de que as formas inativas das Hyal 1 e 3 ou a Hyal 2 selvagem que degrada o HA em fragmentos maiores estão correlacionadas a tumores de melhor prognóstico, existem evidências na literatura de que os níveis aumentados de HA favoreceriam o crescimento e a invasão tumoral, além de oferecer proteção contra o sistema imunológico (Pure e Cuff, 2001). Porém esses dados são provenientes de estudo de tumores cavitários, mesoteliomas, diferente de tumores de órgãos parenquimatosos.

É importante citar que outros componentes presentes na MEC que interagem com o HA, podem interferir no mecanismo de desenvolvimento tumoral, causando esta aparente contrariedade. Entre eles, citam-se os proteoglicanos de condroitim sulfato e dermatam sulfato (versicam), agregam e sindecam 1, que atuam em diversos mecanismos celulares dependendo de sua interação com outros glicosaminoglicanos; além de modular a atividade de fatores de crescimento celular, poderiam facilitar o desenvolvimento tumoral, mesmo sem a degradação do HA.

Discute-se muito em estudos de expressão de genes em próstata a utilização da zona de transição ou central como controle. Já foi demonstrado em estudos de proteômica que existe grande similaridade entre a zona de transição e zona central quanto ao perfil protéico (Franzen et al., 2005). Embora, nossas conclusões tenham sido elaboradas através da comparação entre tumores de diferentes comportamentos, assim derivados das mesmas zonas prostáticas. A avaliação de tecido prostático não tumoral foi apenas realizada para uma avaliação global do perfil de expressão de HYAL no tecido prostático.

Demonstramos neste estudo que o CP expressa diferentes variantes de HYAL 1 e 3, que se relaciona com o comportamento da doença, fato nunca antes relatado na literatura. Esta variação de expressão de HYAL pode explicar em parte o comportamento biológico heterogêneo desta neoplasia e pode ser usado na prática clínica para orientação terapêutica, como, por exemplo, indicação de observação vigilante.

# 6

## Conclusões

---

O Câncer de Próstata apresenta um perfil de expressão de HYAL que caracteriza tumores de baixo grau histológico e bom comportamento considerando recidiva bioquímica.

A expressão da variante HYAL3-v1 se relaciona com tumores histologicamente bem diferenciados, com baixo escore de Gleason.

A expressão das variantes HYAL3-v1 e v2 e HYAL1-v3 se relacionam com tumores que não sofreram recidiva.



7

Anexos

---

## Anexo 1

N banco	Nome	Idade (Anos)	PSA pré (ng/mL)	Gleason	Extra	Vesícula Seminal	Linfonodo	TNM	Data cirurgia	PSA* (ng/mL)	Tempo de seguimento (meses)	Tempo de recidiva (meses)
118	SY	65	18,3	8	-	-	-	pT2	15/09/1998	1,1	58,3	16
130	RNT	67	16,0	7	-	-	-	pT2	20/10/1998	0,6	90	46
148	OG	65	37,0	9	-	-	-	pT2	17/11/1998	0,4	17	17
240	GIR	68	22,0	7	-	-	-	pT2	19/06/1999	0,5	96	18
273	ECM	58	8,30	7	+	-	-	pT2	17/08/1999	0,5	91	56
295	JAT	66	12,6	7	+	-	-	pT3	23/09/1999	6	52	6
340	DAB	76	12,0	7	+	-	-	pT3	04/01/2000	4,8	83	26
421	ADMA	67	12,0	8	+	+	-	pT3	04/07/2000	0,3	41,2	22
315	RB	70	3,7	7	-	-	-	pT2	09/11/1999	4,16	35,2	17
284	BN	83	4,80	7	+	-	-	pT3	9/11/1999	0,4	50,4	36
363	PD	70	12,0	7	+	-	-	pT3	22/2/2000	1,2	46,9	23
55	WA	72	8,1	8	+	-	-	pT3	31/03/1998	0,1	111	
167	NJS	66	12,2	8	+	-	-	pT3	07/01/1999	0	101	
182	FCP	64	21,0	9	-	-	-	pT2	28/01/1999	0,1	101	
183	IFR	66	7,0	9	-	-	-	pT2	02/02/1999	0,15	100	
187	HS	71	15,5	8	-	-	-	pT2	05/02/1999	0,1	88	
206	PFOB	62	6,5	8	+	-	-	pT3	25/03/1999	0	87	
216	FDPL	60	10,0	8	+	-	-	pT3	20/04/1999	0,1	98	
217	AC	74	5,0	8	+	-	-	pT3	22/04/1999	0	28,2	
222	GLM	64	9,5	7	-	-	-	pT2	11/05/1999	0	96	
223	ABO	58	11,0	8	+	-	-	pT3	11/05/1999	0,1	85	
230	SCV	68	4,2	8	-	+	-	pT3	27/05/1999	0,1	55,9	
232	DM	68	7,9	8	-	-	-	pT2	01/06/1999	0	54,8	
243	LP	60	6,10	8	+	-	-	pT3	21/06/1999	0	48	
250	EM	63	6,80	7	+	-	-	pT3	06/07/1999	0	98	
255	AP	63	7,30	7	-	-	-	pT2	01/07/1999	0	54,8	
261	DCC	75	13,60	8	+	-	-	pT3	03/08/1999	0	30,4	

Continua...

Conclusão Anexo 1

N banco	Nome	Idade (Anos)	PSA pré (ng/mL)	Gleason	Extra	Vesícula Seminal	Linfonodo	TNM	Data cirurgia	PSA* (ng/mL)	Tempo de seguimento (meses)	Tempo de recidiva (meses)
264	JBS	59	2,80	8	+	-	-	pT3	23/7/1999	0	15,5	
277	GNFG	57	18,10	8	-	-	-	pT2	24/8/1999	0	53	
284	BN	83	4,80	7	+	-	-	pT3	9/11/1999	0	50,4	
79	FS	64	6,8	6	+	-	-	pT3	06/09/1998	0,5	101	58
100	JGT	66	17,9	5	-	-	-	pT2	23/7/1998	0,3	103	74
102	RO	60	37,0	5	-	-	-	pT2	28/7/1998	0,4	110	63
108	RTP	76	9,3	5	+	-	-	pT3	18/8/1998	0,6	102	48
122	MTC	74	18,9	6	+	-	-	pT3	29/9/1998	0,7	104	58
202	PCLB	53	6,20	6	+	-	-	pT3	18/3/1999	0,5	60	48
49	EO	48	5,2	4	-	-	-	pT2	05/03/1998	0,2	70	58
399	JFS	72	6,20	6	+	+	-	pT3	10/5/2000	0,75	84	52
15	MS	69	3,7	5	-	-	-	pT2	12/09/1997	0,1	73,7	
35	AAF	64	12,0	4	-	-	-	pT2	03/02/1998	0,1	37,4	
44	DER	59	9,2	4	-	-	-	pT2	21/2/1998	0,1	65,2	
47	ACRC	57	14,0	5	-	-	-	pT2	03/03/1998	0,1	69,8	
54	RNLV	65	14,6	5	-	-	-	pT2	30/3/1998	0,1	113	
61	AL	64	6,2	5	-	-	-	pT2	14/4/1998	0,1	63,3	
73	ACB	61	5,6	5	-	-	-	pT2	14/05/1998	0,1	108	
88	WS	60	2,5	5	-	-	-	pT2	20/6/1998	0,1	109	
109	MTM	68	6,1	5	-	-	-	pT2	18/8/1998	0,1	112	
115	RCC	51	10,0	5	-	-	-	pT2	09/08/1998	0	112	
125	RST	70	4,8	5	-	-	-	pT2	10/03/1998	0,1	73	
196	OM	56	5,50	5	-	-	-	pT2	02/03/1999	0,1	18,2	
221	FAVM	50	3,70	5	-	-	-	pT2	11/05/1999	0,1	78	
252	RG	71	12,50	6	-	-	-	pT2	08/07/1999	0	51,5	
376	WH	61,07	6,9	5	-	-	-	pT2	15/09/99	0,1	19,6	
195	EB	60,92	6,7	5	-	-	-	pT2	20/10/99	0	101	
121	EHS	60,78	6,6	4,54162	-	-	-	pT2	17/11/99	0,1	102	

\*PSA do momento da recidiva ou o último referente ao tempo de seguimento.

## Anexo 2

HPB		HYAL1					HYAL2	HYAL3				
N banco	Nome	wt	V1	V2	V3	V4	V5	wt	wt	V1	V2	V3
9	JC	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
10	ODP	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
12	RD	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
16	AOT	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
17	EDNJ	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
19	CJSA	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
20	SD	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
21	SBC	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
13	PRSM	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1
14	AC	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
103	JÁP P	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<b>Pacientes com câncer de próstata</b>												
118	SY	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130	RNT	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
148	OG	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
240	GIR	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
273	ECM	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
295	JAT	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
340	DAB	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1
421	ADMA	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
315	RB	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
284	BN	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continua...

HPB		HYAL1						HYAL2	HYAL3			
N banco	Nome	wt	V1	V2	V3	V4	V5	wt	wt	V1	V2	V3
363	PD	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
55	WA	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
167	NJS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
182	FCP	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1
183	IFR	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
187	HS	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
206	PFOB	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
216	FDPL	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
217	AC	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1
222	GLM	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
223	ABO	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
230	SCV	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
232	DM	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
243	LP	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
250	EM	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
255	AP	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
261	DCC	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
264	JBS	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
277	GNFG	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
284	BN	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	FS	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
100	JGT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Continua...

Conclusão Anexo 2

HPB		HYAL1					HYAL2	HYAL3				
N banco	Nome	wt	V1	V2	V3	V4	V5	wt	wt	V1	V2	V3
102	RO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108	RTP	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
122	MTC	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
202	PCLB	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
49	EO	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
399	JFS	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0
15	MS	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
35	AAF	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
44	DER	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
47	ACRC	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
54	RNLV	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0
61	AL	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1
73	ACB	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
88	WS	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
109	MTM	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
115	RCC	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
125	RST	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
196	OM	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
221	FAVM	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
252	RG	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
376	WH	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
195	EB	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
121	EHS	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0

# 8

## Referências

---

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecan. *Annu Rev Biochem.* 1992; 8: 365-93.

Bernfield M, Gotte M, Park PM, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. Function of cell surface heparin sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 729-77.

Bertrand P, Courel MN, Maingonnat C, Jardin F, Tilly H, Bastard C. Expression of HYAL2 mRNA, hyaluronan and hyaluronidase in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Relationship with tumor aggressiveness. *Int J Cancer.* 2006; 113: 207-2.

Bostwick DG, Foster CS. Predictive factors in prostate cancer: current concepts from the 1999 College of American Pathologists Conference on Solid Tumor Prognostic Factors and the 1999 World Health Organization Second International Consultation on Prostate Cancer. *Semin Urol Oncol.* 1999; 17:222-72.

Bratt O. Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol.* 2002, 168:906-13.

Carter HB, Partin AW. Diagnosis and staging of prostate cancer. In: Patrick C Walsh, Alan B Retik, Alan J Wein, Darracott E, Vaughan Jr. Editors. *Campbell's Urology.* 8th ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 2002: p. 3055-64.

Catalona WJ, Ramos CG, Carvalhal GF, Yan Y. Lowering PSA cutoffs to enhance detection of curable prostate cancer. *Urology.* 2000; 55:791-5.



Clark DP. Molecular Biology. Understanding the Genetic Revolution. 2nd ed. London: Elsevier, 2005. p. 306-09.

Coldman AJ, Phillips N, Pickles TA. Trends in prostate cancer incidence and mortality: an analysis of mortality change by screening intensity. *CMAJ*. 2003; 168:31-5.

Cooperberg MR, Moul JW and Carroll PR. The changing face of prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23:8146.

Csóka AB, Scherer SW, Stern R. Expression Analysis of Six Paralogous Human Hyaluronidase Genes Clustered on Chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics*. 1999; 60: 356-61.

Csoka TB, Frost GL, Stern R. Hyaluronidases in tissue invasion. *Invasion Metastasis*. 1997;17:297-311.

Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel NM, Chauzy C, Delpech A. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Int Med*. 1997; 242:41-48.

Dietrich CP. A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans. *Braz. J Med Biol Res*. 1984;17:5-15.

Ekici S, Cerwinka WH, Duncan RI. Comparison of the prognostic potential of hyaluronic acid, hyaluronidase (HYAL-1), CD44v6 and microvessel density for prostate cancer. *Int J Cancer*. 2004; 112:121-9.

Engström-Laurent A, Laurent UB, Lilja K, Laurent TC. Concentration of sodium hyaluronate in serum. *Scand J Clin Lab Invest*. 1985; 45: 497-504.

Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL. Update on the Gleason grading system for prostate cancer: results of an international consensus conference of urologic pathologists. *Adv Anat Pathol*. 2006 Jan;13:57-9.

Esko JD. Genetic analysis of proteoglycans structure, function and metabolism. *Curr Opin Cell Biol*. 1991; 3: 805-16.

Franzen HB, Hirschberg D, Becker S, Hellström M, Bergman T, Jörnvall H, Auer G, Egevad L. Differential protein expression in anatomical zones of the prostate. *Proteomics*. 2005; 5:2570-6.

Fraser, JR, Laurent, TC, Laurent, UB. Hyaluronan: its nature, distribution ,functions and turnover. *J Inter Med*. 1997; 242:27S–33S.

Frost GI, Csoka TB, Wong T, Stern R. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 236:10–15.

Frost GI, Csoka TB, Stern R. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycoscience Glycotechnol*. 1996; 8:419-34.

Chow G, Knudson W. Characterization of promoter elements of the human HYAL-2 gene. *J Biol Chem*. 2005; 280: 26904-12.

Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*. 1992; 23:273-79.

Gleason, DF. Histologic Grading and Clinical Staging of Prostate Cancer. *Urol Pathol*. 1977; 171.

Graveley, BR. Alternative *splicing*: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet.* 2001; 17:100–7.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. *Cancer J Clin.* 2001; 51:15.

Grubb RL, Kibel AS. Prostate cancer: screening, diagnosis and management in 2007. *Mol Med.* 2007; 104:408-13.

Halici M, Karaoglu S, Canoz O, Kabak S, Baktir A . Sodium hyaluronate regulating angiogenesis during Achilles tendon healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2004; 12: 562–7.

Herrlich P, Morrison H, Sleeman J, Orian-Rousseau V, Konig H, Weg-Remers S, Potan H. CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;910:106-18; discussion 118-20.

Hobarth K, Maier U, Marberger M. Topical chemoprophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin C and adjuvant hyaluronidase. *Eur Urol.* 1992; 21:206-10.

Humphrey PA, Vollmer RT. Intraglandular tumour extent and prognosis in prostatic carcinoma. *Hum Pathol.* 1990; 21:799-804.

Hyoung KP, Gheeyoung C, Seok-Soo B, Lee HW, Lee SE, Lee E. Evaluation of concordance of Gleason score between prostatectomy and biopsies that show more than two different Gleason scores in positive cores. *Urology.* 2006; 67:110-114.

Ichikawa T, Itano N, Sawai T, Kimata K, Koganehira Y, Saida T, Taniguchi S. Increased synthesis of hyaluronate enhances motility of human melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 1999 Dec;113(6):935-9.

Instituto Nacional do Câncer INCA, Câncer de próstata. Disponível em: <http://www.inca.com.br> . [citado: 14 de dez. 2005].

Instituto Nacional do Câncer INCA. Câncer de próstata. Disponível em: <http://www.inca.com.br> . [citado: 21 de out. 2006].

Iozzo R V. Matrix proteoglycans: from molecular design, to cellular function. *Annu Rev Biochem*. 1998; 67: 609-52.

Kattan MW, Eastham JA, Wheeler TM. Counseling men with prostate cancer. a nomogram for predicting the presence of small, moderately differentiated, confined tumors. *J Urol*. 2003; 170:1792–7.

Kjellén L, Lindahl V. Proteoglycans: structure and interactions. *Annu Ver Biochem*. 1991; 60: 443-75.

Klotz LH, Nam RK. Active surveillance with selective delayed intervention for favorable risk prostate cancer: clinical experience and a number needed to treat' analysis. *Cancer J Urol*. 2006; 1:48-55.

Knudson, CB, Knudson, W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin Orthop Rel Res*. 2004; 427:152–162.

Knudson, W, Chow, G, Knudson, CB. CD44-mediated uptake and degradation of hyaluronan. *Matrix Biology*. 2002; 21:15–23.

Krusius T, Gehlsen K, Ruoslahti E. A fibroblast chondroitin sulfate proteoglycans core protein contain lectin-like and growth factor sequences. *J Biol Chem.* 1987; 262: 13120-5.

Latchman D. Gene regulation. A eukaryotic perspective. 2nd ed. London: Chapman , Hall; 1995.

Laurent TC, Fraser J.R. Hyaluronan. *FASEB Journal.* 1992; 6: 2397–2404.

Laurent TC. Chemistry and molecular biology of the Intercellular matrix. New York: *Academic Press*,1970. p.703–32.

Lee, JY, Spicer, AP. Hyaluronan: a multifunctional, megadalton, stealth molecule. *Opin Cell Biol.* 2000;12: 581–6.

Li R , Todd NW, Qiu Q, Fan T, Zhao RY, Rodgers WH, Fang H, Katz RL, Stass S, Jiang F. Genetic deletions in sputum as diagnostic markers for early detection of stage I non–small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13 482-7.

Lindahl V, Kidholt K, Spillman D , Kjellén L. More to “heparin” than anticoagulation. *Tromb Res.* 1994; 75: 1-32.

Lohmander LS, De Luca S, Nilsson B, Hascall VC, Caputo CP, Kimura JH, Heinegard D. Oligosaccharide on proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J Biol Chem.* 1980; 255:6084-91.

Lokeshwar VB, Rubinowicz D, Schroeder GL, Forgacs E, Minnai JD, Block NL, Nadji M, Lokeshwar BL. Stromal and epithelial expression of tumor markers hyaluronic acid and HYAL1 hyaluronidase in prostate cancer. *J Biol Chem.* 2001; 276:11922–32.

Lokeshwar VB, Schroeder GL, Carey RI, Soloway MS, Lida N. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. *J Biol Chem.* 2002; 277: 33654–63.

Lokeshwar VB, Selzer MG. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000; 275:27641–49.

Lokeshwar VB, Young MJ, Goudarzi G. Identification of bladder tumor-derived hyaluronidase: its similarity to HYAL1. *Cancer Res.* 1999; 59:4464–70.

Markovic-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Muller U. Crystal structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure.* 2000; 8:1025–35.

Matheus, MB. Molecular biology, biochemistry and biophysics of connective tissue. Macromolecular structure and evolution. In: Kleinzeller A., Springer GK, Wittman HG, editors. New York: Springer-Verlag; 1975; p. 99,135,175, 213.

Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem.* 1934; 107:629-34.

Nader HB, Dietrich CP. Natural occurrence and possible biological role of heparin. In: Lane, DA, Lindahl V, editors. *Heparin. Chemical and biological properties, clinical applications.* London: Edward-Arnold; 1989; p. 81-86.

Nelson WG, De Marzo AM, Isacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med.* 2003; 349:366-81.

Nilsson B, De Luca S, Lohmander S, Hascall VC. Structures of N-linked and O-linked oligosaccharides on proteoglycans monomer isolated from the swarm rat chondrosarcoma. *J Biol Chem.* 1982; 257:10920-7.

Novak U, Stylli SS, Kaye AH, Lepperdinger G. Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res.* 1999; 59:6246-50.

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

Pettaway CA. Prognostic markers in clinically localized prostate cancer. *Tech Urol.* 1998; 4:35-42.

Pham HT, Block NL, Lokeshwar VB. Tumor-derived hyaluronidase: a diagnostic urine marker for high-grade bladder cancer. *Cancer Res.* 1997; 57:16-22.

Poole AR. Proteoglycans in health and disease: distribution and functions. *Biochem J.* 1986; 236:1-4.

Porcionatto MA, Nader HB, Dietrich CP. Heparan sulfato and cell division. *Br J Med Biol Res.* 1999; 32:539-44.

Pure E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med.* 2001; 7:213-21.

Rahmnaiam M, Heldin P. Testicular Hyaluronidase induces tubular structure of endothelial cells grown in three-dimensional collagen gel through a CD44-mediated mechanism. *Int J Cancer.* 2002; 97:601-7.

Reed R. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12:340-45 .

Roden L, Campbell P, Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Thompson JN. Enzymatic pathways of hyaluronan catabolism. *CIBA Found Symp.* 1989; 143:60-86.

Schröder FH, Cruijisen-Koeter I, Koning HI, Vis NA, Hoedemaeker RF, Kranse R: Prostate cancer detection at low prostate specific antigen. *J Urol* 2000; 163:806-812.

Schröder FH, De Vries SH, Bangma CH. Watchful Waiting In Prostate Cancer: Review And Policy Proposals. *BJU Int.* 2003; 92:851-9.

Scott JE, Heatley F. Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy. *Biomacromolecules.* 2002; 3:547-53.

Slevin M, Krupinski J, Kumar S, Gaffney A. Angiogenic oligosaccharides of Hyaluronan induce protein tyrosine kinase activity in endothelial cells and activate a cytoplasmatic signal transduction pathway resulting in proliferation. *Lab Invest.* 1998; 78:987-1003.

Stamey TA, McNeal JE, Yemoto CM, Sigal BM, Johnstone IM. Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer. *JAMA.* 1999; 281:1395-400.

Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 2003; 13:105–15.



Sun QY, Luria A, Rubinstein S, Breitbart H. Protein kinase inhibitors induce interphase transition by inactivating mitogen-activated protein kinase in mouse eggs. *Zygote*. 1998; 6:277–84.

Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Bio Chem*. 2002; 277:4581–84.

Tengblad V, Laurent UBG, Lilja K, Cahill RJM, Engstrom-Laurent A, Fraser RE, Hansson HE, Laurent TC. Concentration and relative molecular mass of hyaluronate in lymph and blood. *Biochem J*. 1986; 236:521-25.

Thonwar EJ, Swett MBE. An oligosaccharide component in proteoglycans of articular cartilage. *Biochem Biophys Acta*. 1977; 584:353-7.

Toole BP. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4:528–539.

Triggs-Raine B, Salo TJ, Zhang H, Wicklow BA, Natowicz MR. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Nat Acad Sci*. 1999; 96:6296-300.

Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Bio Chem*. 2002; 277: 4589-92.

Vaes G. Hyaluronidase Activity in Lysosomes of Bone Tissue. *Biochem J*. 1967; 103-802.

Watson DW, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine J, Losick R. Molecular biology of the gene. 5th ed. San Francisco: Peason; 2004. p. 383-87, 408-9.

Yanagishita M, Hascall VC. Cell surface heparan sulfate proteoglicans. *J Biol Chem.* 1992; 267: 9451-4.

Zhou Z, Licklider LJ, Gygi SP, Reed R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature.* 2002; 419:182-5.

Zimmerman D, Ruoslaht E. Multiple domains of large fibroblast proteoglicans, versican. *Embo J.* 1989; 8: 2975-81.

# 9

## Apêndice

---