

Guilherme O Barbosa<sup>1\*</sup>, Taize M Augusto<sup>1</sup>, Alexandre Bruni-Cardoso<sup>1</sup>, Hernandes F Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica – Instituto de Biologia Universidade Estadual de Campinas, Campinas SP, Brazil

e-mail: gbarbosa.bio@gmail.com<sup>1\*</sup>

Instituição de fomento: Fapesp\*

Palavras chaves: Heparanase, desenvolvimento, siRNA

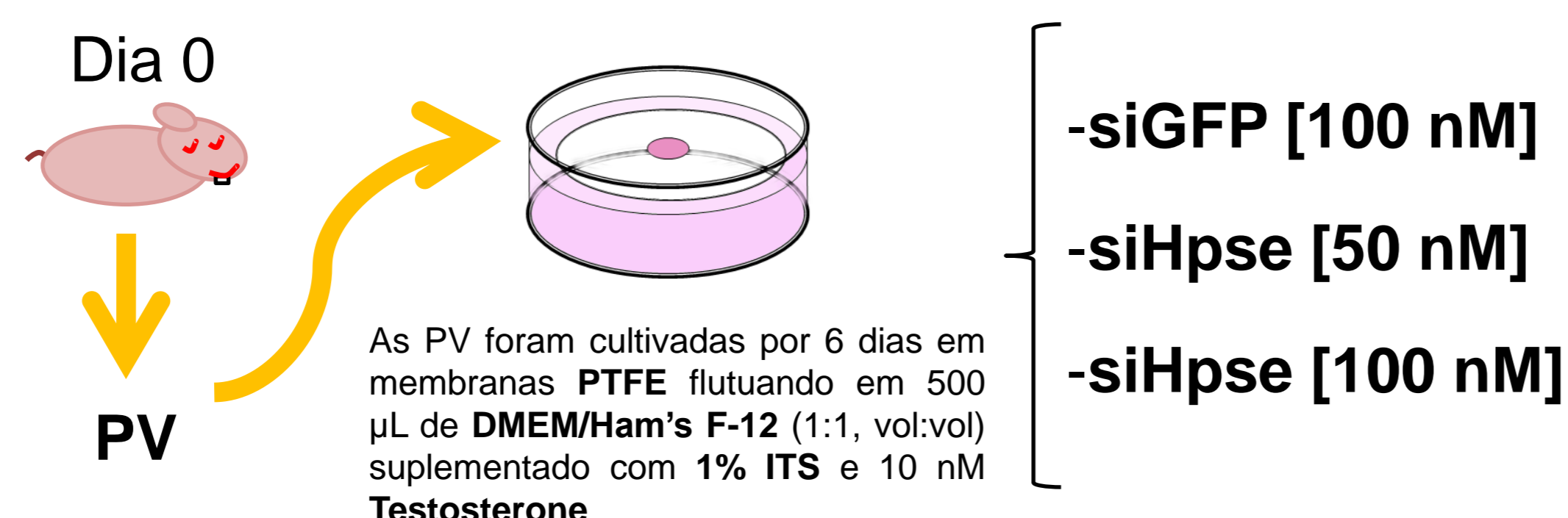
## 1. Introdução

Durante a primeira semana pós-natal acontecem as principais eventos do desenvolvimento e diferenciação de próstata ventral (PV) de rato, que são resultantes, principalmente, da interação epitélio-estroma (Endocrinol Rev 8: 338-362. 1987). Dentre as modificações, existem as causadas pela atuação de MMPs 2 e 9 na matriz extracelular (MEC) (Anat Rec (Hoboken) 290: 1223-1232 2007).

Heparanase é uma endoglicosidase que atua na clivagem de heparan sulfato (HS), presentes na MEC e na superfície celular. A atuação dessa enzima resulta no afrouxamento da lamina basal e da MEC, liberação de fatores de crescimento, e de fragmentos de HS bioativos.

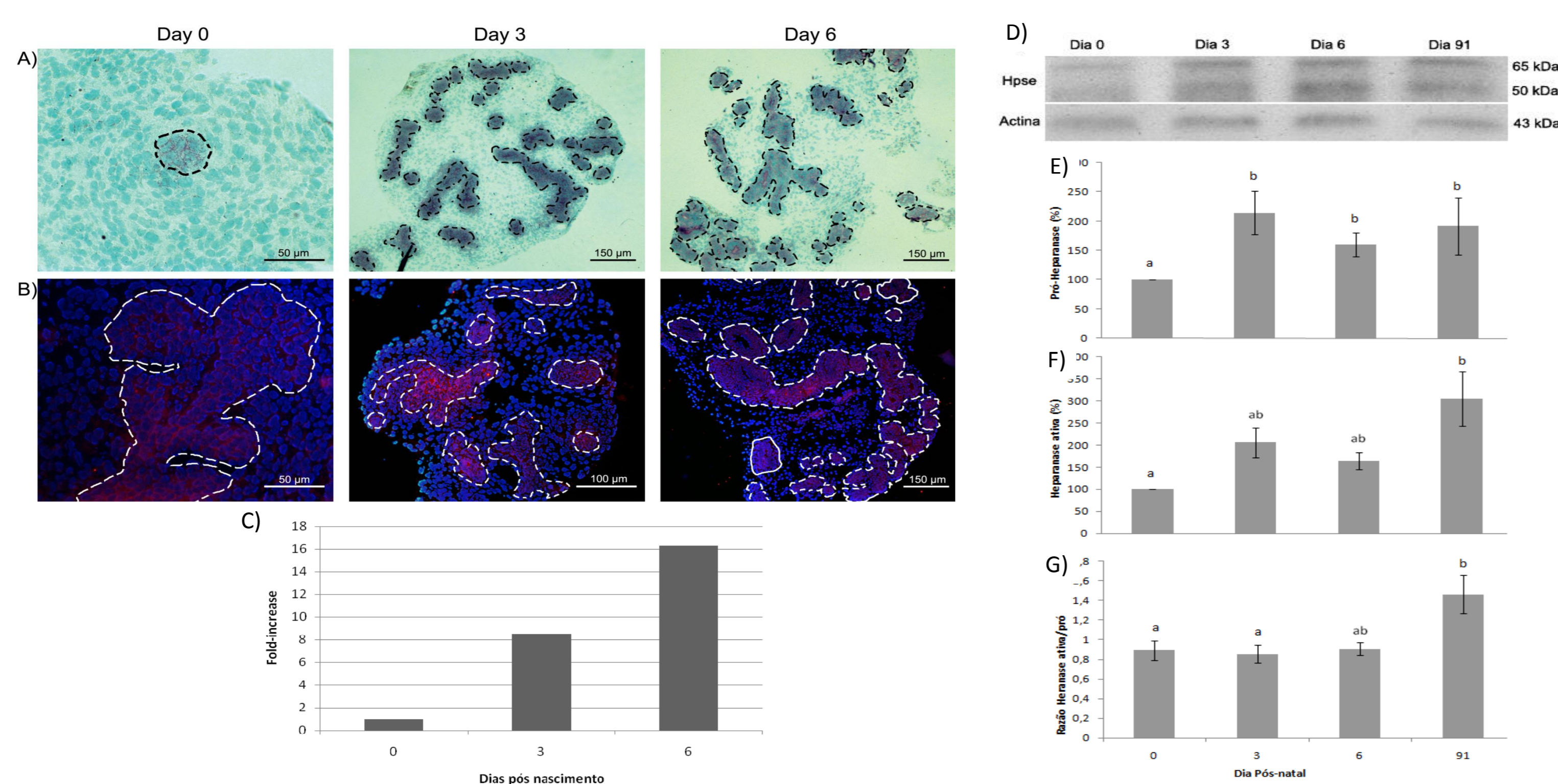
Tivemos por objetivo identificar os possíveis papéis dessa enzima no desenvolvimento prostático através de um modelo *in vitro* com silenciamento por siRNA verificando se o tratamento com o siRNA para Hpse1 tinha efeito na taxa de proliferação e morte celular, bem como uma contagem de estruturas epiteliais com e sem lúmen.

## 2. Material e Métodos



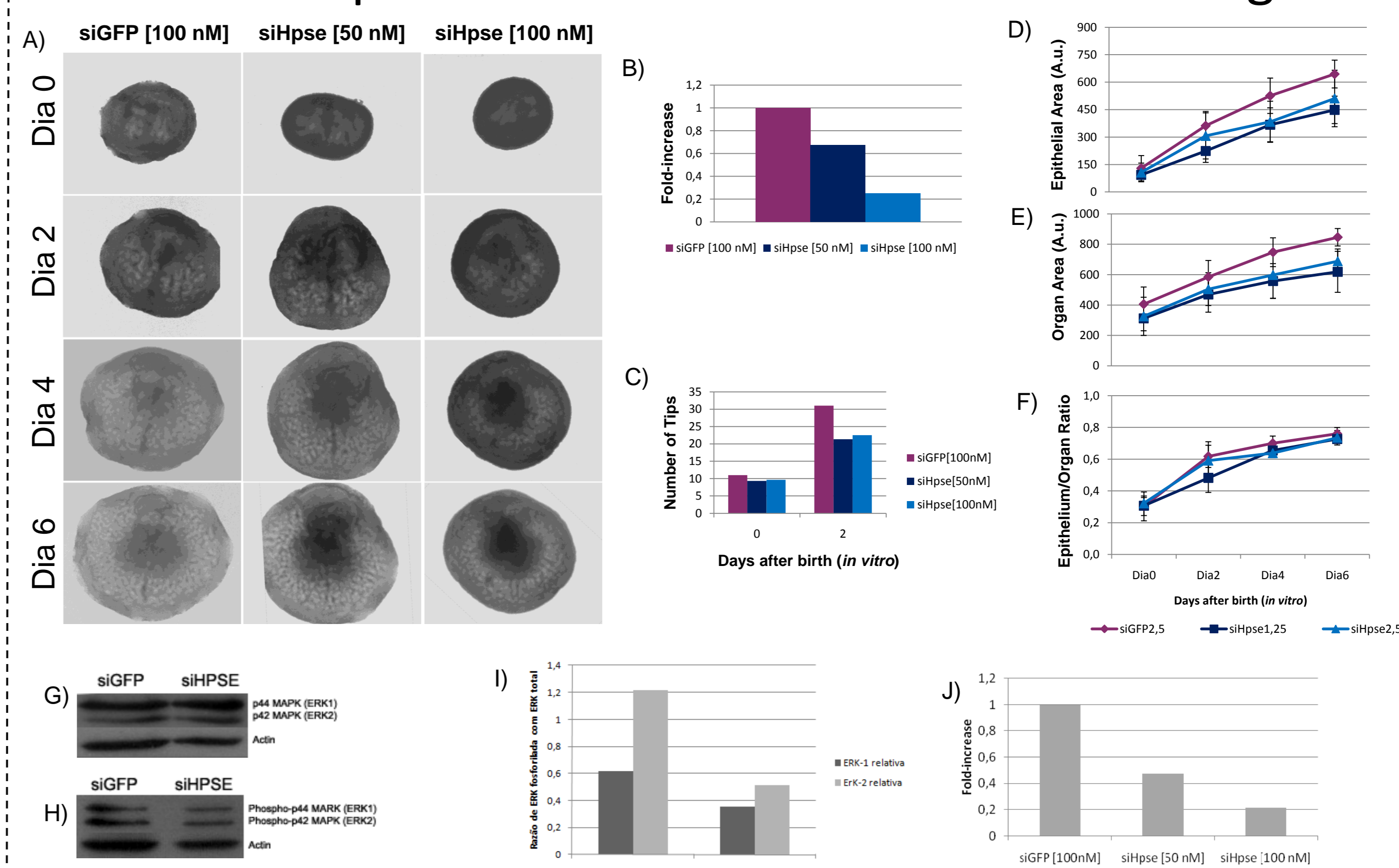
## 3. Resultados

### 3.a. Hpse1 está presente na interface epitélio-estroma no desenvolvimento pós natal de PV *in vivo*



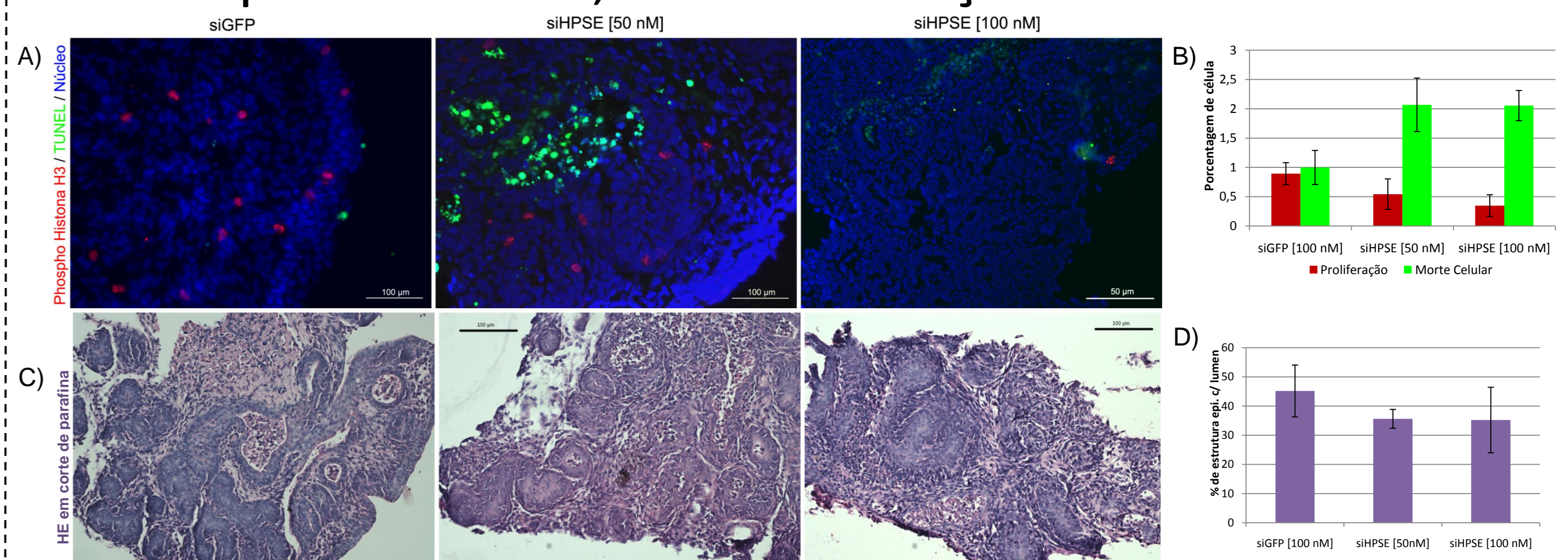
**Figura 1:** Detecção de RNAm (A) e proteína (B) Hpse1 em PV por ISH e imunomarcacão respectivamente, mostrando que o RNAm é produzido nas células epiteliais e a localização da enzima se restringe à interface epitélio-estroma, durante o desenvolvimento na primeira semana pós-natal. A quantificação relativa de RNAm por RealTime-PCR (C) mostra uma elevação na quantidade de RNAm de Hpse1 durante o mesmo período. Por fim através de *Western Blotting* foi possível detectar e quantificar proteína que é detectável na forma ativa (50 kDa) e pró-enzima (65 kDa) (D), para tal Actina (43 kDa) foi usado como controle de carregamento. Assim, pela densitometria, pudemos observar que o nível de Hpse ativa elevasse no começo da semana pós natal estabiliza até adulto (E). Já o nível de pró enzima eleva-se durante a primeira semana atingindo a maior quantidade no adulto (F). Dessa forma a ativação (razão entre forma ativa e pró-enzima) é próximo de 1 durante a semana pós natal, e fica maior apenas no adulto (G).

### 3.b. Silenciamento de Hpse1 compromete crescimento da PV e reduz a quantidade de RNAm de MMP2 no órgão



**Figure 2.** Cultura de órgão com silenciamento de Hpse1 por siRNA (A). Eficácia é mostrada por qRT-PCR (B). Órgãos tratados por siHpse mostram um número reduzidos de tips (C). O silenciamento também afetou o crescimento da PV. Área Epitelial (D) e área do órgão (E) foram menores nos órgãos tratados com siHpse, mas não houve efeito do tratamento sobre a razão área de epitélio/órgão (F). Através do *W. blotting* de ERK 1/2 total (G) e p-ERK1/2 (H) foi possível observar a redução na fosforilação de ERK para o grupo tratado com siHpse (I). Por fim, também observamos uma queda no nível de RNAm para MMP2 nas PVs silenciadas para Hpse (J).

### 3.c. Silenciamento de Hpse não altera proliferação e morte celular epitelial nas PV, nem a formação de lúmen.



**Figure 3.** Imunomarcacão de fosfo-histona H3, para detectar proliferação celular, associado com TUNEL, que detecta morte celular, em corte de parafina para os tratamentos com siGFP e siHpse (A). A porcentagem de proliferação e morte celular em todos os grupos não apresentava diferença (B). HE dos mesmo grupos para realizar contagem de estrutura epitelial com lúmen (C). A porcentagem de estrutura epitelial com lúmen também não variam entre os grupos (D). Barras dos gráficos correspondem ao desvio padrão das amostras.

## 4. Conclusão

Heparanase parece estar envolvida no desenvolvimento de PV na primeira semana pós-natal. A enzima é expressada principalmente pelas células epiteliais e atua na interface epitélio-estroma. O silenciamento da Hpse *in vitro* compromete o desenvolvimento do órgão, alterando a produção de RNAm de MMP2.

A taxa de proliferação e morte celular, assim como a formação de lúmen parece não ser alterada, mostrando que o silenciamento da heparanase por siRNA parece não comprometer diretamente esses eventos.

Dessa forma acreditamos que heparanase pode estar sendo a responsável por liberar FGF 10 da MEC assim como fragmentos de HS, e ambos estarem atuando nos FGFR2b (expresso em PV), ativando a fosforilação de ERK 1/2 e por fim contribuindo para a modificação de expressão de certos genes como o de MMP2.