

FACULDADE DE MEDICINA DE JUNDIAÍ

Débora Chaves Cajazeiro Barros

**EFEITOS DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA HEPARANASE-1
EM LINHAGEM CELULAR TUMORAL PROSTÁTICA
INSENSÍVEL AO ANDRÓGENO**

Jundiaí

2020

DEBORA CHAVES CAJAZEIRO BARROS

EFEITOS DA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA HEPARANASE-1
EM LINHAGEM CELULAR TUMORAL PROSTÁTICA
INSENSÍVEL AO ANDRÓGENO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Jundiaí para obtenção do título de **Mestre em Ciências da Saúde** sob orientação da Profa. Dra. Taize Machado Augusto.

Jundiaí

2020

B277e Barros, Débora Chaves Cajazeiro.
Efeitos da modulação da expressão da heparanase-1 em
linhagem celular tumoral prostática insensível ao andrógeno /
Débora Chaves Cajazeiro Barros. - Jundiaí: [s.n], 2020.
55 f.

Orientadora: Profa. Dra. Taize Machado Augusto.
Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação da
Faculdade de Medicina de Jundiaí, para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

1. Próstata. 2. Cancer. 3. Heparanase. 4. Célula PC3.
5. Andrógeno. I. Título.

Dedico este trabalho à minha família pelo incentivo constante e pela compreensão tantas vezes necessária.

AGRADECIMENTOS

“Como é bom render graças ao Senhor e cantar louvores ao teu nome, ó Altíssimo; anunciar de manhã o teu amor leal e de noite a tua fidelidade...” Salmos 92:1-2

A Deus, o Criador, por me dar todas as condições de trilhar esta jornada, pela proteção constante, por colocar tantas pessoas boas em meu caminho e por ser Soberano em minha vida.

A querida Profa. Dra. Taize, por ter me dado esta oportunidade, por ter enxergado em mim o potencial de chegar até aqui, apesar de todas as minhas limitações. Por toda sua dedicação em me ensinar, me orientar a cada passo. Obrigada por ser sempre tão gentil, compreensiva e paciente, seu exemplo e sua postura me marcaram profundamente. Sei que dificilmente cheguei à altura da aluna que você merecia ter. Desejo a você o melhor, SEMPRE!

Agradeço de coração à coorientadora Profa. Dra. Nilva que estava sempre presente com conselhos e sugestões imprescindíveis para o bom andamento de tudo. Admiro-te demasiadamente.

À querida Lucilene, que nesta reta final veio para completar o time das super mulheres deste laboratório. Que me ajudou tanto, foi meu Oasis em muitos momentos de deserto e que me mostrou que é possível ter super poderes sendo uma super mãe, profissional, estudante, amiga e sempre fazendo tudo da melhor forma que puder.

Um agradecimento especial à Cris que dividiu comigo essa jornada do início ao fim, compartilhando as alegrias dos resultados e as frustrações também. Obrigada por compartilhar comigo os aprendizados e as coisas da vida. Você ainda vai longe e espero que seu caminho seja repleto de conquistas e vitórias porque você as merece todas.

Aos colegas do LBMCC Jeferson e Victor que me deram todo apoio no início do meu trabalho, ao Luan, Rafael, Renan, Adriano pelo companheirismo e pela leveza que sempre proporcionaram no convívio com vocês. À Pammela, outra mulher maravilha que me ensinou e inspirou profundamente em todas as interações que tivemos, você é demais!

Ao programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da FMJ, na pessoa do coordenador Dr. Evaldo Marchi, por toda dedicação e contínua contribuição para fazer deste um programa relevante e de boa qualidade.

À Tati pelos serviços prestados na secretaria da pós graduação, NAPED, por ter sempre tratado com eficiência e gentileza todas as questões referentes ao desenvolvimento do meu curso de mestrado.

À Capes pelo apoio financeiro, através da bolsa concedida no período de março/2018 a fevereiro/2020, para a obtenção deste projeto de mestrado, sem a qual inviabilizaria esta conquista.

Aos membros da banca examinadora por me doarem seu tempo e sua estimada contribuição para a conclusão deste estudo.

Aos queridos amigos do PG, Adria, David, Polly, Fábio, Cris, e a querida Gi que me suportaram em amor e oração por todos estes anos 😊.

Meu muito obrigado à minha família que me incentivou e que foram minha força nos momentos de cansaço. Ao meu querido Ricardo que sustentou, tolerou e sobreviveu a este período ao meu lado. Muito, muito obrigada.

“E quanto mais me aprofundo nas ciências, mais me aproximo de Deus”

Albert Einstein

Resumo

O câncer é uma doença complexa e sua incidência continua em ascensão em vários países. Dos carcinomas que atingem os homens, o câncer de próstata é o mais frequente no Brasil. Os procedimentos empregados em seu tratamento vão desde a radioterapia à orquiectomia, sendo mais efetivo quando descoberto em seu estágio inicial. A progressão tumoral depende de vários mecanismos e dentre eles destacamos a uma endoglicuronidase, a heparanase-1 (HPSE1). A HPSE1 é uma enzima que tem íntima relação com os processos de invasão, pois cliva cadeias de heparan sulfato da membrana basal e da matriz extracelular, liberando assim vários fatores de crescimento e diferenciação, contribuindo no processo de invasão tumoral, neovascularização e processos inflamatórios. Neste trabalho tivemos por objetivo identificar a relação da diminuição da expressão da HPSE1 por transfecção estável pela molécula de RNA de interferência na linhagem tumoral prostática PC3 e avaliamos eventos relacionados a proliferação celular e sua relação com a modulação da expressão da HPSE1. Este estudo tratou-se de uma pesquisa experimental de caráter analítico, a partir de ensaios *in vitro*. Após os ensaios de transfecção por *shRNA* e seleção da linhagem PC3 obtivemos clones que apresentaram inibição de HPSE1 sendo o clone PC3shHPSE1 escolhido por apresentar cerca de 70% de inibição da expressão da HPSE1, verificado por ensaio de Real Time PCR. Os níveis proteicos deste clone e da linhagem parental foram analisados por *Western Blotting* sendo que o clone apresentou quantidade proteica 60% inferior a quantidade apresentada pela parental, esta diferença também se mostrou equivalente nas análises de imunolocalização. Análise de viabilidade celular por MTT, demonstrou que a célula PC3shHPSE1 teve sua proliferação menor em relação à PC3. Em conclusão, podemos inferir que a diminuição da HPSE1, segundo o comportamento apresentado pelo clone PC3shHPSE1 reflete características menos invasivas e proliferativas. Este resultado corrobora com os estudos que intentam estabelecer a HPSE1 como um potencial marcador do câncer.

Palavras-chave: Próstata. Câncer. Heparanase 1. Célula PC3. Andrógeno.

ABSTRACT

Cancer is a complex disease and its incidence continues to increase in several countries. Of the carcinomas that affect men, prostate cancer is the most frequent in Brazil. The procedures used in its treatment range from radiotherapy to orchiectomy, being more effective when discovered in its initial stage. Tumor progression depends on several mechanisms and among them we highlight an endoglycuronidase, heparanase-1 (HPSE1). HPSE1 is an enzyme that is closely related to invasion processes, as it cleaves heparan sulfate chains from the basement membrane and extracellular matrix, thus releasing several growth and differentiation factors, contributing to the process of tumor invasion, neovascularization and inflammatory processes. In this work, we aimed to identify the relationship between decreased expression of HPSE1 by stable transfection by the interfering RNA molecule in the prostatic tumor line PC3 and evaluated events related to cell proliferation and its relationship with modulation of HPSE1 expression. This study was an experimental research of an analytical character, based on in vitro tests. After the shRNA transfection assays and selection of the PC3 strain, we obtained clones that showed HPSE1 inhibition, with the PC3shHPSE1 clone being chosen for presenting about 70% inhibition of HPSE1 expression, verified by Real Time PCR assay. The protein levels of this clone and the parental lineage were analyzed by Western Blotting and the clone showed a protein content 60% lower than the amount presented by the parental one, this difference was also shown to be equivalent in immunolocalization analyzes. Analysis of cell viability by MTT, showed that the PC3shHPSE1 cell had less proliferation compared to PC3. In conclusion, we can infer that the decrease in HPSE1, according to the behavior shown by the PC3shHPSE1 clone, reflects less invasive and proliferative characteristics. This result corroborates with the studies that try to establish HPSE1 as a potential cancer marker.

Keyword: Prostate. Cancer. Heparanase 1. PC3 cell. Androgen.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator Indutor de Apoptose
AR	Receptor de andrógeno
ATCC	American Type for Cell Culture
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
BRC	Centro Global de Biorecursos
CAF	Fibroblastos associados ao tumor
CaP	Câncer de Próstata
cDNA	DNA complementar
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DU145	Linhagem tumoral prostática (sítio: cérebro)
GAGs	Glicosaminoglicanos
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLOBOCAN	Global Câncer Observatory
HPSE1	Heparanase-1
HS	Heparan sulfato
HSPG	Proteoglicanos de Heparan de Sulfato
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LNCaP	Linhagem tumoral prostática (sítio: linfonodo subclavicular esquerdo)
MB	Membrana Basal
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	Gene supressor tumoral
PBS	Tampão Fosfato Salino

PC3	Linhagem tumoral prostática metastática (sítio: osso)
PGs	Proteoglicanos
PSA	Antígeno Prostático Específico
qPCR	Reação em cadeia da Polimerase quantitativa em Tempo Real
RNA	Acido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura celular)
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
SFB	Soro Fetal Bovino
TAM	Macrófago associado ao tumor
TGFs	Fator de crescimento transformante
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WB	Western Blotting

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

FIGURA 1: DADOS ESTIMADOS DE INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DO CÂNCER PARA AMBOS OS SEXOS EM TODAS AS IDADES.-----	14
FIGURA 2: DISTRIBUIÇÃO PROPORCIONAL DOS DEZ TIPOS DE CÂNCER MAIS INCIDENTES ESTIMADOS PARA 2020 POR SEXO, EXCETO PELE NÃO MELANOMA-----	15
FIGURA 3: ILUSTRAÇÃO REPRESENTATIVA DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO, -----	16
FIGURA 4: INCIDÊNCIA DE CASOS DE CÂNCER DE PRÓSTATA ATE O ANO DE 2040. -----	16
FIGURA 5: GRÁFICO REPRESENTATIVO DA EXPRESSÃO DE HPSE1 ATRAVÉS DE ANÁLISE DE RNA POR QRT-PCR -----	33
FIGURA 6: MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA HPSE1 NAS CÉLULAS DA LINHAGEM PC3 CONFIRMADA POR REAL TIME PCR. -----	34
FIGURA 7: IMAGEM POR MICROSCOPIA DE CONTRASTE -----	35
FIGURA 8: CITOQUIMICA DAS CÉLULAS PC3 E PC3SHHPSE CORADAS POR H&E -----	35
FIGURA 9: CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR-----	36
FIGURA 10: TESTE MTT -----	37
FIGURA 11: IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA HPSE1-----	38
FIGURA 12: ANÁLISE DE ESCALA DE COR POR IMAGEJ-----	39
FIGURA 13: FOTOMICROGRAFIAS DE CÉLULAS PC3 E PC3SHHPSE DURANTE ENSAIO DE RANHURA OU MIGRAÇÃO CELULAR (<i>SCRATCH ASSAY</i>)-----	41
FIGURA 14: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS NAS LINHAGENS PC3 E PC3SHHPSE1 POR <i>WESTERN BLOTTING</i> . -----	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: SEQUÊNCIA DOS OLIGOS INICIADORES (<i>PRIMERS</i>) PARA ANÁLISE POR QRT-PCR.....	27
TABELA 2: LISTA DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS UTILIZADOS NA TÉCNICA <i>WESTERN BLOTTING</i>	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Câncer.....	14
1.2. Câncer de próstata.....	15
1.3. Matriz Extracelular	18
1.4. Heparanase	20
2. OBJETIVOS GERAIS.....	22
2.1. Objetivos Específicos	23
3. MÉTODO.....	23
3.1. Cultura de Célula 2D	23
3.2. Descongelamento, expansão e manutenção das linhagens celulares. ..	24
3.3. Transfecção estável da linhagem PC3	25
3.4. Análise da expressão gênica por qRT- PCR.....	26
3.4.1. Isolamento de RNA total.....	27
3.4.2. Transcriptase reversa para a síntese de cDNA e qPCR	27
3.5. Ensaio de proliferação celular (por MTT).....	28
3.6. Imunolocalização da HPSE1	29
3.7. Migração Celular (<i>Scratch Assay</i>).....	30
3.8. Western Blotting.....	31
3.9. Análise estatística	32
4. RESULTADOS.....	33
4.1. A HPSE1 teve seus níveis diminuídos após a transfecção estável por plasmídeo contendo shRNA.....	33
4.2. Os níveis diminuídos de HPSE1 refletem na mudança fenotípica da sublinhagem obtida após a transfecção.....	34
4.4. A sublinhagem com inibição estável da HPSE1 apresenta uma menor viabilidade celular.....	36
4.5. A Imunolocalização da HPSE1 na sublinhagem shRNA se mostra concentrada no núcleo celular	37
4.6. Ensaio de Migração Celular (<i>Scratch assay</i>).....	40
4.7. A inibição estável da HPSE1 compromete a expressão de proteínas relacionadas a progressão tumoral e morte celular.....	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Câncer é um termo genérico que abrange vários grupos de doenças caracterizadas pelo crescimento celular atípico, além de seus limites naturais, podendo invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar por um ou vários órgãos. Outros termos usados para esta condição são tumor maligno e neoplasias. O câncer pode afetar a maior parte do corpo e possui diferentes subtipos anatômicos e moleculares, cada um deles exigindo estratégias de condutas específicas (1).

Segundo a Organização Mundial da saúde (OMS) para o ano de 2018, foram estimados 9,6 milhões de mortes por câncer (dados não consolidados), fazendo dele a segunda causa morte em todo o mundo. Câncer de pulmão, próstata, colo retal, estômago e fígado são os tipos mais comuns nos homens, enquanto nas mulheres os mais comuns são câncer de mama, colo retal, pulmão, colo do útero e tireoide (2).

A GLOBOCAN, Global Câncer Observatory 2018, apresentou em seu relatório do ano de 2018, estimativas de 18,1 milhões de novos casos de câncer (dados ainda não consolidados) (3).

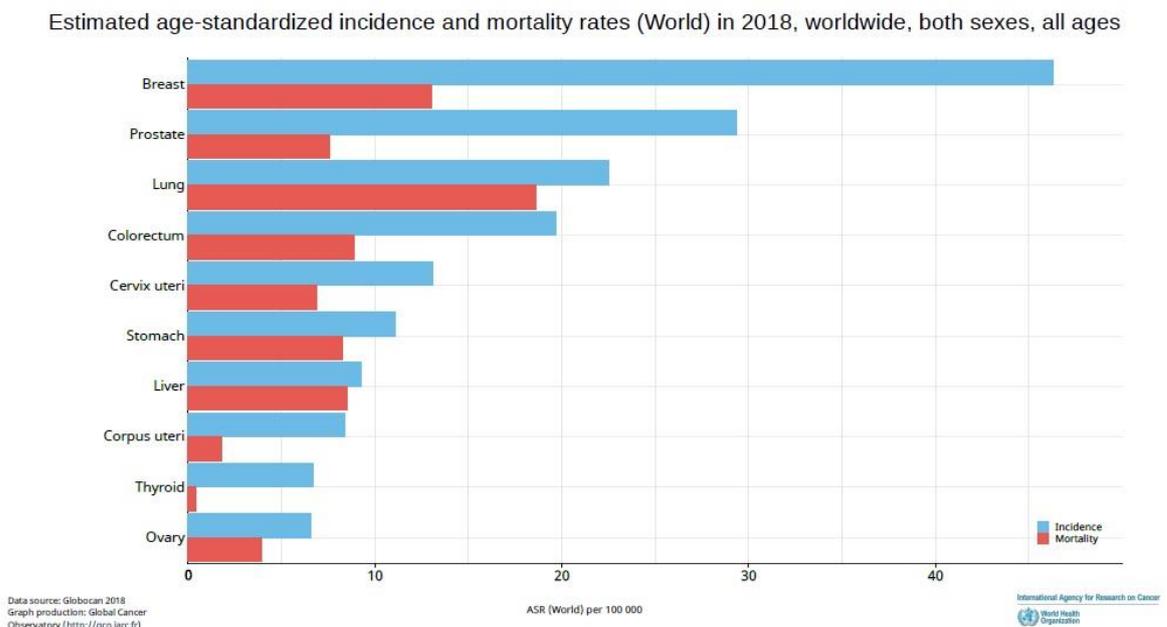


Figura 1: Dados estimados de Incidência e mortalidade do Câncer para ambos os sexos em todas as idades. Fonte: WHO – World Health Organization, 2019). Link online: <https://gco.iarc.fr/today>.

Segundo o INCA (*Instituto Nacional de Câncer*), no Brasil em 2017, a mortalidade atribuída ao câncer para todos os sexos, superou 200 mil casos. As estimativas de novos casos para o ano de 2020 foram ainda maiores, como descritos na tabela abaixo (Figura 2) que indica os números esperados conforme a localização do tumor e sexo (4).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma*

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%	Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%	Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%	Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%	Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%	Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%	Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2: INCA, distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma (números arredondados para múltiplos de 10). (Fonte: INCA - Instituto Nacional do Câncer, 2020). Link online: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>.

1.2. Câncer de próstata

A próstata é uma pequena glândula localizada na pelve masculina, com peso normal aproximado de 20g (Figura 3). É uma glândula acessória do aparelho reprodutor masculino e a sua presença é universal entre os mamíferos (5). Ela é responsável pela produção de aproximadamente 50% dos fluídos que constituem o sêmen, e nela se armazena o líquido prostático, eliminado juntamente com os demais componentes do sêmen durante a ejaculação. Esse líquido contribui com o aumento da motilidade e fertilidade dos espermatozoides e na neutralização da acidez da vagina, conferindo proteção e nutrientes fundamentais à sobrevivência dos espermatozoides, assumindo assim um papel eminente no processo da fertilização. Além disso, a próstata é muito importante na prática urológica, já que é sede de vários processos que causam transtornos a pacientes de idades variadas (6).

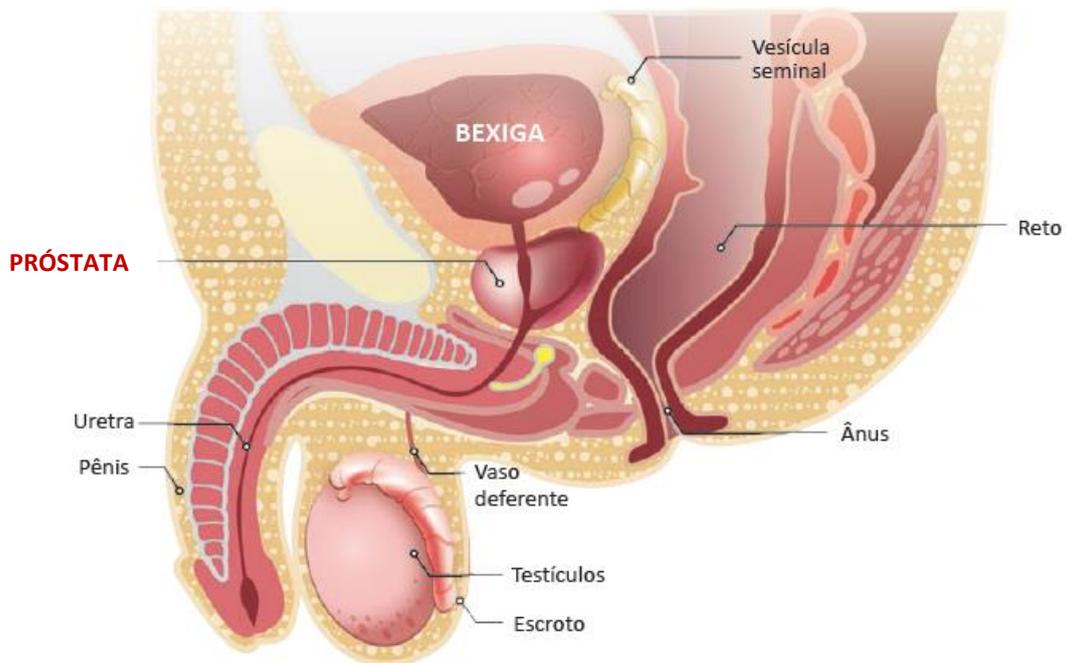


Figura 3: Ilustração representativa do sistema reprodutor masculino, evidenciando a localização da glândula prostática. Fonte Adaptada: brazilhealth.com/Visualizar/Artigo/114/Cancer-de-Prostata?AspxAutoDetectCookieSupport=1

O Carcinoma prostático é uma das mais importantes doenças malignas diagnosticadas nos homens sendo o segundo mais frequente neste gênero, em todo o mundo. A OMS (Figura 4) estima cerca de 1.3 milhões de novos casos desta doença ao redor do mundo, até o ano de 2040 (4).

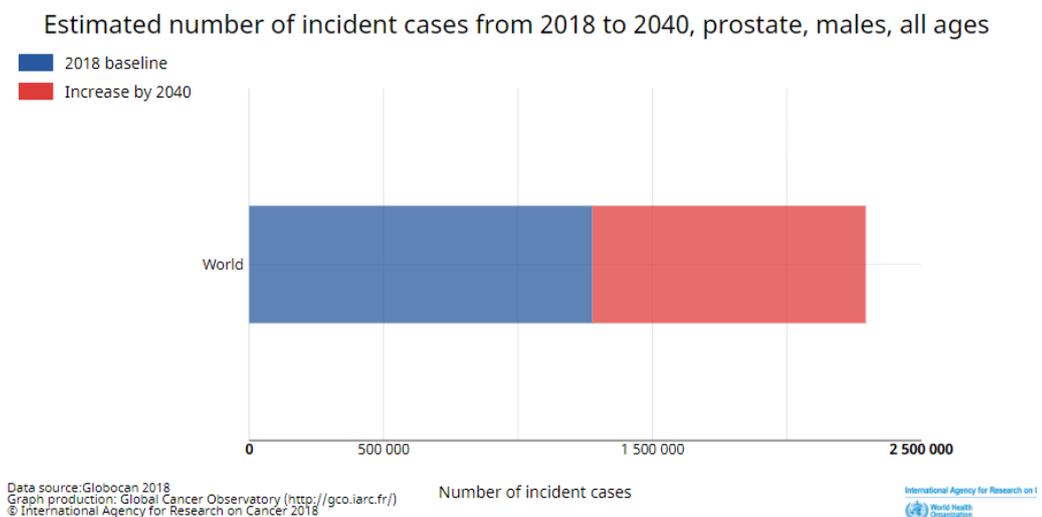


Figura 4: Número estimado do aumento da incidência de casos de Câncer de Próstata até o ano de 2040. Fonte: gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-bar?

De acordo com esta mesma agência, o Câncer de Próstata (CaP) é a neoplasia maligna mais frequente nos homens e o segundo maior causador de mortes no Brasil (4). Entretanto, o número de mortes por câncer de próstata vem diminuindo em alguns países incluindo os da América do norte, Oceania, Norte e oeste da Europa (6,7), isto está associado ao diagnóstico precoce e tratamentos apropriados, resultando em um genuíno adiamento da morte de alguns homens com a doença metastática, além de alterações na atribuição da causa da morte. Em contraste, as crescentes taxas de mortalidade em outras regiões como a América Central e do Sul, a Ásia, e países da Europa Central e Oriental, pode refletir uma mudança na distribuição dos fatores de risco, associados a um acesso limitado ao tratamento eficaz (6,8).

Este tipo de câncer, raramente, produz sintomas até que se encontre em sua forma avançada (9) prejudicando o diagnóstico precoce da doença, que muitas vezes acontece quando o câncer prostático já se disseminou para outros órgãos. Por sua vez, este cenário também dificulta a escolha e as opções de tratamento (10). Entretanto, quando a doença é detectada precocemente, por exames clínicos e laboratoriais de rotina como, por exemplo, o toque retal e a dosagem do antígeno prostático específico (PSA), a patologia é curável em 80% dos casos (9). Comumente, o CaP é diagnosticado em homens a partir dos 50 anos de idade. A metástase é o principal fator primário para a mortalidade no Câncer prostático (11). Os procedimentos empregados no tratamento desta doença vão desde a radioterapia à orquiectomia, sendo o método mais efetivo quando empregado em seu estágio inicial, o que torna a descoberta precoce essencial para a erradicação do tumor. Portanto, os meios para impedir a progressão do CaP e realizar as intervenções necessárias antes que este se metastize para outros órgãos continua sendo um grande desafio clínico (12).

A origem do CaP ainda é desconhecida, mas presume-se que vários componentes possam influenciar seu desenvolvimento, dentre os quais se destacam fatores genéticos, hormonais, dieta alimentar, além de fatores ambientais. O tratamento do câncer de próstata é muito controverso, pois existem muitas variáveis, como a idade do paciente, níveis de PSA e o estágio do tumor. Pacientes em condições inoperáveis devido à idade são tratados com terapia hormonal ou radiação. A terapia hormonal mais comum para o câncer de próstata é a privação androgênica, uma vez que a próstata é uma glândula altamente dependente de

andrógeno e a maioria dos tumores de próstata origina-se das células epiteliais glandulares dependentes de andrógenos da região periférica da próstata (13).

O microambiente tumoral é um nicho que consiste em vários tipos celulares, de uma matriz extracelular além de outros elementos produzidos e secretados pelos componentes celulares. Basicamente este microambiente é formado pelas células tumorais propriamente ditas e células hospedeiras, ou do estroma, das quais pode-se destacar os fibroblastos associados ao tumor (CAFs), os miofibroblastos, células do sistema imune como macrófagos associados ao tumor (TAMs), linfócitos, mastócitos, células endoteliais, pericitos e células musculares lisas que estão altamente conectados com a finalidade de proporcionar um ambiente propício para o crescimento e até mesmo a disseminação do tumor. A comunicação entre estas células resulta numa evolução muito orquestrada do neoplasma (14).

1.3. Matriz Extracelular

A matriz extracelular (MEC) é uma rede composta por quatro grandes classes de macromoléculas: colágenos, proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas adesivas (15), formando um sistema físico para a sustentação da estrutura da base tecidual, determinando a hidratação e conseqüentemente o volume do tecido, criando espaços para o transporte de moléculas, organização dinâmica e resistência às forças de compressão. O padrão de comportamento celular, tais como crescimento, morte, diferenciação e motilidade, é determinado pela interação entre as células e a MEC. Esta relação também reflete suma importância em diversos mecanismos, como morfogênese, inflamação, resposta imune, invasão parasitária, transformação celular e metástase (16).

A comunicação de células tumorais com a membrana basal (MB) e a MEC no processo de invasão tumoral pode ser dividida em três etapas: 1 – Degradação da MEC por enzimas secretadas pelas células tumorais: metaloproteinases, collagenases, plasmina, catepsinas, glicosidases e heparanases. Tais enzimas estão associadas à invasão, pois levam à desorganização e à fragmentação dos componentes do estroma e da membrana basal; 2 – Adesão da célula tumoral via receptores específicos da superfície celular, que geralmente interagem com componentes da MEC; 3 – Locomoção da célula tumoral na região da MEC previamente degradada pelas enzimas (17,18).

Envolvidas nestes processos estão as metaloproteinases de matriz (MMPs), que são enzimas com atividade proteolítica e diferem entre si estruturalmente e por sua habilidade em degradar um grupo particular de proteínas da MEC, sendo que, juntas, podem degradar todos os seus componentes proteicos. Essas enzimas têm sido associadas ao desenvolvimento de invasão e metástase neoplásicas. As MMPs dos tipos 2 (MMP-2) e 9 (MMP-9), apresentam capacidade peculiar de degradar o colágeno IV que compõe a lâmina basal, sendo por isso provavelmente relevantes na aquisição do fenótipo invasivo das neoplasias malignas (19).

Outra proteína considerada foi o Fator Indutor de Apoptose (AIF), que é responsável por desencadear a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA celular, a fim de induzir a morte celular programada. O processo que desencadeia a apoptose começa quando a mitocôndria libera AIF, que sai pela membrana mitocondrial, entra no citosol e finalmente termina no núcleo da célula, onde sinaliza a célula para condensar seus cromossomos e fragmentar suas moléculas de DNA preparando-se para o processo de apoptose (20). O AIF é uma proteína que participa de várias formas de morte celular apoptótica, onde a membrana externa mitocondrial se torna parcialmente permeável às proteínas e a AIF é liberada do espaço intermembranar para o citoplasma e núcleo (21,22).

Por fim, destacamos também a actina, que se trata de uma proteína que constitui cerca de 50% da proteína celular total. Os filamentos de actina podem formar estruturas estáveis e fracas, são componentes cruciais dos microvilos e do aparelho contrátil das células musculares. Pelo menos seis tipos de actina estão presentes nos tecidos de mamíferos e se dividem em três classes, sendo a expressão da α -actina limitada a tipos de musculares, enquanto a β -actina e a γ -actina são os principais constituintes dos filamentos em outros tecidos. Elas são membros da família GTPase e regulam a organização do citoesqueleto de Actina (23). A β -actina participa de vários eventos celulares, sendo relacionada à motilidade celular, alterações morfológicas, polaridade celular e regulação transcricional. Guettler et al (24) demonstrou que a β -actina tem ligações com a regulação e transferência núcleo-citoplasmática de p53, um gene supressor de células cancerígenas. Outros estudos sugerem que a polimerização negativa da β -actina regula a importação de p53 (25), demonstrando que a β -actina citoesquelética pode ser um regulador no processo de tumorigênese.

1.4. Heparanase

Heparanase (HPSE) é uma endo-beta-D-glucuronidase, é a mais conhecida molécula relacionada à clivagem das moléculas de heparina bem como o heparan de sulfato (HS) da superfície e matriz extracelular (MEC) (18,25-28). Esta molécula é capaz de vencer as barreiras da MEC e MB liberando citocinas (IL-6), fator básico de crescimento fibroblástico (bFGF) e fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), facilitando a migração e a inflamação das células tumorais e induzindo a assim formação de novos vasos (angiogênese) e facilitando o processo metastático (25).

Existem três formas de processamento alternativo que transcrevem três diferentes mRNAs, que por sua vez codificam proteínas de 480, 534 e 592 aminoácidos para diferentes isoformas de HPSE (HPSE1, HPSE2 e HPSE3). Os três isômeros são proteínas intracelulares associadas à membrana. A HPSE1 é expressa em células normais, como células endoteliais, queratinócitos, plaquetas, mastócitos, neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e B e nos tumores malignos, como linfomas, melanoma e carcinomas (29).

O gene HPSE1 humano contém 14 exons e 13 introns. Está localizado no cromossomo 4q21.3 sendo expresso pelo processamento alternativo de dois mRNA ambos contendo a mesma estrutura. Curiosamente a HPSE2 compartilha aproximadamente 40% de similaridades com HPSE1, mas não exerce a mesma atividade enzimática. A HPSE1 ativa, pode ter várias localidades na célula: ela pode ser secretada, ancorada na superfície do exossoma, pode estar inclusa no autofagossomo ou pode ser transportada para núcleo, onde sua atividade ainda é desconhecida (30).

A HPSE1 tem se estabelecido como uma enzima vital e um potencial marcador biológico. Após o ano 2000, ela tem sido alvo da atenção de estudos em todo mundo e é progressivamente relacionada como contribuinte chave na invasão e metástase de carcinomas. Numerosos estudos indicam que a HPSE1 se mostra superexpressa em tumores humanos. Um papel pró-metastático e pó-angiogênico vem sendo estabelecido, correlacionando altos níveis de HPSE1 à linfonodos e metástases (31).

A forma de atuação da HPSE1 no câncer se dá pela formação de oligossacarídeos resultantes de sua atividade ao clivar as cadeias de heparan de

sulfado (HS). A HPSE1 degrada o Sindecana de superfície celular e os Perlecanos da MB. Estes, em mamíferos, têm relação com o desenvolvimento tumoral na dependência de sua degradação pela HPSE1. Sendo assim, o papel biológico desta enzima trata-se por facilitar o processo de invasividade das células tumorais através da degradação da membrana basal vascular e da MEC pela HPSE1 sintetizada nas células tumorais (18). Esta relação entre HPSE1, o crescimento celular e metástase tem sido referida em uma numerosa variedade de tipos tumorais (33), essa correlação tem sido observada em linhagens e tecidos celulares derivados de tumores humanos, incluindo os da bexiga, pâncreas, colo do útero, ovário, endométrio, próstata, tireoide, fígado, esôfago, estômago, cavidade oral, vesícula biliar, nasofaringe, cérebro, glândula salivar e no mieloma múltiplo e leucemia mieloide aguda (34). Além disso, vários estudos mostram que o aumento da expressão da HPSE1 se correlaciona com um tempo de sobrevida pós-operatório reduzido de pacientes com câncer (31,34).

A indução da HPSE1 em malignidades humanas, assim como em outras patologias como cirrose, nefroses e diabetes (33,35) implica que a enzima pode servir como um válido marcador para desenvolvimento e diagnóstico da doença e, possivelmente, para seu tratamento eficiente (37).

Em estudos clínicos, significativos níveis de HPSE1 foram encontrados no plasma de pacientes de câncer pediátrico. No entanto poucos casos exibiram altos níveis de HPSE1 que reduziram após o tratamento, mas ainda mantendo níveis relativamente altos. Relevantemente, os níveis de HPSE1 no plasma refletem de perto o status dos pacientes após o tratamento anticâncer, sendo que os níveis desta proteína foram acentuadamente reduzidos na maioria dos pacientes em remissão, mas permaneceram estáveis ou levemente elevados nos pacientes que responderam mal ao tratamento, sugerindo que a HPSE1 plasmática se origina principalmente de células tumorais. Foram detectados também, elevados níveis desta enzima na urina e no plasma de pacientes com doença metastática agressiva (37).

Como anteriormente citado, a alta concentração da HPSE1 tem sido documentada e associada a um crescente número de casos de tumores primários, correlacionada com alteração local ou metastática (29,34,39-42), com o aumento da densidade de micro vasos e reduzida sobrevivência pós-operatória em pacientes com câncer (31,34,39,42). Coletivamente, estes estudos provêm interessantes

evidências para a relevância clínica desta molécula, tornando-a um atrativo alvo para o desenvolvimento de drogas anticâncer (37).

Porém, apesar da função e envolvimento da HPSE1 no desenvolvimento de tumores e metástases estar sendo detalhadamente estudada, muitas perspectivas a respeito da HPSE1 ainda precisam ser exploradas.

A pesquisa acerca de suas novas funções por exemplo, ainda é incipiente. Considerando tais aplicabilidades, está claro que inúmeras novas formas de terapia manipulando a HPSE1 poderão ser desenvolvidas como a efetivação de sua inibição, que pode ser empregada considerando seu papel no crescimento do câncer e outros processos fisiopatológicos, incluindo formação de granulação, inflamação e artrite reumatoide. Sendo assim, os inibidores da HPSE1 seriam medicamentos promissores que poderiam ajudar pacientes que sofrem de outras doenças além dos carcinomas (43).

A motivação deste estudo ampara-se no crescente interesse pela compreensão do desenvolvimento de doenças que acometem a próstata, dada sua importância na função reprodutiva masculina, principalmente associadas ao envelhecimento e variações hormonais decorrentes da intervenção e tratamento. Se mostra relevante a investigação da participação da HPSE1 nos processos de invasão tumoral para o desenvolvimento e progressão do CaP, e ao estabelecê-la como possível marcador tumoral, buscar possíveis ferramentas para a contenção do tumor primário bem como novas estratégias para o tratamento deste neoplasma.

2. OBJETIVOS GERAIS

Este estudo teve por objetivo a partir do silenciamento por shRNA da HPSE1 na linhagem tumoral prostática PC3, avaliar seu papel no processo de proliferação e migração tumoral *in vitro* do câncer de próstata.

2.1. Objetivos Específicos

- I. Bloquear a expressão da HPSE1 por silenciamento estável por shRNA
- II. Verificar os níveis expressos pela HPSE1 na linhagem epitelial tumoral prostática PC3 e suas sub-linhagens (HPSE-x) por RT q-PCR e Western Blotting.
- III. Correlacionar dados de expressão da HPSE-1 aos eventos de proliferação e migração.

3. MÉTODO

3.1. Cultura de Célula 2D

Células obtidas de biópsia e estabelecidas comercialmente em linhagens primárias e imortalizadas, podem ser mantidas em cultura por um longo período e ainda guardarem características do tecido original. Neste estudo *in vitro* do CaP já foram descritas 21 linhagens celulares, sendo 3 destas amplamente usadas, tais células são conhecidas como PC3, LNCaP e DU145 (44,45). Neste trabalho utilizamos a linhagem PC3 ([ATCC® CRL-1435](https://atcc.org/cell-lines/PC3)) que se trata de uma célula humana andrógeno independente, derivada de uma metástase óssea de grau IV de adenocarcinoma prostático. A linhagem celular PC3 foi estabelecida em 1979, a partir de metástase óssea de grau IV de CP em homem branco de 62 anos, desde então, há a mais de 40 tem se mostrado uma poderosa ferramenta na pesquisa do câncer de próstata (46,47). A linhagem PC3 é originária do centro global de biorrecursos (BRC) ATCC (www.atcc.org/). Estas células não respondem aos andrógenos, glicocorticoides ou fatores de crescimento de fibroblastos (51). Portanto, as células PC3 são independentes de andrógeno, expressam baixos níveis da enzima 5-alfa redutase e da enzima fosfatase ácida e não expressam PSA (52). Em relação à morfologia, a partir de análise de microscopia eletrônica, as células PC3 apresentaram aspectos de adenocarcinoma pouco diferenciado com características comuns às células neoplásicas de origem epitelial, numerosas

microvilosidades, complexos juncionais, núcleos anormais e nucléolo, multi-mitocôndrias, corpos lipioidais, podendo ser multinucleadas (51).

Todas as células PC3 foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Gibco®) e suplementados com 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (Sigma), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma) e mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

3.2. Descongelamento, expansão e manutenção das linhagens celulares.

Uma vez obtidas congeladas, descreveremos as etapas de descongelamento, expansão e manutenção das mesmas em cultura 2D, processos estes que foram realizados durante a produção deste trabalho. Após retirada do nitrogênio líquido, em tubos de criogenia (NEST), o meio criogênico contendo as células foi rapidamente descongelado por incubação em banho-maria com temperatura em torno de 37°C. Em seguida a seu descongelamento este meio foi transposto para um tubo Falcon® e centrifugado a 2000xrpm por 5 minutos. Houve então a formação do *pellet* celular sendo este ressuspendido em 1 ml de seu meio de cultura apropriado, e transferido à uma garrafa de cultura de células com área de 25cm². A aderência das células viáveis foi observada entre 24 e 48h pós-descongelamento. O meio nutritivo de cada célula foi trocado a cada 48h e o plaqueamento para os experimentos ocorreu no máximo após 72h de seu descongelamento (ou sob uma confluência em torno de 80%).

Quando aderidas, as células viáveis formam uma monocamada no fundo da garrafa de cultura e ao atingirem a confluência aproximada de 80% elas são tripsinizadas. Para tanto o meio de cultura é removido e as células são lavadas com PBS (solução tamponada de fosfato) e desprendidas com Tripsina 0,25% - EDTA (Gibco). As células são incubadas em tripsina por volta de 2-3 minutos ou até seu máximo desprendimento do fundo da garrafa (observado sob microscópio de luz invertido), não ultrapassando 5 minutos. Após a perda da aderência celular, adiciona-se o dobro do volume que foi colocado de tripsina de meio nutritivo completo da linhagem, para cessar a ação enzimática da tripsina. Esta suspensão é transferida para um tubo Falcon® e levada à centrifuga a 2000xrpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida o sobrenadante é descartado e o *pellet*

formado é ressuspensionado em meio completo no volume desejado para os experimentos, manutenção e congelamento. No caso do congelamento, adiciona-se 5% de DMSO (Dimethyl sulfóxido - Sigma-Aldrich) ao volume da ressuspensão a ser congelado, a ressuspensão então pode ser transferida a tubos de criogenia e acondicionadas em Mr. Frosty (Invitrogen) no freezer a -80°C , e em seguida armazenadas no tanque de nitrogênio líquido, para manutenção do banco de células.

Todos os cuidados para manutenção da esterilidade em todos os procedimentos de cultivo celular foram seguidos rigorosamente. Para determinados ensaios o meio foi trocado por RPMI-1640 sem SFB a fim de sincronizar e melhorar o crescimento sem ancoragem. A contagem de células para todos os experimentos foi realizada manualmente utilizando-se da Câmara de Neubauer verificando o número de células viáveis pela contagem com TriplanBlue®.

3.3. Transfecção estável da linhagem PC3

A transfecção da linhagem PC3 para inibição estável e específica da proteína HPSE1 foi obtida pela transdução de um plasmídeo de shRNA-HPSE1. Neste experimento foram utilizados 2 clones de inibição específicos da HPSE1 (shHPSE1 1A e 3A, obtidos pela transformação em bactérias competentes do plasmídeo retroviral comercial oriundos da Origene sob número de catálogo TR307138) a fim de testar quais clones apresentariam o melhor grau de silenciamento desta enzima nesta linhagem tumoral em questão. Para início do ensaio, as células foram cultivadas em placas de 6 poços até atingiram aproximadamente 60% de confluência. Uma hora antes da transdução retroviral o meio foi removido e substituído por meio RPMI 1640 fresco, a solução para a transfecção foi preparada em 100 μl de meio RPMI1640 não suplementado com SFB e contendo 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do agente de transfecção Turbofectina (TurboFectin 8.0), acrescido com os plasmídeos retrovirais (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Tal solução foi então incorporada aos poços contendo as células e a placa incubada por 48h a 37°C em atmosfera contendo 5% CO_2 . Após este período, o meio foi trocado por meio RPMI1640 completo, acrescido do agente de seleção Puomicina (Invitrogen) na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Este meio foi trocado a cada 4 dias por até 15 dias consecutivos para obtenção de células transfectadas estáveis. Transcorrido este tempo, os clones estáveis se proliferaram em pequenas

colônias e estas, foram coletadas separadamente por meio de raspagem com ponteira de 200 μ L e transferidos para placa de 24 poços. Ao todo foram coletados 8 clones de células PC3shHPSE1, mas apenas 3 clones (A, B e C – Figura 5) subsistiram para sequência dos experimentos. A eficiência do silenciamento da HPSE1 foi verificada por qRT-PCR para se estabelecer o melhor clone a ser utilizado em continuação aos estudos.

3.4. Análise da expressão gênica por qRT- PCR

Esta análise foi realizada para verificar a eficiência do silenciamento gênico de HPSE1 nas linhagens celulares PC3 transfectadas, com dois diferentes clones shHPSE1(-) (1A, e 3A). Desta forma, foi possível selecionar o clone shHPSE1 (-) com melhor eficiência de silenciamento gênico e prosseguir com os demais experimentos in vitro propostos neste trabalho. O qRT-PCR é uma técnica de laboratório que permite a detecção e quantificação confiáveis de uma molécula de DNA específica. A técnica de qRT-PCR foi utilizada principalmente para quantificação absoluta e relativa da expressão gênica. Neste método, o DNA complementar (cDNA) é sintetizado a partir da sua molécula molde de mRNA ou RNA total por transcriptase reversa. O cDNA é usado como modelo para a reação de qRT-PCR. Duas técnicas comuns usadas neste método para detectar e quantificar produtos de PCR são corantes de ligação a DNA fluorescente não específicos que se intercalam no DNA de fita dupla e sondas oligonucleotídicas marcadas com fluorescência específicas de sequência. O qRT-PCR é realizado em um termociclador específico que pode iluminar cada amostra com um feixe de luz de um comprimento de onda específico e capaz de detectar a fluorescência emitida pelo fluoróforo excitado. A sequência dos primers usados nesta reação está especificada a seguir.

HPSE1 Foward	5' TGGCAAGAAGGTCTGGTTAGGAGA 3'
HPSE1 Reverse	5' GCAAAGGTGTCCGATAGCAAGGG 3'
RPS18 Foward	5' TTCGGAAGTGGAGGCCATGAT 3'
RPS18 Reverse	5' TTTCGCTCTGGTCCGTCTTG 3'

Tabela 1: Sequência dos oligos iniciadores (*Primers*) para análise por qRT-PCR.

3.4.1. Isolamento de RNA total

O RNA total foi extraído das linhagens transfectadas PC3shHPSE1 A, B e C utilizando protocolo por extração com TRIZOL (Invitrogen, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, os precipitados celulares foram incubados com 1mL de trizol (Invitrogen, EUA), e mantidos por 5 minutos em temperatura ambiente. Foi então adicionado 200µL de clorofórmio para cada tubo seguido de agitação vigorosa por 15 segundos e centrifugado a 12.000xrpm, sob uma temperatura de 4°C por 10 minutos. O RNA foi precipitado pela adição de 500µL de álcool isopropílico e mantido a temperatura de -20°C overnight. O RNA precipitado foi centrifugado a 12.000xrpm, 4 °C por 10 minutos, seguindo lavagem com 1mL de etanol 75% gelado, e centrifugado novamente a 7500xrpm, a 4 °C, por 5 minutos. O pellet foi seco em temperatura ambiente no fluxo laminar, e ressuspendido em 30µl de água livre de RNA/DNase (Sigma-Aldrich). Para evitar contaminação com DNA, as amostras foram digeridas com 1U de DNase I Amplification Grade (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) em 10XDNase I ReactionBuffer e 25 mM de EDTA pH 8.0. A concentração do RNA total foi determinada pelas absorvâncias 260/280nm em Leitor de Microplaca EPOCH 200nm-999nm (BioTek Instruments). Todos RNAs foram estocados a -80 °C até o momento de sua utilização.

3.4.2. Transcriptase reversa para a síntese de cDNA e qPCR

A síntese de cDNA foi realizada em uma única etapa, utilizando um total de 1µg de RNA, através do kit comercial Luna OneStep qPCR (Biolabs), de acordo com protocolo do fabricante. Todas as reações de qRT-PCR foram preparadas em triplicatas, num volume final de 10 µL, e analisadas pelo método de quantificação

relativa (ddCt), utilizando-se o Termociclador quantitativo 7500 Real Time PCR-System (AppliedBiosystem, EUA). O gene 18RS foi utilizado como normalizador das reações para averiguar a expressão gênica dos alvos moleculares de HPSE1 na linhagem tumoral de próstata PC3 silenciada para HPSE1 em relação a linhagem controle PC3 parental. As condições de amplificação foram padronizadas para este tipo de análise: 10 minutos a 55 °C para a ativação da enzima, 1 minuto a 95 °C para a desnaturação inicial, seguidos de 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, e 60 segundos a 60 °C para pareamento e extensão dos primers. Ao final da amplificação, uma etapa adicional de dissociação foi incluída (45 ciclos com um decréscimo de 1 °C a cada 15 segundos, iniciando-se a 95 °C) para a geração de uma curva de dissociação (curva melting) necessária para a confirmação da especificidade do produto amplificado. A partir deste experimento foi escolhido o clone com maior neutralização da HPSE1 (Figura 5) para prosseguimento dos experimentos propostos.

3.5. Ensaio de proliferação celular (por MTT)

O ensaio de MTT é baseado na capacidade das desidrogenases mitocondriais em clivarem os anéis tetrazolium do corante MTT através de enzimas oxidoreduzases dependentes de NAD(P)-H, resultando na formação de cristais azuis. Estes cristais de formazan são impermeáveis à membrana plasmática e, desta forma, se acumulam no interior de células viáveis. A adição de DMSO solubiliza as células, resultando na liberação dos cristais e, conseqüentemente, na coloração azul-arroxeadada. O número de células viáveis é diretamente proporcional aos níveis de cristais azuis formados, sendo que a coloração pode ser medida por espectrofotometria (48,49). O padrão de proliferação celular da linhagem PC3 e sua sub linhagem PC3shHPSE foi avaliado pelo ensaio de MTT (3-[4,5 - Dimethylthiazol - 2 yl] 2,5- diphenyltetrazolium bromide, thiazolyl blue). Para tal, as células foram plaqueadas na concentração de 3x10⁵ células por well, em placa de 96-wells e cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Após 24 horas, estas células foram cultivadas por 48 horas adicionais na ausência de soro fetal bovino (FBS) para promoção do sincronismo celular. Transcorrido o período de tratamento (24, 48, 72h) com a reexposição a 5 e 10% FBS, foi adicionado 100 µL de MTT (5mg/mL) e mantido por um período de 3h adicionais. Após este período a solução

de MTT foi removida e as células solubilizadas em 100 μ L de DMSO e homogeneizadas por 15min no escuro sob agitação branda. Em sequência, a absorbância foi lida em comprimento de onda de 570nm em leitor de microplacas (Microplate Spectrophotometer Model Epoch, Bio-Tek Instruments, Inc). As taxas de proliferação da linhagem PC3 com a sublinhagem PC3shHPSE foram comparadas por meio do software Graph Pad Prism v.8.

3.6. Imunolocalização da HPSE1

Para o ensaio de imunolocalização da HPSE1 as células PC3 e PC3shHPSE foram plaqueadas na quantidade de 104 células sobre lamínulas de vidro de 15mm de diâmetro em placas de 24 poços. Após 24h de plaqueamento o meio nutritivo foi trocado para meio sem SFB por outras 24h. Decorrido este tempo, foi adicionado meio com SFB a 0,5% e no quarto dia as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos. Depois de fixadas as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas por 1 hora em uma solução contendo BSA 3% Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich) em TBS-T para bloqueio das proteínas não específicas. Após o período de bloqueio foi adicionado o anticorpo primário HPA-1 Anti-mouse E-10 (Santa Cruz Biotechnology®) diluído 1:250 em BSA 3% pelo e incubado por um período adicional de 3h, com exceção de uma lamínula que funcionou como controle negativo da reação. Em seguida os poços foram lavados várias vezes com TBS-T e incubados com o anticorpo secundário anti-mouse - Cy2® (Goat Anti-Mouse IgG H&L - Invitrogen) na diluição de 1:250 e DAPI diluído 1:1000 e as células foram incubadas nesta solução por 1h na protegidas de luz. Seguido este passo, as células foram novamente lavadas em TBS-T e montadas em lâminas de vidro com as células das lamínulas voltadas para solução de 70% glicerina em TBS-T. As lâminas foram armazenadas na ausência de luz e submetidas à captura das imagens fluorescentes em microscópio de fluorescência (LEICA), no laboratório de Regeneração Nervosa do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob coordenação do Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira.

3.7. Migração Celular (*Scratch Assay*)

A migração celular é definida como o movimento real de células individuais, folhas de células e clusters de um local para outro. A "mobilidade das células" tardia é frequentemente usada de forma intercambiável, mas pode implicar tecnicamente por um movimento menos coordenado e intencional das células. Dois tipos principais de migração celular foram identificados: migração de célula única e migração celular coletiva. Dependendo do tipo de célula, estrutura citoesquelética e do contexto em que está migrando, a célula pode migrar em diferentes variantes morfológicas, como modos mesenquimais e de mobilidade ameboide (50). Uma célula ou grupo de células migra de uma área para outra, geralmente em resposta a um sinal químico. Durante a metástase tumoral, as células migram do tumor primário para o sistema circulatório e, em seguida, para outro local. O método Scratch assay, ou ensaio de ranhura, baseia-se na criação de um espaço artificial em uma cultura celular em monocamada confluyente irá promover a migração das células presentes na borda deste espaço em direção ao mesmo, a fim de fechá-lo.

Para o ensaio de migração celular, as linhagens PC3 e PC3shHPSE foram contadas e plaqueadas a 5×10^4 em placas de 12 poços. Quando a monocamada de células atingiu 90-95% de confluência, isso se deu entre 24 à 48h pós-preparação, foi feito um risco longitudinal no centro do poço usando pipeta de 200 μ l, em seguida os poços foram lavados com PBS para retirada de possíveis células em suspensão e foi adicionado meio a 0,5% SFB. A migração das células para o preenchimento do espaço gerado pela ranhura vertical foi observado e os poços foram foto-documentados no momento do ranhura (tempo 0h) e após 24 e 48h pela câmera acoplada ao microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS100) utilizando o software Motic Image Plus 2.0. A observação das fotos foi feita para verificação da área livre de um lado ao outro da fenda. A migração foi avaliada pela área ocupada pelas células em migração, comparando o comportamento das linhagens em questão nos tempos propostos. Para a análise da área das fotos foi utilizado o software Motic Image Plus 2.0 na escala em mm².

3.8. Western Blotting

A técnica de Western Blotting (WB) é frequentemente usada em pesquisas para separar e identificar proteínas. Nesta técnica, uma mistura de proteínas é separada com base no peso molecular e, portanto, por tipo, através da eletroforese em gel. Estes resultados são então transferidos para uma membrana que produz uma banda para cada proteína. A membrana é então incubada com anticorpos marcadores específicos para a proteína de interesse (53). Para tanto, células PC3 e PC3shHPSE foram cultivadas em meio completo, carenciadas como nos procedimentos anteriores já descritos e ao atingirem aproximadamente 80% de confluência foram submetidas a 0,5% de SFB nas 24h que antecederam ao procedimento de extração de proteína. As células foram tripsinizadas, como descrito anteriormente, e o *pellet* formado foi lavado em solução salina estéril (PBS), e depois ressuspensionado em solução de extração de proteínas RIPA contendo: 150mM de NaCl, 0,5% de Triton X-100, 0,5mg de EDTA/ml e 10 μ L/ml de coquetel inibidor de proteases (cat. P-8340 – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). A ressuspensão celular ficou incubada em gelo por 2 horas totais sendo homogeneizada vigorosamente por pipetagem a cada 60 minutos. Decorrido o tempo a ressuspensão foi centrifugada a 10.000xg por 10 minutos a 4°C e quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Biorad, Hercules, CA, USA). As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-PAGE a 10% de acrilamida, após fervura a 95°C por 5 minutos em tampão de amostra com agente redutor. Para quantificação do conteúdo de HPSE1 foi utilizado o procedimento de imunoblotting. Após eletroforese de 30 μ g de proteínas totais num gel de separação com 10% de poli-acrilamida, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose (Biorad) sob corrente constante de 400mA por 7 minutos (Trans-Blot Turbo Transfer System - Biorad). A qualidade da transferência de proteínas foi analisada pela coloração da membrana com Ponceau 0,5% em ácido acético 1% por 5 minutos e foto documentada. A membrana foi bloqueada em RapidBlock™ Solution 10X (Amresco) diluído 1:9 em TBS-t [1x] por 5 minutos sob agitação à temperatura ambiente e em seguida incubada overnight a 4°C em Rapid Block 1:9 em TBS-T acrescido do anticorpo primário. Após lavagem com TBS-T, a membrana foi incubada com anticorpo secundário correspondente ao anticorpo primário utilizado (Quadro 1). Após nova série de lavagens, a atividade peroxidásica foi

revelada através de sistema ECL (Santa Cruz Biotech.), expondo a membrana ao sistema G-Box (Syngene). A intensidade de marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria das bandas obtidas, utilizando o programa GeneTools (Syngene). Paralelamente foi utilizado um controle de carregamento GAPDH e Actina.

<u>Anticorpo Primário</u>	<u>Diluição</u>	<u>Anticorpo Secundário</u>	<u>Diluição</u>
HPSE1 (Bioss) Bs-1541R	1:500	Anti-rabbit HRP (Bioss, Inc)	1:1000
AIF (SCBT) Sc-131116	1:500	Anti-mouse HRP (Imuny, SP, Brazil)	1:1000
GAPDH (SCBT) Sc-25778	1:500	Anti-rabbit HRP (Bioss, Inc)	1:1000
B-actin Sc-47778	1:500	Anti-mouse HRP (Imuny, SP, Brazil)	1:1000
MMP-2 Sc-13595	1:500	Anti-mouse HRP (Imuny, SP, Brazil)	1:1000
MMP-9 Sc-13520	1:500	Anti-mouse HRP (Imuny, SP, Brazil)	1:1000

Tabela 2: Lista dos Anticorpos Primários e Secundários utilizados na técnica *Western Blotting*.

3.9. Análise estatística

Todos os experimentos *in vitro* deste estudo foram realizados em triplicata experimental e foram elaboradas planilhas de dados utilizando o programa Microsoft Excel 2010, para os cálculos de média, erro-padrão da média (EPM) e porcentagem. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *GraphPad Prisma®* Versão 5.00.

4. RESULTADOS

4.1. A HPSE1 teve seus níveis diminuídos após a transfecção estável por plasmídeo contendo shRNA

Através deste experimento obtivemos 3 clones shHPSE1 A, B e C (Figura: 4), onde observamos um silenciamento da HPSE1 no clone PC3shHPSE A de 21,46%, em PC3shHPSE B 77,27% e em PC3shHPSE C a diminuição de 83,57% de expressão de HPSE1 com relação ao parental PC3.

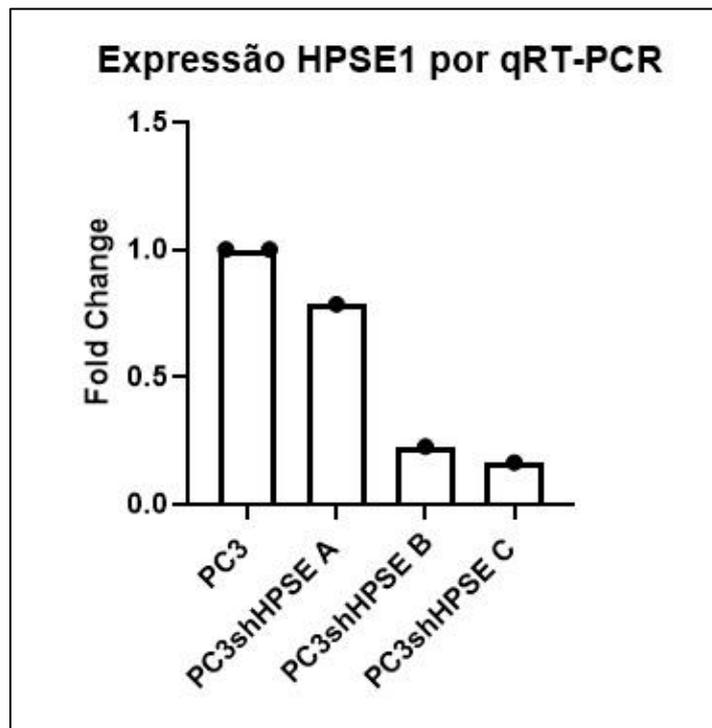


Figura 5: Gráfico representativo da expressão de HPSE1 através de análise de RNA por qRT-PCR onde os clones **PC3shHPSE A, B e C** apresentam menor expressão da HPSE quando comparados ao parental PC3.

A linhagem PC3shHPSE C foi escolhida para dar continuidade aos experimentos por apresentar maior redução da expressão de HPSE1, demonstrando silenciamento em torno de 83% (experimento realizado na passagem 12) em relação à célula parental. Durante nosso estudo, as linhagens foram replicadas algumas vezes, sendo assim, para assegurar a manutenção de sua transfecção, outro qRT-PCR foi feito ao final do estudo demonstrando que a célula silenciada manteve sua

transfecção para HPSE1 em 68% (ensaio realizado com o clone na passagem 25) (Figura 6).

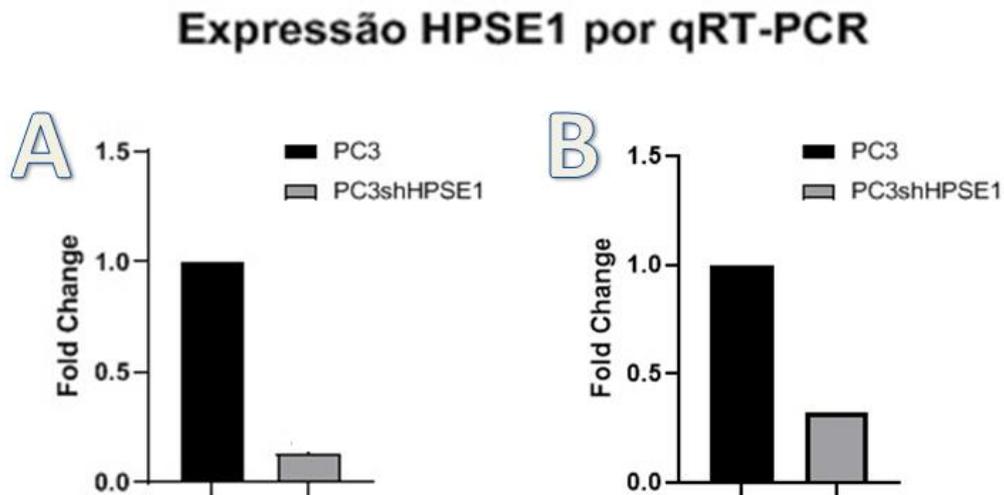


Figura 6: Modulação da expressão da HPSE1 nas células da linhagem PC3 confirmada por real time PCR. A sub-linhagens shHPSE demonstrou a expressão da HPSE1 diminuída em resposta a inibição com shRNA (“short hairpin” RNA). A linhagem parental PC3 foi utilizada como grupo de referência. O Gráfico (A) apresenta a modulação de HPSE1 da linhagem PC3 e PC3shHPSE em passagem 15 e 12, enquanto o gráfico (B) as passagens são 29 e 25, respectivamente.

4.2. Os níveis diminuídos de HPSE1 refletem na mudança fenotípica da sub linhagem obtida após a transfecção

Em análise, nossa amostra (Figura 7 – A) demonstra crescimento em monocamadas onde é possível notar em sua maioria o formato alongado e poligonal, nucléolos abundantes e de aspecto granular, presença de células gigantes e multinucleadas. Tais aspectos ficam mais evidentes quando observados em células coradas (Figura 8). Por sua vez, o clone PC3shHPSE, obtido por transfecção estável para silenciamento gênico da proteína HPSE1, apresentou ligeira dessemelhança de morfologia em relação à célula parental PC3. A célula transfectada demonstrou (Figura 7 – B) formato menos alongado e mais cúbico sendo ainda poligonal, nucléolos abundantes e menor presença de células gigantes multinucleadas presentes na linhagem parental.

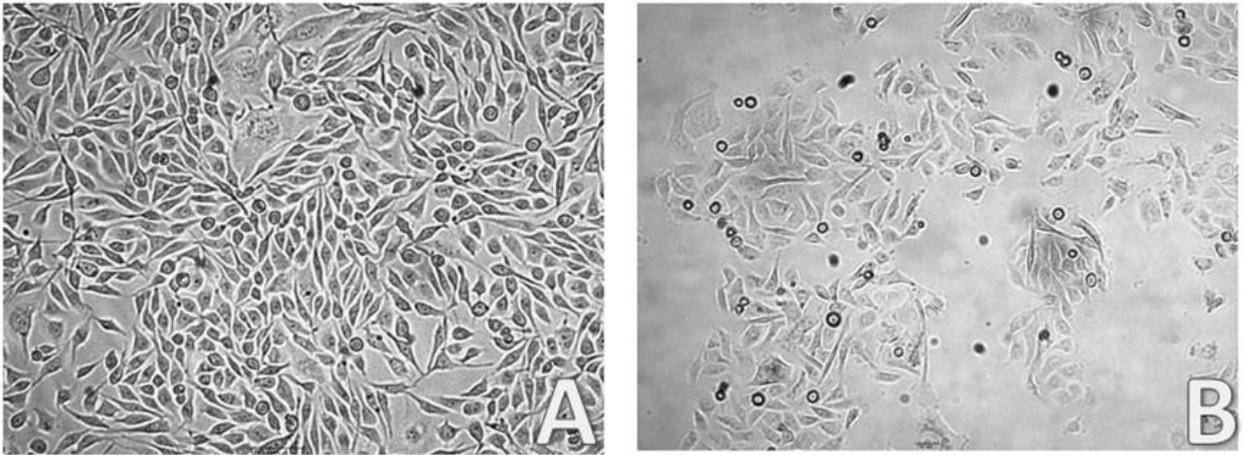


Figura 7: Imagem por microscopia de contraste de fase da linhagem PC3 (A) e do clone PC3shHPSE1(B), foram foto documentadas em microscópio invertido *Motic* (Nikon, Eclipse TS100), aumento 100X. Fonte: autoria própria, LBMCC.

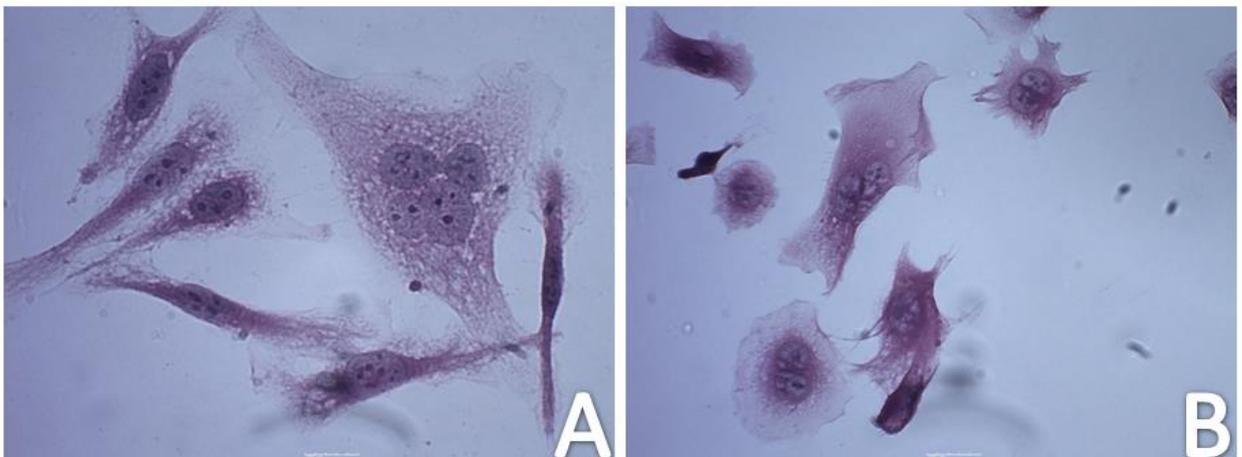


Figura 8: Células PC3 (A) e PC3shHPSE1 (B) coradas por H&E e foto documentadas em microscópio invertido *Motic* (Nikon, Eclipse TX100), aumento 400X. Células com a inibição estável em B possuem o formato mais espreado em relação ao formato fibroblástico, gigantes e multinucleadas observadas em A.

4.3. A taxa de proliferação celular na sub linhagem com inibição estável se mostra diminuída

A progressão de uma cultura celular é determinada pela análise de sua curva de crescimento. Uma vez determinada, a curva fornece dados de uma específica linhagem que serão utilizados para determinar sua densidade e seu “doubling time”. Em relação à curva de crescimento realizada (Figura 9), as células foram plaqueadas em triplicata na quantidade de $0,2 \times 10^5$ em placas de 24 wells. Seu crescimento foi acompanhado por 24, 48 e 72 horas quando foram tripsinizadas e

contadas. Pudemos observar que as linhagens parental e silenciada tiveram seu crescimento equivalente nas primeiras 24 horas e começam a diferenciar seu comportamento a partir de então. A célula parental PC3 apresenta crescimento mais acelerado em relação à silenciada PC3shHPSE, atingindo crescimento 20x vezes maior após 72 horas quando alcançou a quantidade de 4×10^5 células.

Curva de Crescimento

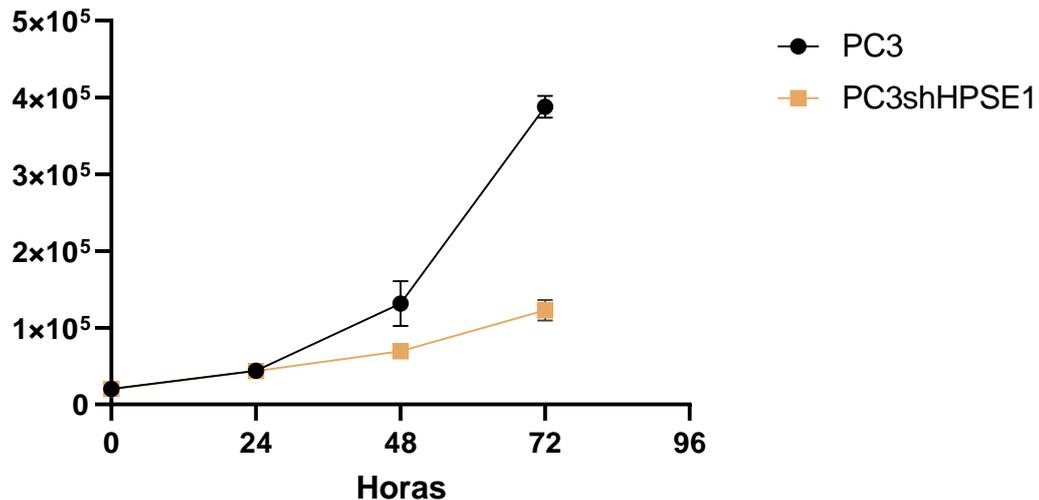


Figura 9: Curva de crescimento celular obtida em dias consecutivos de expansão da linhagem PC3 e PC3shHPSE, para determinação do perfil de crescimento de cada linhagem e para verificação de sua densidade de plaqueamento para os experimentos propostos. A linhagem parental PC3 apresenta crescimento 4 vezes superior ao crescimento de seu clone PC3shHPSE ao final das 72h. $n=6$ $p=0.05$

4.4. A sub linhagem com inibição estável da HPSE1 apresenta uma menor viabilidade celular

O resultado deste experimento mostrou diferença significativa no perfil proliferativo da sub linhagem PC3shHPSE1 quando comparado ao grupo controle não transfectado. A proliferação da sub linhagem PC3shHPSE1 demonstra diminuição de sua capacidade em torno de 40% a partir das 24h após o plaqueamento. Esta diferença aumenta com a progressão do tempo chegando a 60% em 48h e 118% inferior em 72h comparado ao valor apresentado pela PC3.

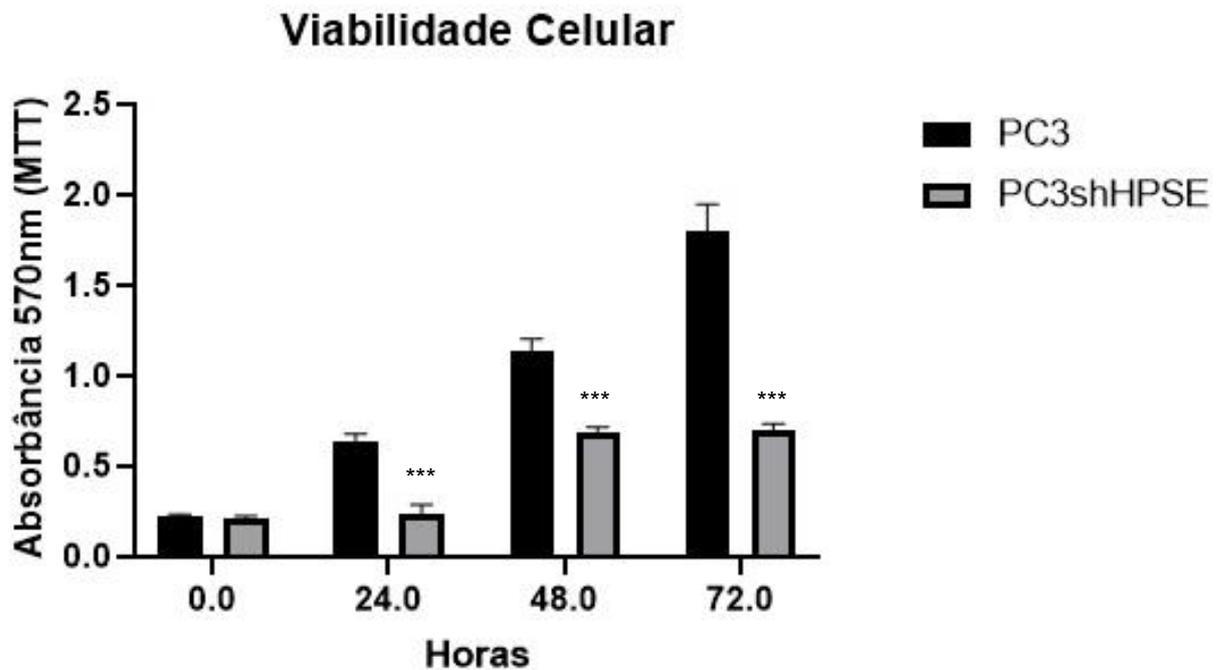


Figura 10: O gráfico compila a análise de triplicata experimental do teste MTT, realizadas em quadruplicata amostral por 24, 48 e 72 horas. A linhagem PC3shHPSE apresentou crescimento inferior nos tempos analisados 24, 48 e 72 horas apresentando diferença de crescimento em torno de 25%, 36% e 118% respectivamente em relação a parental PC3. $n=5$ *** $p=0.001$.

4.5. A Imunolocalização da HPSE1 na sub linhagem shRNA se mostra concentrada no núcleo celular

Neste ensaio, através do uso de fluorocromos, observa-se maior concentração citoplasmática de HPSE1 nas células parentais (Figura 11: A-B) e considerável diminuição de 85% desta proteína na sub linhagem PC3shHPSE1 (Figura 11: C-D).

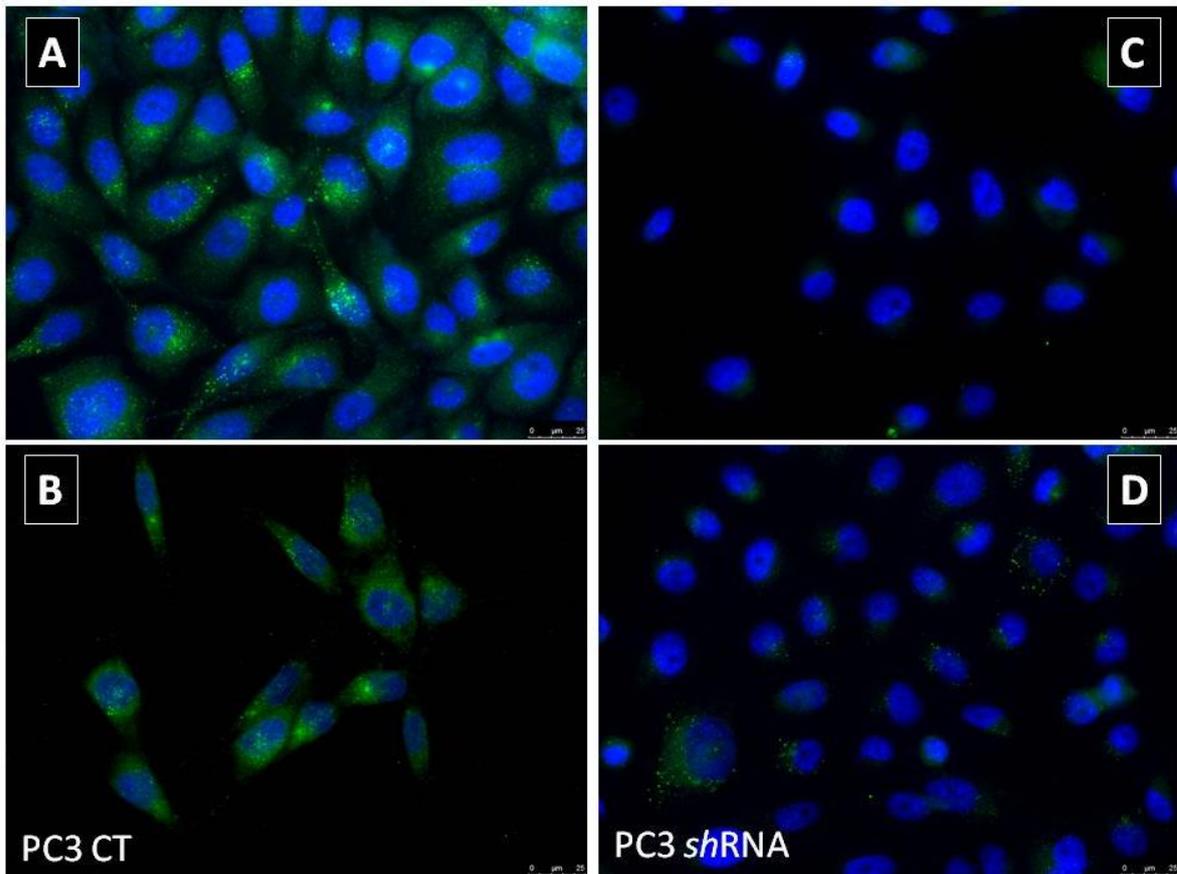
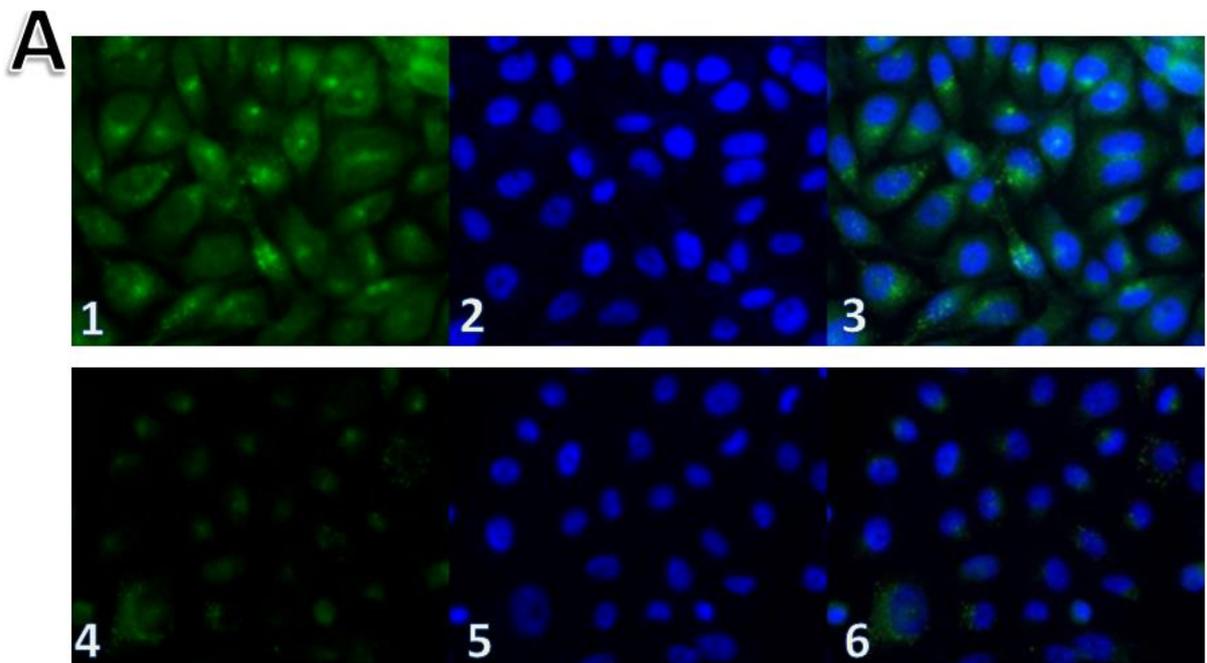


Figura 11 – Imagem de Imunofluorescência para HPSE1. As linhagens tumorais prostáticas foram submetidas a imunomarcagem para localização celular da HPSE1. A-B: PC3; C-D: PC3shHPSE. Em verde se destaca a marcação fluorescente para a HPSE1 evidenciada pelo fluoróforo Cy2; enquanto em azul notam-se os núcleos com seu DNA intercalados por DAPI.

Para uma análise quantitativa, foi realizado um exame dos pixels emitidos pela coloração do fluoróforo Cy2 verde e DAPI (que infere o número de células por campo visual), calculados por meio do software ImageJ (Figura12), onde as fases foram separadas e os valores de pixels demonstrados em números absolutos. A partir dessa imagem verificamos que a linhagem PC3 apresentou cerca de 80% (14.295 pixels/media) maior intensidade da cor verde em pixels, referente à HPSE quando comparada a linhagem transfectada (2.724 pixels/media). É possível notar também a localização concentrada de HPSE1 no núcleo e citoplasma da célula parental, enquanto a expressão de HPSE1 no clone se mostra mais concentrada no núcleo.



B

Imunofluorescência HPSE

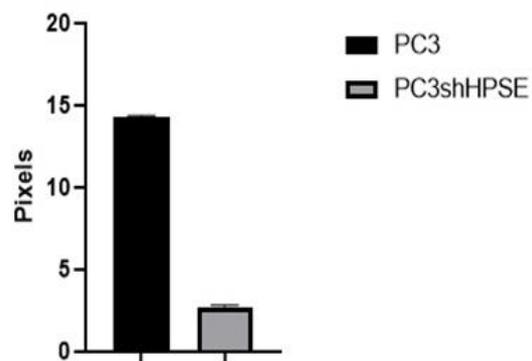
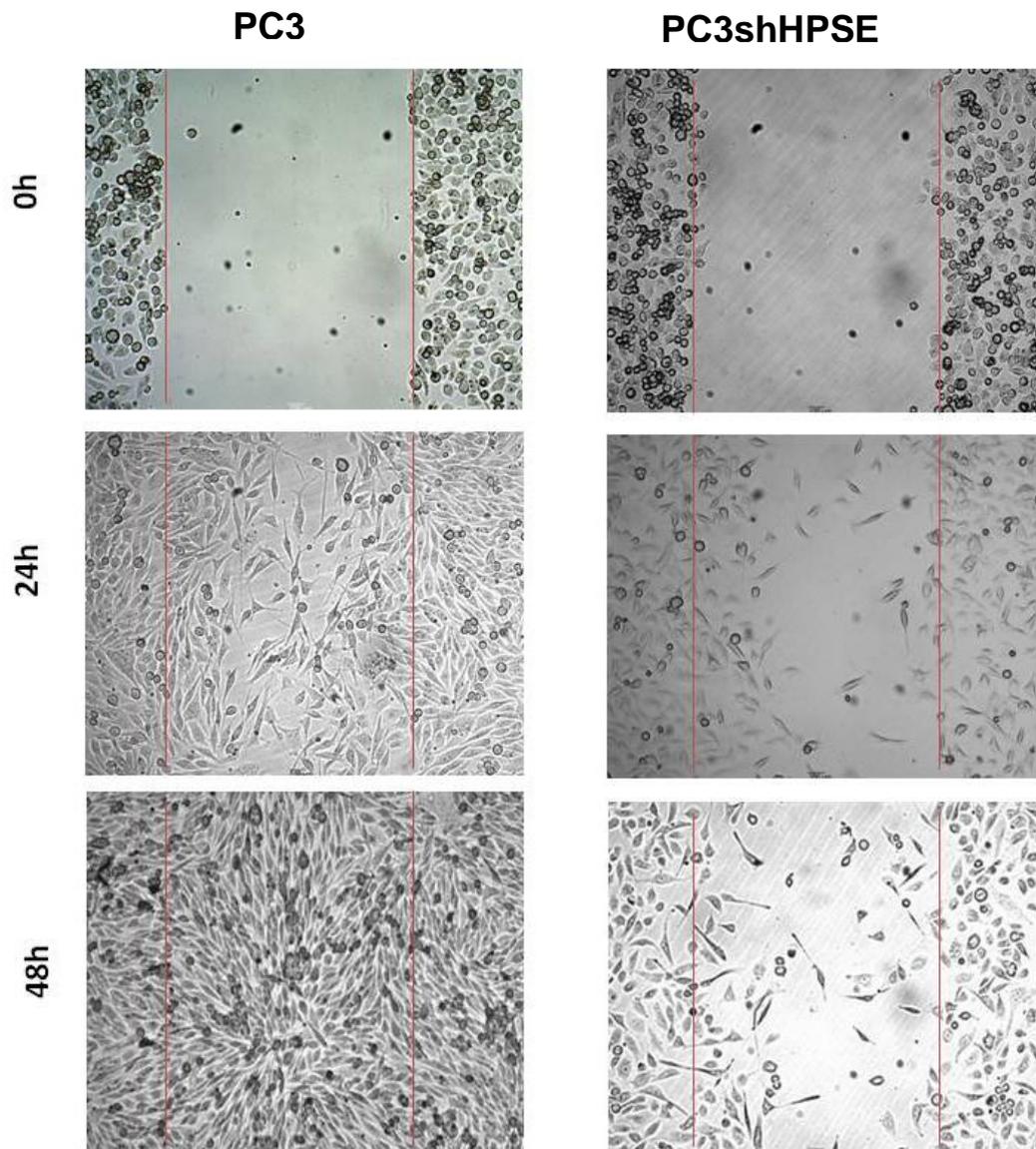


Figura 12: (A) Análise de escala de cor por ImageJ feita a partir de *Hyperstacks* separando as fases e quantificando a intensidade dos pixels emitidos. 1: PC3 – marcação HPSE; 2:PC3 – marcação DAPI; 4: PC3shHPSE1 – Marcação HPSE; 5:PC3shHPSE1 – Marcação DAPI. (B) O gráfico apresenta análise da intensidade de Pixels da imagem 1 em relação à 4 demonstrando que a célula PC3 apresenta cerca de 80% maior intensidade de pixels na análise da proteína HPSE1.

4.6. Ensaio de Migração Celular (*Scratch assay*)

Neste ensaio foi analisado o potencial de migração das células PC3 em comparação com a sub linhagem transfectada PC3shHPSE1 (Figura 13 – A). Após o período final de incubação, foi mensurada a área remanescente, e o registro das imagens desta migração na fenda feita na monocamada de células foi realizado com auxílio do programa Motic image 2.0 (Figura 13 – B), em 3 tempos distintos: 0, 24h e 48h como previamente descritos.

A

B

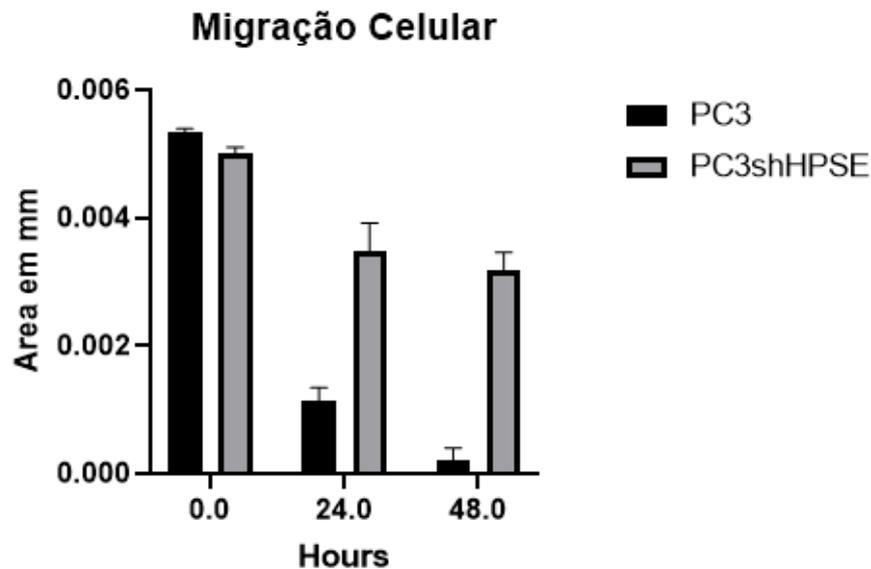


Figura 13 - (A) Fotomicrografias de células PC3 e PC3shHPSE durante ensaio de ranhura ou migração celular (*scratch assay*) nos tempos 0, 24 e 48 horas após plaqueamento. Imagens obtidas ao microscópio invertido com objetiva de 10x. (B) Quantificação da migração celular durante o ensaio. Os resultados estão expressos em área total remanescente no interior da fenda primária analisada por software Motic 2.0. $n=3$ $p=0.0002$.

4.7. A inibição estável da HPSE1 compromete a expressão de proteínas relacionadas a progressão tumoral e morte celular

Obteve-se neste ensaio, significativa diferença na expressão de HPSE1 entre as duas linhagens deste estudo. A linhagem parental expressou quantidade 56% superior de HPSE1 quando comparada à transfectada PC3shHPSE1. Em relação ao controle GAPDH, observamos variância de pixels de aproximadamente 9% a menos na célula PC3shHPSE1, o que garante um bom controle interno. O GAPDH como controle interno reflete que a transfecção do shRNA da HPSE1 foi eficiente (Figura 14). Foram feitas análises de outros marcadores relacionados com a proliferação e migração celular e principalmente superexpressos em células tumorais que também sofreram modulação a partir do ensaio de transfecção estável da HPSE1. Os resultados demonstraram modulação destes marcadores no clone PC3shHPSE1 em relação à parental PC3. Quanto às metaloproteinases, foi verificada diminuição de 98% da MMP2 e 56% da MMP9 na linhagem silenciada shHPSE1. Com relação ao AIF (fator de indução da apoptose) a redução foi de 56%, entretanto em relação a β -

actina houve uma superexpressão de 80% desta proteína em relação à célula parental PC3, o que a retira de um bom controle endógeno e responde as modificações morfológicas visualizadas na Figura 8 (Figura14).

A

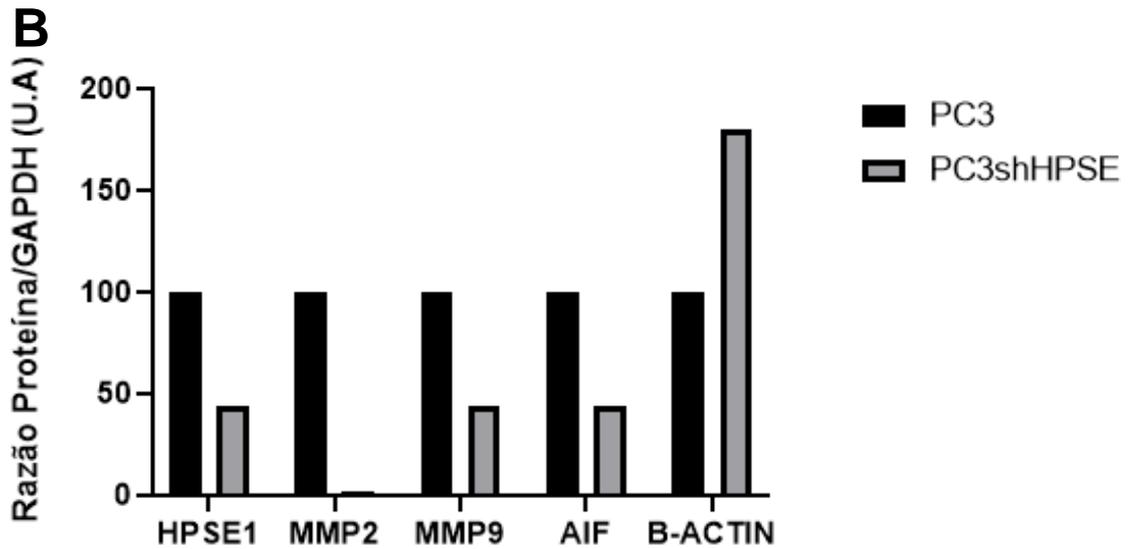
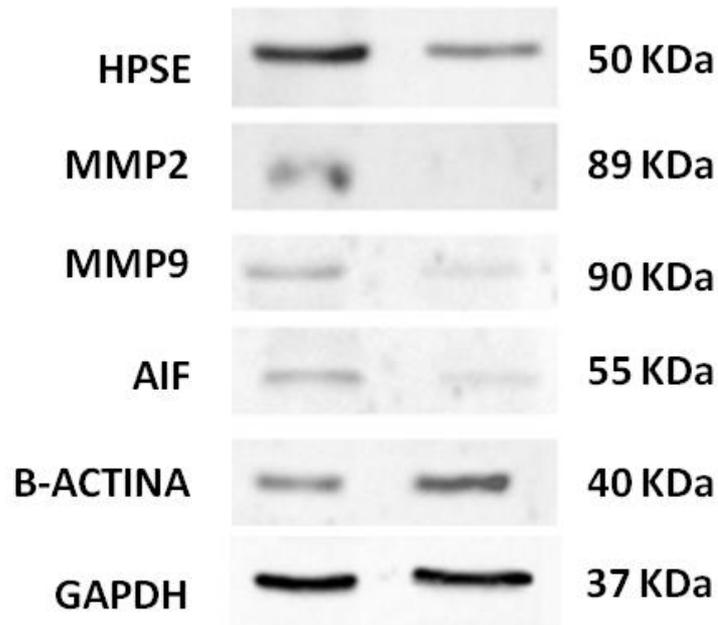


Figura 14: (A) Análise da expressão de proteínas nas linhagens PC3 e PC3shHPSE1 por *Western Blotting*. (B) Gráfico quantitativo da expressão proteica. Os dados estão demonstrados como a razão das densitometrias obtidas pela proteína de interesse (HPSE1) e demais marcadores MMP2, MMP9, AIF e β -actina com a densitometria relativa à sua proteína endógena (GAPDH) e os dados obtidos foram analisados por intensidade de pixels através do software *ImageJ*.

5. DISCUSSÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial e uma das principais causas de morte dos homens no mundo. De acordo com o INCA (4), é o segundo em incidência nos homens, atrás apenas do câncer de pele (não melanoma). É considerado um câncer da terceira idade, pois 75% dos casos se dão em homens acima de 65 anos. Estima-se 65.840 novos casos dessa doença neste ano de 2020, no Brasil.

Os tratamentos do CaP podem comprometer gravemente a qualidade de vida dos pacientes, podendo causar complicações, sendo as mais comuns, incontinência urinária e impotência sexual (9). Portanto o desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do CaP ainda é necessário para mudar o perfil da doença no país. Ainda não são conhecidas formas específicas de prevenção, sendo que a identificação dos estágios iniciais da doença são, na maioria dos casos, determinantes para redução das taxas de morbidade e mortalidade. As atuais formas de diagnóstico que podem ser empregadas são o toque retal, testes laboratoriais e de imagem (54). Apesar de disto, novas formas de diagnósticos com biomarcadores contribuiriam grandemente para que sejam localizados em sua forma primária e ampliar as chances de sucesso no tratamento (9).

A exemplo de biomarcadores para o CaP, destacamos neste trabalho a HPSE1, uma endoglucuronidase que cliva o heparan sulfato (HS), regulando assim a estrutura e a função dos proteoglicanos de heparan sulfato e remodelando as superfícies celulares e a matriz extracelular. Muito do nosso conhecimento atual sobre a função da HPSE1 está relacionado ao câncer, e numerosas revisões abrangentes estão disponíveis sobre esse assunto (55, 56). Há evidências abundantes de que a HPSE1 desempenha um papel crucial na progressão tumoral. As análises no nível de RNA ou proteína demonstram que a expressão da HPSE1 está aumentada em quase todos os cânceres analisados até o momento, incluindo, por exemplo, ovário, pancreático, mieloma, cólon, bexiga, cérebro, mama, fígado e próstata (57, 58, 59). Além disso, numerosos estudos demonstraram consistentemente que a expressão de HPSE1 não regulada se correlaciona com o aumento do tamanho do tumor, progressão do tumor, metástase aumentada e mau prognóstico (18, 25, 32, 33, 34, 43, 55).

Em nosso estudo, verifica-se através da supressão da HPSE1 por plasmídeo retroviral contendo um “short hairpin” inibidor para o gene da HPSE1 (shHPSE1), que a diminuição da expressão da HPSE1 leva uma alteração morfológica distinta do clone transfectado, o que poderia explicar em partes a diminuição de vários aspectos relacionados ao comportamento proliferativo e invasivo desta linhagem.

As avaliações da viabilidade/proliferação celular obtidas pelo ensaio de MTT destacou que a proliferação da célula parental foi maior do que a célula silenciada PC3shHPSE1 a partir das 24h de plaqueamento e com aumento significativo até as 72horas após o início 76das medidas. Isto se dá pelo fato que as células para sobreviverem e proliferarem necessitam de estímulos oriundos da MEC, sendo a atividade da HPSE1 crucial para a liberação de vários fatores de crescimento e sobrevivência ancorados na MEC e sequestrados pelos HSPG (proteoglicanos de Heparan Sulfato), um grande depósito de biodisponibilidade destes fatores.

A relação entre HPSE1, o crescimento celular e a metástase tem sido constatada em grande variedade de tumores *in vitro* e *in vivo* (33,57), estudos com modelos animais tem mostrado que a alta expressão de HPSE1 está associada ao crescimento tumoral, metástase e quimio-resistência (33, 60, 61).

Para avaliar qual seria o comprometimento da diminuição da ação da HPSE1 em relação aos aspectos migratórios que corroboram com a progressão tumoral no sentido metastático, o ensaio de *Scratch assay* foi utilizado em nosso estudo. Fica muito claro que a sub linhagem obtida pelo silenciamento da HPSE1, a PC3shHPSE1 não apresentou comportamento migratório semelhante ao controle parental. As células parentais possuem um potencial de migração através de uma fenda experimental distintamente elevada em relação à silenciada, ocupando toda a área do teste em 48horas do início do ensaio, enquanto a célula silenciada demonstrou a redução em sua capacidade de migrar para a fenda feita na monocamada celular.

Sabe-se que a tumorigênese é um processo complexo, com vários estágios, em que uma célula normal sofre alterações genéticas, resultando na capacidade de invadir e se espalhar para locais distantes do corpo. As interações entre o tumor e seu microambiente resultam na produção de enzimas proteolíticas cruciais para esse processo. Para que a metástase ocorra, uma célula deve ser capaz de se separar do tumor primário e invadir através da MB e da MEC intersticial. Ela deve sobreviver à circulação para parar no leito capilar distante. Para que o tumor se estabeleça em

um local distante, a célula tumoral deve sair da circulação e invadir a matriz novamente. Além disso, ele deve responder a fatores de crescimento, proliferar como uma colônia secundária, induzir angiogênese e fugir das defesas do hospedeiro. A observação inicial da importância das MMPs na biologia do câncer foi que a capacidade das células tumorais de invadir o tecido circundante se correlacionava com o aumento dos níveis das MMPs. As metaloproteinases da matriz permitem a angiogênese do tumor, pois permitem que as células endoteliais invadam a MB para formar novos vasos sanguíneos. Eles também regulam a ligação, proliferação, migração e crescimento de células endoteliais, diretamente ou pela liberação de fatores de crescimento (19).

Neste estudo também se observa como estas enzimas, relacionadas a progressão tumoral são moduladas no silenciamento da HPSE1. Durante a observação da expressão proteica, a literatura apresenta que a modulação de HPSE1 pelas células tumorais, neste caso, o aumento de sua expressão, inicia a regulação positiva da expressão de múltiplos genes que promovem o comportamento agressivo do tumor, incluindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e MMPs (62, 63, 64), entre outros. As MMPs são importantes reguladores da invasão celular em várias formas malignas de tumores (65).

Estes dados corroboram com os resultados obtidos em nosso estudo, pois o silenciamento da HPSE1, alterou também a expressão das MMPs 2 e 9 nas células PC3shHPSE1, demonstrada através do ensaio de *Western Blotting*, sendo que ambas foram diminuídas com a diminuição da expressão da HPSE1. A razão pelo qual esta diminuição pode ter sido afetada é justamente devido à diminuição de vários fatores de crescimento e diferenciação que não são bio-disponibilizados pela ação da HPSE1 que encontra-se diminuída.

A resistência a apoptose também foi verificada em nosso trabalho. O Fator de indução de apoptose (AIF) foi originalmente identificado como um fragmento de 57kDa, solúvel, que durante a apoptose é liberado da mitocôndria e transloca para o núcleo sinalizando a apoptose (66, 67). O AIF presente no citoplasma não confere caráter apoptótico à célula, verificamos então que a expressão da proteína AIF também foi modulada negativamente no clone silenciado PC3shHPSE1 quando comparado à célula PC3. Em contrapartida, a modulação da proteína β -actina foi inversa, pois apresentou aumento no clone sh em relação à parental. Esta proteína

estrutural β -actina participa de vários eventos celulares, sendo relacionada à motilidade celular, alterações morfológicas, polaridade celular e regulação transcricional. Guettler et al (23) demonstrou que a β -actina tem ligações com a regulação e transferência núcleo-citoplasmática de p53, um gene supressor de células cancerígenas. Outros estudos sugerem que a polimerização negativa da β -actina regula a importação de p53 (24), demonstrando que a β -actina citoesquelética pode ser um regulador no processo de tumorigênese. Tais dados corroboram com o comportamento com as alterações morfológicas e comportamentais do clone PC3shHPSE1 por sua modulação positiva de β -actina.

Sendo assim, de acordo com a literatura e os resultados obtidos neste estudo, reafirmamos o estabelecimento da HPSE1 como efetivo biomarcador tumoral para o câncer.

6. CONCLUSÕES

Este presente estudo teve por objetivo principal relacionar a modulação da proteína HPSE1 com os aspectos proliferativos e comportamentais de células de CaP, especialmente de uma linhagem que possui um padrão de insensibilidade androgênica, que reflete ao CaP resistente a terapia androgênica utilizada no tratamento do CaP. Pudemos concluir que:

- 1) O bloqueio da expressão de HPSE1 se mostrou efetivo por silenciamento estável por shRNA, refletido pelos resultados obtidos e se mostrou eficaz durante todo o percurso deste estudo.
- 2) Os níveis expressos de HPSE1, verificados por meio de RT-qPCR e Western Blotting apresentaram quantidade inferior no clone transfectado em relação à célula parental.
- 3) Este silenciamento foi capaz de diminuir a capacidade proliferativa, e migratória das células tumorais prostáticas.
- 4) Este silenciamento também demonstrou atuar na modulação de outras enzimas relacionadas com a progressão tumoral, como foi o caso da MMP-2 e -9, onde a diminuição da expressão da HPSE1 corrobora com a diminuição destas enzimas também.

Além disto pudemos verificar que houve modulação de proteínas relacionadas com a apoptose e à morfologia celular com esta intervenção. Assim este estudo corrobora para os esforços de estabelecer a HPSE1 com um potencial biomarcador para o câncer, em específico neste trabalho, o câncer de próstata.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saito RF, Lana MVG, Medrano RFV, Chammas R. Fundamentos de Oncologia Molecular. São Paulo:Editora Atheneu; 2015.
2. World Health Organization. Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages. International Agency for research on Cancer: WHO, 2019. Disponível em <https://gco.iarc.fr/today/> . Acesso em 10 de outubro de 2019.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Câncer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA CANCER J CLIN 2018;68:394–424.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2020. (INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Incidência de câncer no Brasil.2020. Disponível em www.inca.gov.br/estimativa.asp. Acesso em 15 de Janeiro de 2020.
5. Calvete AC, et al. Avaliação da extensão da neoplasia em câncer de próstata: valor do PSA, da porcentagem de fragmentos e da escala de Gleason. Prev. Assoc. Med. Bras. 2003;49(3):250-244.
6. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. Eur Urol. 2012; 61:1079-1092.
7. Bray F, Pineros M. Cancer patterns, trends and projections in Latin America and the Caribbean: a global context. Salud publica Mex. 2016;58:104-117.
8. Bray F, Kiemeny L. Epidemiology of prostate cancer in Europe: patterns, trend and determinants. Manag. Prost. Câncer. Berlin.2017:1-11.
9. Tonon TCA, Schoffen JPF. Câncer de Próstata: Uma revisão de literatura. Revista Saúde e Pesquisa. 2009;2(3)403-410.

10. Gonçalves IR, Padovani C, Popim RC. Caracterização epidemiológica e demográfica de homens com câncer de próstata. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2008;13(4)1337-1342.
11. Piantino CB, Salvadori FA, Ayres PP, Kato RB, Srougi V, Leite KR, et al. An evaluation of the anti-neoplastic activity of Curcumin in prostate cancer cell line. *International Braz J Urol*. 2009;35(3) 354-361.
12. Chen Q, Yao Y, Xu H, Chen Y, Gu M, Cai Z, Wang ZS. POCK1 promotes tumor growth and metastasis in human prostate cancer. *Drug Design, Development and Therapy* 2016;10.2311–2321.
13. Cunha GR, Donjacour AA, Cooke OS, Mee H, Bigsby RM, Higgins SJ, et al. The Endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews*.1987;8(3)338-362.
14. Niu Y, Xia SJ. Stroma-epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian J Androl*. 2009;11:28-35.
15. Hey ED. Biogenesis and organization of extracellular matrix. *FASEB J*. 1999;13(2)281-283.
16. Reuss-Borst MA, Klein G, Waller HD, Muller CA. Differential expression of adhesion molecules in acute leukemia. *Leukemia*. 1995;9(5)869-874.
17. Bernfield M, Gotte M, Park PW, et al. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:729-777.
18. Dreyfuss JL, Oliveira JSR. Matriz extracelular e enzimas degradatórias na hematopoese e doenças onco-hematológicas. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(5)398-405.
19. Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol*. 2003;12(2): 109-25.

20. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007; 35:495–516.
21. Patterson, L., McKeown, S. AQ4N: a new approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy. *Br J Cancer* 2000;83:1589–1593.
22. Green DR, Kroemer G. The Pathophysiology of Mitochondrial cell death. *Science.* 2004;305(5684):626-9.
23. Guettler S, Vartiainen MK, Miralles F, Larijani B, Treisman R. RPEL motifs link the serum response factor cofactor MAL but not myocardin to Rho signaling via actin binding. *Mol. Cell Biol.* 2008;28:732–742.
24. Wang L, Wang M, Wang S, Qi T, Guo L, Li J, et al. Actin polymerization negatively regulates p53 function by impairing its nuclear import in response to DNA damage. *PLoS One.* 2013;8(4):e60179.
25. Chen X, Jiang W, Yue C, Zhang W, Tong C, Dai D, et al. Heparanase Contributes to Trans-endothelial Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Journal of Cancer.* 2017;8(16): 3309-3317.
26. Kundu S, Xiong A, Spyrou A, Wicher G, Marinescu VD, Edqvist PHD, et al. Heparanase promotes glioma progression and is inversely correlated with patient survival. *Mol Cancer Res.* 2016;14(12):1243-1253.
27. Arvatz G, Weissmann M, Ilan N, Vlodysky I. Heparanase and cancer progression: New directions, new promises. *Human Vacc & Immunother.* 2016;12(9): 2253-2256.
28. Barbosa GO, Cervigne NK, Carvalho HF, Augusto TM. Heparanase 1 involvement in prostate physiopathology. *Cell Biol Int.* 2017;41:1194-1202.
29. Vlodysky I, Goldshmidt O, Zcharia E, Atzmon R, Rangini-Guatta Z, Elkin M, et al. Mammalian Heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(2):121-129.

30. Masola V, Bellin G, Gambaro G, Onisto M. Heparanase: A multitasking protein involved in Extracellular Matrix (ECM) remodeling and intracellular events. *Cell*. 2018;7:236-247.
31. Jin H, Zhou S, Song Y, Cao H. Heparanase overexpression down regulates syndecan-I expression in a gallbladder carcinoma cell line. *Journal of Int Med Res*. 2017;45(2):662-672.
32. Gingis-Velitski S, Zester A, Flugelam MY, Vlodaysky I, Ilan N. Heparanase induces endothelial cell migration via protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem*. 2004;279(22):23536-23541.
33. Sun X, Zhang G, Nian J, Yu M, Chen S, Zhang Y, et al. Elevated heparanase expression is associated with poor prognosis in breast cancer: a study based on systematic review and TCGA data. *Oncotarget*. 2017;8(26):43521-43525.
34. Vreys V, David G. Mammalian Heparanase: what is the message? *J. Cell. Mol. Med*. 2007;11(3):427-452.
35. Goldshmidt O, Yeikilis R, Mawasi N, Paizi M, Gan N, Ilan N, et al. Heparanase expression during normal liver development and following partial hepatectomy. *J Pathol*. 2004;203:594-602.
36. Katz A, Van-Dijk DJ, Aingorn H, Erman A, Davies M, Darmon D, et al. Involvement of human heparanase in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Isr Med Assoc J*. 2002;4: 996 – 1002.
37. Shafat I, Barak AB, Postovsky S, Elshasid R, Ilan N, Vlodaysky I, et al. Heparanase levels are elevated in the plasma of pediatric cancer patients and correlate with response to anticancer treatment. *Neoplasia*. 2007;9(11):909-916.
38. Hulett MD, et al. Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med*. 1999;5:803-809.

39. Vlodavsky I, Friedmann Y. Molecular properties, and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest.* 2001;108:341–347.
40. Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function, and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:2018–2039.
41. Goldshmidt O, et al. Cell surface expression and secretion of heparanase markedly promote tumor angiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:10031-10036.
42. Parish CR, Freeman C, Hulett MD. Heparanase: A key enzyme involved in cell invasion. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1471:M99–M108.
43. Jin H, Zhou S. The Functions of heparanase in human diseases. *Med Chem.* 2017;17:541-548.
44. Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HJ. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate.* 2003;57(3):205-225.
45. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ, Huang J. PC3 is a cell line characteristic of prostate small cell carcinoma. *The Prostate.* 2011;71(15):1668-1679.
46. Costa J, Pereira R, Oliveira J, Alves A, Magalhães AM, Frutuoso A, et al. Structural and molecular analysis of the cancer prostate cell line PC3: Oocyte zona pellucida glycoproteins. *Tissue and Cell.* 2018;55:91-106.
47. Seim I, Jeffery PL, Thomas PB, Nelson CC, Chopin LK. Whole-Genome sequence of the PC3 and LNCaP human prostate cancer cell lines. *G3 Gene, Genomes, Genetics.* 2017;7:1731-1741.
48. Webb DJ, Zhang H, Horwitz AF. Migration of cells: an overview. *Methods Mol Biol.* 2005;294:3-11.

49. Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 1996;84(3):359-369.
50. Grada A, Otero-Vinas M, Pietro-Castillo F, Obagi Z, Falanga V. Research Techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *Journal of Invest Dermat*. 2017;137:11-16.
51. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative Urology*. 1979 Jul;17(1):16-23.
52. Basrawala Z, Alimirah F, Xin H, Mohideen N, Campbell SC, Flanigan RC, Choubey D. Androgen receptor levels are increased by interferons in human prostate stromal and epithelial cells. *Oncogene*. 2006 May 4;25(19):2812-7.
53. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012 Sep;4(9):429-34.
54. Netto JNR, Wroclawski ER. *Urologia: fundamentos para o clínico*. São Paulo, 2000.Savier.
55. Hammond E, Khurana A, Shridhar V, Dredge K. The Role of Heparanase and Sulfatases in the Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans within the Tumor Microenvironment and Opportunities for Novel Cancer Therapeutics. *Front Oncol*. 2014; 4:195.
56. Barash U, Cohen-Kaplan V, Dowek I, Sanderson RD, Ilan N, Vlodavsky I. Proteoglycans in health and disease: New concepts for heparanase function in tumor progression and metastasis. *FEBS J*. 2010; 277:3890-3903.
57. Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, et al. Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2000;157(4):1167–1175.

58. Kelly T, Miao HQ, Yang Y, Navarro E, Kussie P, Huang Y, MacLeod V, Casciano J, Joseph L, Zhan F, Zangari M, Barlogie B, Shaughnessy J, Sanderson RD. High heparanase activity in multiple myeloma is associated with elevated microvessel density. *Cancer Res.* 2003;63:8749–8756.
59. Masola V, Maran C, Tassone E, Zin A, Rosolen A, Onisto M. Heparanase activity in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma: implications for tumor invasion. *BMC Cancer.* 2009;9:304.
60. Ramani VC, Zhan F, He J, Barbieri P, Nosedà A, Tricot G, et al. Targeting Heparanase overcomes chemoresistance and diminishes relapse in myeloma. *Oncotarget.* 2016;7:1598-1607.
61. Shteingauz A, Boyango I, Naroditsky I, Hammond E, Gruber M, Dowerck , et al. Heparanase enhances tumor growth and chemoresistance by promoting autophagy. *Cancer Res.* 2015;75:3946-3957.
62. Purushothaman A, Chen L, Yang Y, Sanderson RD. Heparanase stimulation of protease expression implicates it as a master regulator of the aggressive tumor phenotype in myeloma. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32628–32636.
63. Purushothaman A, Uyama T, Kobayashi F, et al. Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis. *Blood.* 2010;115(12):2449–2457.
64. Yang Y, Ren Y, Ramani VC, Nan L, Suva LJ, Sanderson RD. Heparanase enhances local and systemic osteolysis in multiple myeloma by upregulating the expression and secretion of RANKL. *Cancer Res.* 2010;70(21):8329–8338.
65. Asghar MY, Kemppainen K, Lassila T, Törnquist K. Sphingosine 1-phosphate attenuates MMP2 and MMP9 in human anaplastic thyroid cancer C643 cells: Importance of S1P2. *PLoS One.* 2018;13(5):e0196992.
66. Susin S, Lorenzo H, Zamzami N, Marzol I, Snow BE, Mangion J, et al. Nature. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. 1999;4:397(6418):441-446.

67. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *The Journal of experimental medicine*. 1996;184(4): 1331-1341