

Lucas Teixeira e Aguiar Batista

**Identificação e quantificação de glicosaminoglicanos e
heparanase no tecido renal normal e neoplásico e
glicosaminoglicanos na urina em carcinoma de células
renais.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Médicas (Programa de Pós graduação da
Disciplina de Clínica Médica)**

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Lucas Teixeira e Aguiar Batista

**Identificação e quantificação de glicosaminoglicanos e
heparanase no tecido renal normal e neoplásico e
glicosaminoglicanos na urina em carcinoma de células
renais.**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Médicas (Programa de Pós graduação da
Disciplina de Clínica Médica)**

Orientadores:

Prof. Dr. Eric Roger Wroclawski

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Silva Pinhal

São Paulo

2009

B326

Batista, Lucas Teixeira e Aguiar

Identificação e quantificação de glicosaminoglicanos e heparanase no tecido renal normal e neoplásico e glicosaminoglicanos na urina em carcinoma de células renais / Lucas Teixeira e Aguiar Batista. _ São Paulo, 2009.

I-XII f

114 f. : il.; 30 cm

Tese (doutorado). Ciências Médicas. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 2009.

Orientado por: Dr. Eric Roger Wroclawski, Dra. Maria Aparecida Silva Pinhal.

1 Glicosaminoglicano 2 Carcinoma renal 3 Heparanase. I. Título II Wroclawski, Eric Roger. III. Pinhal, Maria Aparecida Silva. IV. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.

CDD

CDU 616.61

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Itamar, e minha mãe, Lêda, responsáveis pela minha educação, criação e inspiração para realizar os meus projetos de vida. Nada poderia ser possível na minha vida sem a presença constante deles.

Ao meu irmão, Marcos, e minha irmã, Mila, pelo apoio constante e amizade eterna.

A minha esposa, Cristiane, pelo amor, dedicação e sobretudo, por ter sido paciente para superar os momentos da minha ausência.

A Dr^a Maria Aparecida da Silva Pinhal, inicialmente apenas minha orientadora, mas demonstrou-se muito mais do que isso, tornou-se uma amiga que sempre me ajudou e apoiou, essa tese seria impossível sem a sua orientação e intensa dedicação.

A todos os colegas da equipe de Urologia da Faculdade de Medicina do ABC, que sempre me ajudaram, viabilizaram as coletas dos materiais e se tornaram a minha família do ABC.

A Dr. Minoru Saito, Dr. Luis Budibi, Dr. Auro Simões e a equipe de Urologia do Hospital Santa Marcelina, que foram os responsáveis pela minha formação como urologista e ajudaram na coleta dos materiais.

Ao Dr João Roberto Martins Maciel responsável pela análise das amostras de urina.

A Thérèse Rachell Theodore responsável pela análise da imunohistoquímica.

Ao amigo Leopoldo Ruiz Machado companheiro na coleta dos materiais e ajuda na organização das peças cirúrgicas.

Ao colega Dr. Leandro Luongo de Matos responsável pela realização da análise estatística.

À Equipe da biologia molecular que tornou viável o trabalhoso estudo biomolecular das amostras de urina e tecidos.

A Paulo Henrique Takahama, Sabrina Nascimento e Marcus Spatari que ajudaram na análise bioquímica e biomolecular deste estudo.

A Dr. Marcelo Cerqueira, Dr. Leonardo Carneiro e Dr. Matheus Mendonça que me substituíram no momentos da minha ausência.

Ao CAPES, CNPq, NEPAS e FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Ao pacientes que mesmo em um momento tão difícil e frágil de suas vidas aceitaram a participar desse estudo.

A todos acima citados e a todos aqueles que de alguma maneira colaboraram com a realização desse trabalho a minha mais sincera gratidão.

Agradecimento ao Prof. Dr. Eric Roger Wroclawski (*in memoriam*):

Dr. Eric Wroclawski, demonstrou-se muito mais do que um orientador, pois esteve sempre presente, ajudando, apoiando a realização e conclusão dessa tese, mesmo durante os períodos mais graves da enfermidade. O seu falecimento precoce é uma grande perda para a sociedade de urologia. O Dr. Eric é uma pessoa que tem o dom de liderar as pessoas, observar, resgatar e tornar a melhor qualidade dos seus alunos em evidência. O seu espírito democrático e liderança já servem e sempre servirão de expiração para outras pessoas. O Dr. Eric deixou saudades e sempre será lembrado pelo homem, amigo e urologista que foi.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

‰: por cento

>: maior que

<: menor que

µg/g: micrograma por grama

µL: microlitro

AgNORs: proteínas argrofílicas relacionadas com regiões organizadoras nucleolares

AH: ácido hialurônico

AJCC: União Americana do Comitê de Câncer

ASCO: Sociedade Americana de Clínica Oncológica

BHD: Síndrome de Birt-Hogg-Dubé

CaIX: anidrase carbônica IX

CaXII: anidrase carbônica XII

CCR: carcinoma de células renais

CCT: carcinoma de células transicionais

cm: centímetros

DNA: ácido desoxirribonucléico

dp: desvio padrão

EGFR: receptor do fator de crescimento epidermal

ELISA: enzima ligada a exame de imnuoabsorbância

EpCAM: molécula de adesão da célula epitelial

FGF2: fator de crescimento básico de fibroblastos

FGF: fator de crescimento de fibroblastos

FH: fumarato hidratasa

FRC: carcinoma renal familiar

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

HIF: fator de indução de hipoxia

HIFU: ablação por ultrassonografia de alta intensidade

HPRC: carcinoma renal papilar hereditário

HLRCC: carcinoma de célula renal leiomiomatose hereditário

HPA 1: heparanase 1

HPA 2: heparanase 2

ICAM: molécula de adesão intercelular

IFN: interferon

Ki67: marcador de proliferação celular Ki67

IL-2: interleucina 2

LOH: perda heterozigótica

MEC: matriz extra-celular

mL: mililitros

mTOR: rapamicina alvo de mamíferos

nm: nanômetros

ODD: domínio de degradação dependente de oxigênio

PCR: reação da polimerase em cadeia

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

PSA: antígeno específico da próstata

PTEN: fosfatase e tensina homologas

pVHL: gene von Hippel Lindau

RCC: carcinoma de células renais

RNA: ácido ribonucléico

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

RT-PCR: reação da transcriptase reversa seguida da reação da polimerase em cadeia

SNC: sistema nervoso central

sVCAM: molécula de adesão a célula vascular

TGF alfa: fator de crescimento tumoral alfa

TGO: transaminase glutâmico oxalacético

TGP: transaminase glutâmico pirúvico

TNM: T: extensão do tumor primário, N: a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais, M: a ausência ou presença de metástase à distância

TSH: hormônio estimulante da tireóide

u.d.: unidades densitométricas

UCLA: Universidade da Califórnia Los Angeles

UISS: UCLA sistema integrado de estadiamento

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

VHL: doença de von Hippel Lindau

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistema de Classificação de Fuhrman-----	11
Tabela 2: Características patológicas dos pacientes submetidos à nefrectomia que apresentaram carcinoma de células renais-----	55
Tabela 3. Quantificação da heparanase-1 por RT-PCR em tempo real-----	60
Tabela 4: Expressão da heparanase, as correlações clínicas e as características anatomopatológicas dos pacientes em estudo-----	62
Tabela 5. Expressão das isoformas HPA1 e HPA2 por quantificação digital das reações de imunohistoquímica-----	66
Tabela 6: Identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados nos tecidos não neoplásicos e tumorais-----	70
Tabela 7. Quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados em tecidos tumorais e não neoplásicos de pacientes com carcinoma de células renais----	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relação da proteína do gene VHL com a fisiopatologia do carcinoma de células renais-----	09
Figura 2: Unidade estrutural dos diferentes glicosaminoglicanos-----	22
Figura 3: Complexo macromolecular do ácido hialurônico e do agregam na matriz extracelular-----	28
Figura 4. Esquema do gene completo da heparanase localizado no cromossomo 4q21,3-----	31
Figura 5: Mecanismo de ação da heparanase-1-----	34
Figura 6: IP: índice de positividade; ItE: intensidade de expressão; IE: índice de expressão-----	47
Figura 7: Representação esquemática do ensaio fluorimétrico para quantificação do ácido hialurônico-----	51
Figura 8: Expressão da heparanase e GAPDH por RT-PCR semiquantitativo-----	56
Figura 9: Amplificação da heparanase por RT PCR <i>Touch Down</i> -----	57
Figura 10: Expressão da heparanase-----	59
Figura 11: Vantagens de avaliação da expressão da heparanase por RT-PCR tempo real-----	60
Figura 12: Expressão da heparanase-1 em tecido tumoral e não neoplásico de pacientes com carcinoma de células renais-----	61
Figura 13. Imunohistoquímica do tecido renal de pacientes com carcinoma de células renais com utilização apenas de anticorpos secundários-----	63

Figura 14. Identificação por imunohistoquímica de heparanase-1 e heparanase-2 em região não neoplásica de tecido renal de pacientes com carcinoma de células renais-----	64
Figura 15. Identificação por imunohistoquímica de heparanase-1 e heparanase-2 em região tumoral de tecido renal de pacientes com carcinoma de células renais-----	65
Figura 16. Quantificação digital da expressão das isoformas de heparanases em tecidos tumorais-----	68
Figura 17. Eletroforese para quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados (GAG)-----	69
Figura 18: Glicosaminoglicanos sulfatados em carcinoma de células renais---	71
Figura 19. Comparação entre a concentração de glicosaminoglicanos sulfatados nos tecidos tumorais e não neoplásicos-----	74
Figura 20. Glicosaminoglicanos sulfatados urinários-----	76
Figura 21. Dosagem de ácido hialurônico urinário-----	77

SUMÁRIO

Resumo-----	01
Abstract-----	04
1 - Introdução	
1.1 - Epidemiologia-----	07
1.2 - Fisiopatologia molecular e genética do carcinoma renal-----	08
1.3 - Histologia e morfologia do carcinoma renal-----	10
1.4 - Fatores prognósticos-----	11
1.5 - Marcadores tumorais-----	14
1.6 - Tratamento atual-----	16
1.7 - Biologia molecular-----	18
1.8 - Glicosaminoglicanos-----	21
1.8.1 - Glicosaminoglicanos na membrana basal glomerular-----	23
1.8.2 - Heparan sulfato-----	24
1.8.3 - Condroitim sulfato-----	26
1.8.4 - Dermatan sulfato-----	26
1.8.5 - Ácido hialurônico-----	27
1.9 - Heparanase-----	30
1.9.1 - Heparanase e o desenvolvimento de tumores e metástases-----	32
2 - Objetivos-----	36
3 - Materiais e métodos-----	38
3.1 - Amostras-----	39
3.2 - Extração do RNA total dos tecidos renais obtidos após a cirurgia-----	41
3.3 - Obtenção do cDNA a partir do RNA total-----	41

3.4 - Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)-----	42
3.5 - Eletroforese em gel de agarose para visualização das reações de amplificação por PCR-----	43
3.6 – RT-PCR em tempo real-----	43
3.7 - Imunohistoquímica-----	44
3.8 - Quantificação digital das reações de imunohistoquímica-----	46
3.9 - Extração dos glicosaminoglicanos sulfatados do tecido renal-----	48
3.10 - Extração dos glicosaminoglicanos urinário-----	48
3.11- Eletroforese em gel de agarose para análise dos glicosaminoglicanos sulfatados-----	49
3.12 - Dosagem de ácido hialurônico-----	50
3.13 - Análises estatísticas-----	51
4 - Resultados-----	53
4.1 - Reações de amplificação para determinação da expressão da heparanase por análise de RT-PCR semi-quantitativa-----	55
4.2 - Análises imunohistoquímicas-----	62
4.3 – Identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados nas amostras de tecidos renais tumorais e não neoplásicos-----	69
4.4 - Glicosaminoglicanos sulfatados na urina-----	74
4.5 - Análise do ácido hialurônico urinário-----	77
5 - Discussão-----	78
6 - Conclusão-----	87
7 - Referências bibliográficas-----	90
8 - Anexos-----	103

RESUMO

Introdução: Os estudos das alterações de componentes da matriz extracelular (MEC) auxiliam na compreensão da fisiopatologia do desenvolvimento dos tumores. A investigação e identificação de novos marcadores moleculares em amostras de tecidos, sangue ou urina para o estadiamento da doença e melhor informação do prognóstico também ajuda na descoberta de moléculas alvo para novas alternativas de tratamento com menor toxicidade e maior eficiência.

Objetivos: Identificar e quantificar glicosaminoglicanos e isoformas de heparanases nos tecidos tumorais e não neoplásicos de pacientes com carcinoma de células renais e glicosaminoglicanos sulfatos e ácido hialurônico na urina de pacientes com carcinoma de células renais comparando-se com indivíduos saudáveis. **Métodos:** Este estudo foi constituído da análise de 24 pacientes submetidos à nefrectomia radical ou parcial apresentando diagnóstico anatomopatológico de carcinoma de células renais, sendo quantificada a expressão da heparanase-1 (HPA1) por RT-PCR semi-quantitativo e RT-PCR em tempo real em amostras de tecido de carcinoma de células renais (tecido tumoral e não neoplásico). A expressão das isoformas de heparanases (HPA1 e HPA2) foi analisada utilizando imunohistoquímica. O perfil de glicosaminoglicanos sulfatados foi identificado e quantificado em 11 fragmentos de tecidos tumorais e tecidos não neoplásicos de carcinoma de células renais, utilizando eletroforese em gel de agarose. Os glicosaminoglicanos sulfatados e ácido hialurônico também foram analisados em amostras de urina dos pacientes com carcinoma de células renais, comparando-se com amostras de indivíduos

saudáveis. **Resultados:** Os tecidos tumorais apresentaram aumento significativo da expressão da heparanase-1 (HPA1) comparativamente com os tecidos não neoplásicos, respectivamente, $(3,99 \pm 0,25)$ e $(2,09 \pm 0,20)$, ($P < 0,05$). A análise imunohistoquímica demonstrou que ambas isoformas HPA1 e HPA2, encontram-se expressas em tecido tumoral e não neoplásico de carcinoma de células renais. Entretanto, HPA1 apresenta aumento significativo de imunomarcação em tecido tumoral quando comparado com tecido não neoplásico ($P < 0,002$). Tal resultado não foi observado para a isoforma HPA2. Os resultados sugerem que a isoforma enzimaticamente ativa de 50 kDa da HPA1, identificada com o anticorpo HPA1 C20 parece ser a isoforma diferencialmente expressa nos tumores de células renais. Os tecidos tumorais apresentaram significativa diminuição na quantidade de heparam sulfato e dermatam sulfato e aumento do condroitim sulfato comparativamente com os tecidos não neoplásicos de carcinoma de células renais, respectivamente, HS $(3,6 \pm 3,5)$ e $(17,6 \pm 20,5)$, ($P < 0,007$); DS $(16,9 \pm 21,7)$ e $(44,2 \pm 28,5)$, ($P < 0,04$); CS $(50,6 \pm 37,2)$ e $(10,0 \pm 9,4)$, ($P < 0,001$). As análises de glicosaminoglicanos sulfatados urinários e ácido hialurônico entre os pacientes com carcinoma de células renais e indivíduos saudáveis não apresentaram diferenças estatísticas significantes. **Conclusão:** HPA1 e o condroitim sulfato que essencialmente encontram-se aumentados nos tecidos tumorais sugerem que tais moléculas possam estar envolvidas com modificações e remodelação da matriz extracelular podendo participar do processo de desenvolvimento dos

tumores de células renais, portanto, servir como marcadores e/ou alvo de terapias anti-tumorais em estudos futuros.

ABSTRACT

Introduction: The studies of extracellular matrix (ECM) alterations can be useful to understand the physiopathology of tumor development. The research and identification of new molecular markers in the tissues, blood and urine samples to perform a better diagnostic and prognostics can also help to discover new target molecules for alternative treatment with less toxicity and more efficiency.

Objectives: Identify and quantify glycosaminoglycans and heparanases isoforms in the tumor tissues and non neoplastic tissues from renal cell carcinoma patients and sulfated glycosaminoglycans and hyaluronic acid in the urine samples from renal cell carcinoma patients compared to healthy individuals. **Methods:** This study evaluated 24 patients subjected to radical or partial nephrectomy with previous renal cell carcinoma diagnostic from anatomopathology. Heparanase-1 (HPA1) expression was quantified by semi-quantitative RT-PCR and real time RT-PCR, using renal cell carcinoma samples (tumor and non neoplastic tissues). Heparanases isoforms (HPA1 and HPA2), were also analyzed by immunohistochemistry. Sulfated glycosaminoglycans profile had been identified and quantified in 11 tumor and non neoplastic samples from renal cell carcinoma patients using agarose gel electrophoresis. Sulfated glycosaminoglycans and hyaluronic acid were also analyzed in urine samples from renal cell carcinoma patients compared to the healthy individuals' samples. **Results:** There was a significant higher heparanase-1 (HPA1) expression in the tumor tissues compared with the non neoplastic tissues, respectively, (3.99 ± 0.25) and (2.09 ± 0.20), ($P < 0.05$). Immunohistochemistry analysis had shown that both

HPA1 and HPA2 isoforms were expressed in the tumor and non neoplastic tissues from renal cell carcinoma patients. However, HPA1 presents a significant higher immunolabeling in the tumor tissue compared to the non neoplastic tissue ($P < 0.002$). The same result was not observed for HPA2 isoform. Taken together the results suggest that the enzymatically active 50 kDa isoform of HPA1, identified using HPA1 C20 antibody, seems to be the isoform differentially expressed in renal cell tumors. Tumor tissues presented significant decrease of heparan sulfate (HS) and dermatan sulfate (DS) and higher chondroitin sulfate (CS), compared to the non neoplastic renal cell carcinoma tissues, respectively, for HS (3.6 ± 3.5) and (17.6 ± 20.5), ($P < 0.007$); DS (16.9 ± 21.7) and (44.2 ± 28.5), ($P < 0.04$); CS (50.6 ± 37.2) and (10.0 ± 9.4), ($P < 0.001$). The analysis showed that sulfated glycosaminoglycans and hyaluronic acid in the renal cell patients and healthy individual urinary samples did not present any significant statistic difference. **Conclusions:** HPA1 and chondroitin sulfate are essentially higher in tumor tissues suggesting that these molecules could be involved with extracellular matrix modifications and remodelling that participates into renal cell tumor development, and consequently be used as markers and/or target for anti-tumor therapy in future studies.

1 – INTRODUÇÃO

1.1- Epidemiologia

O carcinoma de células renais é responsável por 3% de todos os tumores no adulto, sendo o câncer urológico mais letal, com uma predominância em homens sobre mulheres de 1,5:1, ocorrendo principalmente entre 60-70 anos. Desde 1950, a incidência anual tem crescido 130%, com uma taxa de 3,7% por ano¹. Nos Estados Unidos, a incidência alcançou 51190 novos casos e 12890 mortes em 2007¹ e 54390 novos casos e 13010 mortes em 2008^{1,2}. O principal responsável pelo aumento do diagnóstico desse tumor é uma maior frequência na realização de exames de imagem de rotina, levando ao diagnóstico incidental de lesões renais sólidas. Cerca de 54% dos tumores renais são diagnosticados no estágio inicial, 20% são localmente avançados e 25% já apresentam metástases³. Quando o tumor renal apresenta metástase, o tratamento torna-se pouco efetivo devido à resistência tumoral, não sendo eficazes a radioterapia e a quimioterapia. A sobrevida geral de 5 a 10 anos é de 65% e 56%, respectivamente, enquanto os pacientes com doença metastática apresentam uma sobrevida de 2 anos de 0 a 20%⁴.

Estudos tentam correlacionar os fatores externos que predisõem ao carcinoma de células renais, porém, o único fator ambiental relacionado com o aumento da incidência do carcinoma renal é o tabagismo, aumentando o risco entre 1,4 a 2,3 vezes quando comparado com pacientes não tabagistas⁵. Várias outras possíveis causas do carcinoma renal foram estudadas. A obesidade eleva o risco provavelmente devido aos níveis de estrogênios aumentados e a maior disponibilidade de fatores de crescimento tipo “insulina-like”⁶. A hemodiálise é

um fator predisponente importante para o tumor renal de células claras. Ocorre um aumento no risco de ocorrer carcinoma de células renais de 0,1% por paciente, a cada ano de hemodiálise⁶. O avanço no estudo das doenças genéticas e da biologia molecular serviu para aumentar a compreensão da fisiopatologia do carcinoma de células renais, descobrindo novas drogas para o tratamento e tentando estabelecer novos marcadores tumorais para o diagnóstico precoce e prognóstico da evolução da doença, podendo servir também como possíveis alvos para terapias antitumorais.

1.2- Fisiopatologia molecular e genética do carcinoma de células renais

A identificação dos oncogenes e genes supressores foi de fundamental importância para o entendimento da fisiopatologia do tumor renal. A forma familiar mais comum é a doença de von Hippel-Lindau (VHL), que corresponde a uma rara doença autossômica dominante com a frequência de 1/36.000 pessoas^{7,8}. O desenvolvimento do carcinoma de célula renal nesses pacientes ocorre entre 70-80%, geralmente entre os 40 e 50 anos de idade.⁸ O gene VHL supressor de tumor é composto por 213 aminoácidos, está localizado no cromossoma 3q25-26 e está envolvido na regulação da transcrição⁹. Várias funções já foram definidas para esse gene, tais como regulação da hipoxia, angiogênese, apoptose, metabolismo da glicose e fator de crescimento¹⁰. A fisiopatologia da falha da proteína do gene VHL está demonstrada na Figura 1.

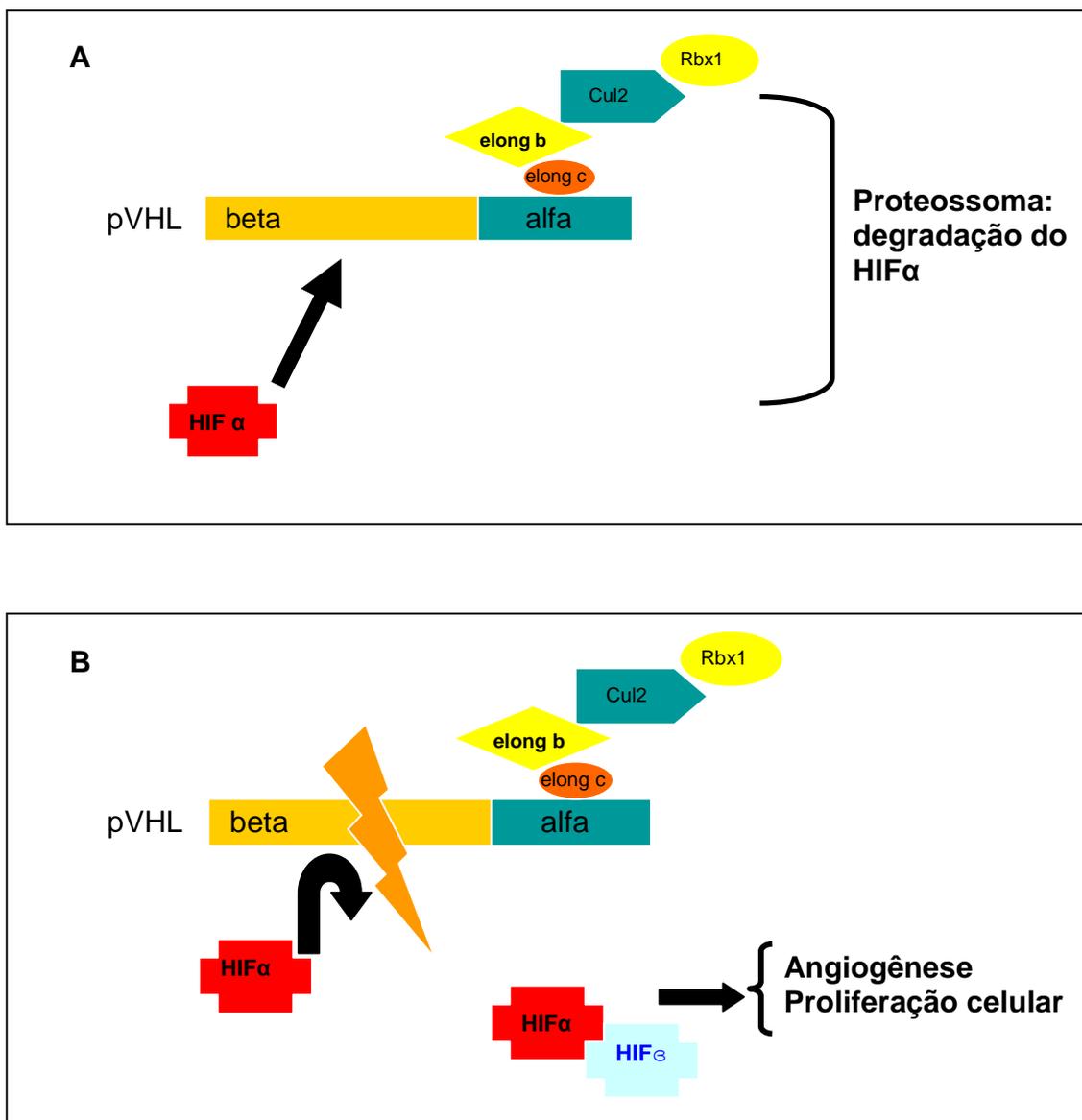


Figura 1. Relação da proteína do gene VHL com a fisiopatologia do carcinoma de células renais. A) A proteína do gene supressor de tumor de von Hippel-Lindau (pVHL) que possui dois subdomínios, beta e alfa. O subdomínio alfa se liga a um complexo protéico, composto pelas proteínas elonguina C, B, Cul2 e Rbx1, Essas reações estimulam a ligação do subdomínio beta com o fator de indução de hipoxia (HIF α), que corresponde a um fator de transcrição. Posteriormente, o HIF α é degradado no proteossoma. Esses subdomínios são os locais onde ocorrem a maioria das mutações relacionadas com a doença de VHL produzindo uma afinidade do pVHL pelo HIF α ^{8,10}. **B)** Em condições de hipoxia, o HIF α não é hidroxilado e permanece ativo por mais tempo, pois não sofre ubiquitinação e não é degradado pelo proteossoma. Após a sua estabilização, o HIF α é transportado para o interior do núcleo e se une ao HIF ϵ . A união dos HIF α e ϵ atua como um fator de transcrição dos genes relacionados com a angiogênese, proliferação celular, aumento da expressão de fatores de crescimento VEGF, PDGF, EGFR, TGF-alfa e FGF, os quais estimulam os receptores localizados na membrana plasmática dos vasos sanguíneos e das células renais a ativar outros receptores e proteínas, gerando sinalizações e ocorrendo o crescimento do tumor e sua neovascularização¹¹.

A carcinogênese do tumor renal pelo gene VHL pode estar relacionado com a característica hereditária do paciente herdar um alelo com a mutação do VHL, conhecido como haplo-insuficiente para VHL ou ocorrer uma perda heterozigótica (LOH), em que transforma o haplo-insuficiente VHL em célula para a carcinogênese. O caminho em que ocorre a LOH do VHL é indeterminado e pode variar dependendo da hereditariedade. No rim VHL, a LOH do gene VHL pode ser demonstrada, sendo que isso não ocorre no tecido renal normal^{7,8}.

1.3- Histologia e morfologia do carcinoma renal

O carcinoma de células renais apresenta tipos histológicos diferentes sendo que o mais freqüente é o carcinoma de células claras (70-80%), originado primariamente nas células do túbulo contornado proximal. O carcinoma papilar ou tubulopapilar (10-15%) é derivado da porção mais cortical dos ductos coletores e geralmente é hipovascular, apresentando um prognóstico mais favorável. O carcinoma cromóforo (4-5%) também é originado da porção cortical dos ductos coletores. O carcinoma de Bellini (1%) origina-se da porção distal do néfron, sendo mais freqüente em pessoas jovens e apresenta um pior prognóstico^{12,13}. O carcinoma medular origina-se nas papilas renais, ocorre principalmente em jovens negros e também apresenta um mau prognóstico. Outro tipo de tumor é a variante sarcomatóide (1-5%), o qual não é considerado um tipo histológico distinto^{12,13}.

A graduação das características anatomopatológicas tem sido realizada para classificar e realizar o prognóstico das neoplasias. O sistema de

classificação de Fuhrman é baseado nas características nucleares das células tumorais: tamanho do núcleo, forma e presença ou ausência de nucléolos proeminentes. Essa classificação está associada como um importante fator isolado de prognóstico do tumor de células renais¹⁴. A Tabela 1 descreve as características observadas na classificação de Fuhrman.

Tabela 1. Sistema de Classificação de Fuhrman

Grau	Tamanho do núcleo	Margem do núcleo	Nucléolo
1	10 mm	Redondo, uniforme	Ausente
2	15 mm	Irregular	Pequeno (visível com 400x magnificação)
3	20 mm	Irregular	Proeminente
4	> 20 mm	Bizarro, multilobulado	Proeminente, cromatina agrupada

1.4- Fatores prognósticos

Várias características tumorais tais como anatômicas, histológicas, clínicas e moleculares, têm sido pesquisadas na tentativa de prognosticar a evolução do tumor renal. Os estudos baseados nesse tema ajudaram a entender melhor o comportamento do tumor renal e o real significado de determinadas características dessa patologia¹⁵⁻¹⁷. Por esse motivo, os sistemas de estadiamento dos tumores têm sido muito utilizados, porém, reformulados constantemente, visto que tais classificações apresentam falhas e questionamentos sobre seus reais valores, principalmente quando são utilizados de forma isolada. Por esse motivo, devem-se utilizar várias informações

conjuntas, como os achados clínicos, o exame físico, o resultado da anatomia patológica, o grau de Fuhrman, invasão microvascular, invasão de sistema coletor, presença de características sarcomatóides e necrose tumoral.

O sistema de classificação de tumores malignos TNM (T: extensão do tumor primário, N: a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais, M: a ausência ou presença de metástase à distância) teve algumas modificações nos últimos 10 anos devido a algumas controvérsias relacionadas com a invasão de vasos, gordura peri-renal e do seio renal, tamanho do tumor e invasão da adrenal¹⁵⁻¹⁷.

O aumento do tamanho do tumor está associado com uma maior possibilidade de metástase, indiferenciação celular¹⁸, invasão de estruturas adjacentes e pior prognóstico¹⁹, mas ainda é discutido qual o tamanho limite que apresenta uma importância significativa na evolução do paciente²⁰.

O estadio pT3 da classificação TNM, ainda apresenta dúvidas e controvérsias^{15,21}. Um estudo concluiu que o TNM 2002 inclui no pT3a pacientes com prognóstico diferentes como invasão da adrenal, invasão da gordura peri renal ou o pT3b/c com invasão venosa isolada e invasão venosa associada a envolvimento da gordura peri renal. De acordo com esse estudo, os pacientes apenas com invasão da gordura perirrenal ou invasão da gordura do seio renal têm um menor risco de morte pela doença. Os pacientes com invasão venosa e da gordura perirrenal concomitante, ou invasão da gordura perirrenal e seio renal ao mesmo tempo ou apenas invasão da adrenal têm um pior prognóstico²².

Em uma análise multivariada, o tipo histológico do tumor não apresentou importância isolada no prognóstico do paciente quando comparada com outros fatores prognósticos²³. Entretanto, em outro estudo foi observado que o carcinoma de células renais papilar e cromóforo apresentaram uma melhor sobrevida do que o carcinoma de células claras quando a doença estava localizada. Quando houve tumor extra renal, não houve diferença na sobrevida em 5 anos¹³.

O grau de Fuhrman demonstrou valor prognóstico quando foi comparado em grandes séries, entretanto o prognóstico não foi diferente entre o grau 1 e 2. Quando foi feita uma comparação com outros fatores em uma análise multivariada, o grau de Fuhrman apresentou significância quando foi unido com outros fatores prognósticos, como o tamanho do tumor e presença de necrose¹⁴.

A necrose tumoral foi demonstrada como um fator prognóstico para o tumor de células claras e cromóforo²⁴, mas a extensão da necrose histológica não foi um fator prognóstico independente na sobrevida desses pacientes. Esse estudo relata que alguns trabalhos citam a importância da necrose tumoral como fator prognóstico, entretanto outros negam essa associação²⁵.

Quando todos esses fatores prognósticos são aplicados isoladamente, ocorre uma perda na capacidade de determinar o prognóstico da patologia. Entretanto, quando esses fatores prognósticos são aplicados conjuntamente em forma de um nomograma existe uma melhora na determinação do prognóstico do paciente. Os nomogramas foram desenvolvidos para aprimorar a

possibilidade de prognosticar a evolução da neoplasia. Os nomogramas mais utilizados são o Motzer, Soberlini, UISS e Heidelberg.

1.5- Marcadores tumorais

O crescimento do tumor provoca mudanças biomoleculares na membrana basal e matriz extracelular, com liberação de várias moléculas, podendo ser possível a mensuração desses componentes na urina ou no sangue. Na última década, houve uma corrida intensa para pesquisar marcadores moleculares. Grandes avanços foram realizados durante esse período, mas muitas perguntas ainda continuam sem respostas.

O antígeno Ki-67 e o AgNORs são marcadores de proliferação celular, ambos apresentaram significância prognóstica em análises univariadas e multivariadas, incluindo o grau e o estadio do tumor. O aumento da expressão do Ki-67 apresentou uma redução da sobrevida dos pacientes com carcinoma de células claras, podendo identificar pacientes com alto risco de recidiva e progressão tumoral^{26,27}.

O p27^{Kipl} é um importante regulador do ciclo da atividade celular, sendo expresso em várias fases do ciclo celular. No carcinoma de células renais, a redução da expressão do p27^{Kipl} foi correlacionada com o aumento do tamanho tumoral, aumento do grau histológico e estadio mais avançado²⁸.

O G250/Mn/CA9 é um anticorpo monoclonal, específico para a enzima anidrase carbônica, capaz de regular o pH intracelular e extracelular em resposta a hipoxia tumoral e subsequente metabolismo anaeróbico, sendo

identificado em 86% do carcinoma de células renais e apenas 9% de tecido normal²⁹. Estudos relatam que o G250/Mn/CA9 é um marcador tumoral potencial²⁹.

A utilização isolada dos marcadores moleculares ainda não apresenta uma aplicabilidade clínica devido aos resultados serem contraditórios. Assim, foi desenvolvido um sistema de estadiamento molecular utilizando vários tipos de marcadores moleculares ao mesmo tempo para tentar aperfeiçoar o prognóstico desses marcadores. O sistema de estadiamento integrado molecular foi criado com a união dos marcadores de imunohistoquímica Ki-67, p53, gelsolina, CAIX, CAXII, PTEN, EpCAM, vimentina. Esses marcadores foram analisados em pacientes com diagnóstico de RCC, sendo observado aumento do Ki-67, p53, vimentina e gelsolina, correlacionando com pior prognóstico enquanto que o inverso foi obtido com os marcadores CAIX, PTEN, CAXII e EpCAM^{30,31}. Em uma análise multivariada, a presença de metástase, expressão de p53, CAIX e gelsolina demonstraram-se preditores de prognóstico de sobrevida e foram utilizados para criar um modelo de prognóstico. Esse modelo, baseado apenas em informações de marcadores moleculares, funcionou melhor que as variáveis clínicas e foi tão bom quanto o UISS (Sistema Integrado de Estadiamento da Universidade da Califórnia – Los Angeles, o qual é a união do TNM, *status* performance e grau de Fuhrman).

Atualmente, existe um esforço em estudar a união dos fatores prognósticos clínico patológicos com os marcadores moleculares. A intenção é criar um sistema integrado clínico molecular, o qual apresente uma sensibilidade

e especificidade maior para determinar o prognóstico do paciente e o tratamento com melhor acúrcia.^{30,31}

1.6 - Tratamento atual

A nefrectomia radical continua sendo o tratamento padrão para o carcinoma de células renais³². Nas últimas duas décadas, novos conceitos foram estabelecidos no tratamento cirúrgico do tumor renal. O desenvolvimento de novas técnicas e materiais cirúrgicos permitiu o tratamento do tumor renal com técnicas minimamente invasivas. A nefrectomia radical laparoscópica³³ e a nefrectomia parcial laparoscópica mantêm os princípios oncológicos³⁴ e são consideradas como uma alternativa para a cirurgia aberta^{35,36}.

Nos últimos 10 anos foram desenvolvidas novas técnicas minimamente invasivas, oferecendo alternativas para a cirurgia convencional e reduzindo a morbidade e mortalidade dos pacientes. A crioablação, ablação por radiofrequência percutânea, ablação por microondas e a ablação por ultrassonografia de alta intensidade (HIFU) podem ser realizadas em pacientes com tumores menores do que 4 cm, múltiplos tumores, doenças genéticas com maior possibilidade de ter novas lesões tumorais e paciente com rim único.

O tratamento das neoplasias avançadas é um problema médico complexo. Como esses tumores são resistentes à radioterapia e quimioterapia, apenas a imunoterapia consegue aumentar um pouco a sobrevida desses pacientes e ainda assim a sobrevida em 10 anos alcança menos de 10%^{37,38}.

O interferon alfa demonstrou uma superioridade sobre a terapia hormonal, apresentando uma taxa de resposta de 6 a 15%, uma diminuição da progressão do tumor em 25%, e uma melhora na sobrevida de apenas 3 à 5 meses quando comparada com placebo^{39,40}. Outro estudo demonstrou que o IFN + IL-2 aumenta a taxa de resposta e progressão livre da doença sobre IL-2 ou IFN sozinhos^{41,42}.

A combinação IL-2, IFN e fluoracil é bastante ativa, aumentando a sobrevida quando comparado com IFN + vinblastina⁴³. Um estudo realizado por um grupo francês comparou o uso de IL-2, IFN, medroxiprogesterona ou a combinação das citocinas em pacientes com prognóstico intermediário. O resultado desse estudo não demonstrou melhora na sobrevida dos pacientes que utilizaram as citocinas⁴².

Dessa forma, existe um consenso que essas drogas não devem ser utilizadas em pacientes com prognóstico ruim e novas terapias devem ser utilizadas como primeira linha. Em pacientes com bom prognóstico as citocinas continuam como uma opção terapêutica. Os pacientes com prognóstico intermediário, o tratamento alvo deve ser utilizado como primeira linha, mas ainda necessita de novos estudos⁴⁴.

Novas drogas estão sendo utilizadas para bloquear os receptores do VEGF e PDGF. A tirosina quinase está envolvida na sinalização e funcionamento desses fatores de crescimento, assim os inibidores da tirosina quinase estão sendo bastante pesquisados em pacientes com carcinoma de células renais metastático. As quatro principais drogas que agem como

substâncias antiangiogênicas e têm resultados mais satisfatórios são o temsirolimus, bevacizumab, sorafenibe e sunitinibe.⁴⁵⁻⁴⁷

Assim, de acordo com a determinação da ASCO 2006, o tratamento padrão para o carcinoma renal avançado deve ser feito de acordo com o grupo de risco: no tratamento de primeira linha, o sunitinibe deve ser a terapia para os grupos de bom e intermediário risco, o temsirolimus para os grupos de risco ruim. Nos grupos de risco bom, o papel das citocinas pode continuar a esperar alcançar uma remissão completa, principalmente com altas doses de IL-2 na segunda linha de tratamento. Após a falha do tratamento das citocinas e quimioterápicos, o sorafenibe pode ser o tratamento padrão^{17,44}.

1.7 – Remodelamento da matriz extracelular e a transformação neoplásica

A matriz extracelular que estruturalmente está dividida em membrana basal, matriz conectiva e matriz sanguínea caracteriza-se por ser uma estrutura complexa formada por proteínas secretadas e glicoconjugados que interagindo tridimensionalmente originam uma rede molecular capaz de regular as funções celulares, como a diferenciação e a expressão de genes específicos para cada tecido.

As interações entre as células e a matriz extracelular podem ser total ou parcialmente alteradas nas neoplasias, o que pode influenciar a proliferação e a invasão tumoral, incluindo o carcinoma renal^{48,49}.

Durante a transição do carcinoma invasivo *in situ*, as células tumorais penetram na membrana basal e atravessam o estroma, ganhando acesso aos vasos linfáticos e sanguíneos e então, disseminam-se. Há três passos bem caracterizados das células tumorais que estão envolvidos com a cascata metastática: 1) Perda da interação célula-célula, que é efetuada principalmente pelas caderinas, onde os receptores específicos vão ligar-se aos componentes da matriz extracelular, como a laminina e fibronectina. 2) Degradação da matriz extracelular pelas células tumorais pela ativação de metaloproteínas, colagenases, plasmina, catepsinas, glicosidases e heparanase⁵⁰, enzimas associadas com a invasão, onde a principal característica é a desorganização e fragmentação dos elementos do estroma e da membrana basal. 3) Síntese dos componentes de matriz pelas células tumorais que locomovem-se para outros órgãos após terem migrado através dos vasos sanguíneos.

Apesar da perda de inibição e da proliferação por contato, as células tumorais precisam passar a barreira representada pela membrana basal que apresenta características moleculares bastante conservadas, sendo constituídas por quatro moléculas principais que são laminina, colágeno tipo IV, entactina e proteoglicanos.

Os proteoglicanos são macromoléculas formadas por um esqueleto protéico ao qual estão covalentemente ligados a cadeia(s) de glicosaminoglicanos (açúcares lineares) e de oligossacarídeos do tipo O-ligados e/ou do tipo complexo N-ligados. Os glicosaminoglicanos são constituídos de unidades dissacarídicas repetitivas formadas alternadamente

por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e um açúcar não nitrogenado, o ácido urônico (ácido glucurônico ou idurônico)⁵¹⁻⁵³.

Os glicosaminoglicanos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, quanto ao grau de sulfatação e à posição em que estão sulfatados. A Figura 2 mostra os principais componentes dissacarídicos de cada glicosaminoglicano bem como os tipos de ligações glicosídicas presentes, tanto interdissacarídica como intradissacarídica.

Além das funções estruturais, a matriz extracelular participa de vários eventos celulares como adesão, migração, proliferação, diferenciação celular e apoptose, pela interação entre as moléculas da matriz extracelular e receptores da superfície celular, tais como proteoglicanos, glicosaminoglicanos, proteases e glicosidases como heparanase, desencadeando eventos de sinalização celular⁵⁴. Por essa razão, nesse estudo foram aprofundadas as investigações em avaliar as alterações de determinados componentes da matriz extracelular no carcinoma de células renais como glicosaminoglicanos e heparanase para melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dos tumores.

Portanto, a biologia molecular tem tido papel fundamental na compreensão das alterações estruturais e funcionais das células tumorais.

1.8 - Glicosaminoglicanos

Estes polímeros possuem alta densidade de cargas negativas conferidas pela presença de grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos e/ou grupamentos sulfatos⁵² (Figura 2). Devido à alta densidade de carga negativa, estes compostos são altamente hidrofílicos, capazes de incorporar grande quantidade de água em sua estrutura⁵⁵.

Os principais glicosaminoglicanos conhecidos são heparam sulfato, heparina (HEP), condroitim 4-sulfato (C4S), condroitim 6-sulfato (C6S), dermatam sulfato (DS)⁵⁶, queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (AH)⁵⁷.

Pode ocorrer modificação na posição do carbono 2 (C2) do ácido urônico e nas posições C6 e C3 dos resíduos de glucosamina. A posição C2 da glucosamina pode ser sulfatada, acetilada ou não modificada. Todas essas possíveis combinações resultam numa estrutura bastante diversificada, permitindo diferentes interações e ligação com várias proteínas, como fatores de crescimento, citocinas e enzimas. Entre as proteínas de sinalização, observa-se a importante interação entre os glicosaminoglicanos com fatores de crescimento específicos, como o fator de crescimento de fibroblasto (FGF1 e FGF2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento hepatócito (HGF), fator beta de crescimento de transformação tumoral (TNF- β) e fator de crescimento plaquetário (PDGF).

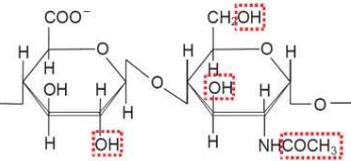
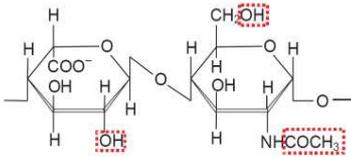
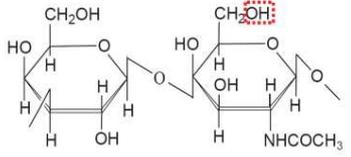
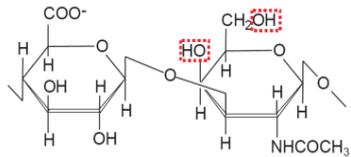
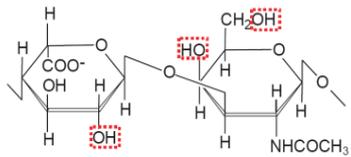
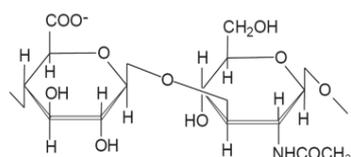
GAG	Acido Hexurônico ou Idurônico	Galactose	Hexosamina	Composição Dissacarídica
Heparam sulfato/ Heparina	Ácido D-glucurônico (GlcA) Acido L-idurônico (IdoA)	-	D-glucosamina (GlcNAc)	 <p>GlcA $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$</p>  <p>IdoA $\alpha(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\alpha(1\rightarrow4)$</p>
Queratam sulfato	-	Galactose (Gal)	D-glucosamina (GlcNAc)	 <p>Gal $\beta(1\rightarrow4)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow3)$</p>
Condroitim sulfato	Ácido D-glucurônico (GlcA)	-	(GalNAc)	 <p>GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$</p>
Dermatam sulfato	Ácido D-glucurônico (GlcA) Acido L-idurônico (IdoA)	-	D-galactosamina (GalNAc)	 <p>IdoA $\beta(1\rightarrow3)$ GalNAc $\beta(1\rightarrow4)$</p>
Acido hialurônico	Ácido D-glucurônico (GlcA)	-	D-glucosamina (GlcNAc)	 <p>GlcA $\beta(1\rightarrow3)$ GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$</p>

Figura 2. Unidade estrutural dos diferentes glicosaminoglicanos. Estrutura das unidades dissacarídicas repetitivas nos diferentes tipos de glicosaminoglicanos (GAG). As possíveis posições de sulfatação em cada GAG estão marcadas em vermelho.

Os tecidos normalmente apresentam um padrão característico de distribuição de glicosaminoglicanos. Entretanto, esse padrão sofre modificações importantes nas células em divisão, nos tecidos tumorais e nos tecidos embrionários.

O início do tumor e a sua progressão estão diretamente relacionados com a complexidade estrutural celular dos glicosaminoglicanos, influenciando em vários aspectos o fenótipo celular tumoral, como crescimento, invasividade e potencial metastático. Evidências recentes demonstraram que nas células tumorais ocorre um processo de transformação que altera a superfície celular, incluindo expressão de determinadas seqüências de cadeias protéicas de proteoglicanos e alterando a estrutura molecular do heparam sulfato de determinado proteoglicano⁵⁸.

1.8.1 - Glicosaminoglicanos na membrana basal glomerular

A membrana basal glomerular é composta de uma camada densa central e duas camadas finas de lâmina rara externa e interna. Já foi demonstrado existir uma grande quantidade de locais aniônicos em todas essas três camadas, que consiste de glicosaminoglicanos, principalmente de heparam sulfato⁵⁹.

A presença de glicosaminoglicanos tem sido demonstrada na urina de pessoas saudáveis, mas a concentração no soro é bastante baixa⁶⁰. A síntese dos glicosaminoglicanos urinários ocorre devido às células que revestem o túbulo renal e trato urinário. Entretanto, estudos demonstram que os

glicosaminoglicanos estão presentes principalmente nos glomérulos. Sendo assim, 1,6 milhões de glomérulos que estão presentes nos rins estão produzindo glicosaminoglicanos⁶⁰. A presença dos glicosaminoglicanos nos glomérulos é bastante dinâmica. Existe a hipótese de que os glicosaminoglicanos urinários refletem o *turnover* dos glicosaminoglicanos nos glomérulos. Devido a isso, tem sido proposto que tais compostos são marcadores de várias patologias benignas e malignas do trato urinário, como nefrite lúpica⁶¹, tumores vesicais^{62,63}, glomerulonefrite⁶⁴, pielonefrite crônica⁶⁰, nefropatia diabética^{6,65}. Foi observado que não existe diferença na concentração de glicosaminoglicanos urinários entre os sexos, mas o envelhecimento do paciente pode diminuir a concentração de condroitim sulfato, enquanto o heparam sulfato pode aumentar ($P < 0,001$)⁶⁶.

1.8.2 - Heparam sulfato

O heparam sulfato é um glicosaminoglicano sulfatado que apresenta como estrutura básica unidades dissacarídicas repetitivas formadas alternadamente por uma hexosamina (glucosamina) e um açúcar não nitrogenado, o ácido urônico (ácido D-glucurônico ou ácido L-idurônico). Existem 48 possíveis unidades dissacarídicas que podem formar uma cadeia completa de heparam sulfato de glicosaminoglicanos com 10-100 unidades dissacarídicas. Dependendo do tipo celular, ocorrem variações no grau de sulfatação, acetilação e na proporção dessas unidades. O heparam sulfato normalmente encontra-se associado a um esqueleto protéico formando proteoglicanos, presentes na superfície celular, matriz extracelular ou presente em grânulos intra-celulares.

Os proteoglicanos de heparam sulfato participam de mecanismos biológicos especializados de reconhecimento e sinalização celular^{67,68}.

O entendimento da atividade biológica dos proteoglicanos de heparam sulfato baseia-se essencialmente na diversidade estrutural das cadeias de heparam sulfato⁵³. Assim, a determinação da seqüência das unidades dissacarídicas do heparam sulfato em tecidos embrionários, adultos, normais e neoplásicos de diferentes patologias, bem como de células normais e células mantidas em cultura fornecem informação sobre a atividade biológica desses compostos^{67,69-72}.

Diversas evidências sugerem que o heparam sulfato desempenhe um importante papel em processos normais e patológicos, como no reconhecimento celular, adesão celular, reparação tecidual, controle do crescimento celular e angiogênese^{67,73,74}. O heparam sulfato está localizado na membrana plasmática e na matriz extracelular⁷⁵, promovendo regulação de interações entre as células e o meio, sendo tais interações importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das funções celulares.

O heparam sulfato é capaz de se ligar a várias proteínas da matriz extracelular⁷⁶ e também interage com várias outras proteínas, como lipoproteína lípase, co-fator II da heparina e uma série de fatores de crescimento, como EGF, FGF e VEGF^{77,78}. O heparam sulfato, ainda, liga-se e regula a atividade de muitas moléculas efetoras capazes de iniciar vias de sinalização críticas para iniciar o crescimento e a progressão do câncer⁷⁹.

1.8.3 – Condroitim sulfato

O condroitim sulfato é formado por N-acetilgalactosamina, podendo estar sulfatado na posição C6 ou na posição C4 e ácido D-glucurônico. É um componente de matriz extracelular e superfície celular que contribui para a resistência à tensão das cartilagens, tendões e ligamentos. O condroitim 4-sulfato ocorre em processos de crescimento e ossificação. Já o condroitim 6-sulfato, parece estar relacionado com a manutenção da integridade de tecidos sujeitos a altas pressões⁸⁰⁻⁸².

Estudos em diversos tecidos neoplásicos mostraram um aumento de condroitim sulfato na matriz extracelular, principalmente do condroitim-6-sulfato^{83,84}.

1.8.4 – Dermatan sulfato

O dermatan sulfato é formado por unidades dissacarídicas repetitivas de N-acetilgalactosamina e ácido D-glucurônico e ácido L-idurônico. Encontra-se amplamente distribuído em vários tecidos de mamíferos, ocorrendo predominantemente em tecidos conjuntivos densos, tais como tendão e pele⁸⁵. Sua função nesses tecidos está possivelmente relacionada à organização, velocidade de deposição e manutenção das fibrilas do colágeno⁸⁶.

Dietrich e colaboradores demonstraram pela primeira vez que células 3T3 “normais”, em fase proliferativa, liberam heparan sulfato para o meio extracelular e retém condroitim sulfato na superfície⁶⁹. Porém, quando essas mesmas células atingem a confluência, o padrão é invertido, sugerindo que a

presença de condroitim sulfato na superfície celular favorece a proliferação celular⁶⁹.

1.8.5 - Ácido hialurônico

O ácido hialurônico (AH) é constituído por uma seqüência repetida de cerca de 25.000 unidades dissacarídicas não sulfatadas, sendo, portanto, o único glicosaminoglicano não sulfatado. Esse glicosaminoglicano também não se encontra ligado a um esqueleto protéico, conseqüentemente não forma proteoglicanos. Está localizado em todos os tecidos do organismo, apresentando a função de resistir à força de compressão nos tecidos e nas articulações, onde está principalmente localizado. A maioria das funções do ácido hialurônico depende de interações específicas com outras moléculas, como proteínas e proteoglicanos⁸⁷.

O ácido hialurônico também denominado hialuronam, representa a forma mais precoce evolucionária dos glicosaminoglicanos. Estruturalmente, o ácido hialurônico é o mais simples dos glicosaminoglicanos, sendo constituído por unidades dissacarídicas repetitivas de ácido β -D-glucurônico e β -D-N-acetilglucosamina, unidas por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow3)$ intradissacarídica e tipo $\beta(1\rightarrow4)$ interdissacarídica⁵⁷ como mostra a Figura 3. A massa molecular varia de 5 a 100 kDa, podendo atingir até 10^4 kDa e comprimento entre 100 a 200 nm⁸⁸.

Na matriz extracelular o ácido hialurônico encontra-se normalmente associado à proteoglicanos, a ligação entre os proteoglicanos e o ácido

hialurônico é estabilizada por uma proteína denominada proteína de ligação, como mostra o esquema da Figura 3.

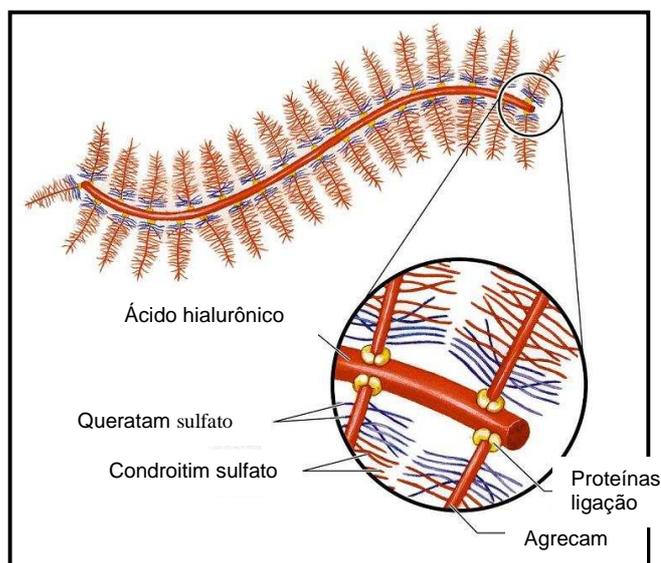


Figura 3. Complexo macromolecular do ácido hialurônico e do agregam na matriz extracelular. A Figura mostra a ligação do ácido hialurônico aos proteoglicanos agregam (constituídos por cadeias de queratam sulfato e condroitim sulfato), mediada pela proteína de ligação (*link protein*).

Nos tecidos, o ácido hialurônico apresenta-se como uma estrutura espiral polidispersa, de alta massa molecular que interage por meio de ligações não covalentes com regiões específicas do esqueleto protéico de proteoglicanos de condroitim sulfato e queratam sulfato (agregam), formando agregados presentes na cartilagem.

O fígado é o principal sítio de liberação e degradação do ácido hialurônico circulante. O ácido hialurônico encontra-se aumentado no soro de pacientes com doenças hepáticas, seguidas de fibrose e hipertensão portal⁸⁹.

A função básica do ácido hialurônico é reter água e regular seu fluxo no tecido. Devido a sua alta viscosidade, o ácido hialurônico contribui atuando como excelente protetor e lubrificante das articulações⁹⁰.

O ácido hialurônico tem também um papel particularmente importante no microambiente celular do câncer⁹¹. Células tumorais exibem diversos sítios de ligação para este glicosaminoglicano, como CD44 e RHAMM (molécula que participa do reconhecimento do ácido hialurônico em processos de migração em vários tipos celulares) e sua adesão pode influenciar na mobilidade celular⁸⁷. Na maioria dos casos, a subsequente diferenciação celular parece estar associada com a diminuição dos níveis de ácido hialurônico. De modo geral, nestes exemplos, quando o movimento celular para e inicia-se a adesão celular, ocorre queda na quantidade de ácido hialurônico e conseqüente diminuição de receptores celulares para esta molécula, bem como um aumento na produção da enzima hialuronidase⁹².

O ácido hialurônico está presente na membrana extracelular, fornecendo suporte estrutural e funcional para as células. Também possui importante papel durante a embriogênese, angiogênese⁹³, cicatrização, inflamação e carcinogênese, participando de processos por associar-se com proteoglicanos e influenciar na adesão e migração celular^{94,95}.

A síntese do ácido hialurônico é promovida por três ácido hialurônico sintases, codificadas pelos genes HAS 1, HAS 2 e HAS 3^{96,97} com diferentes massas moleculares. As propriedades físicas e biológicas do ácido hialurônico são influenciadas pelo tamanho da cadeia. O ácido hialurônico de alta massa

leva à formação de um gel altamente viscoso, promovendo um estado de turgescência na matriz extracelular, o que a torna altamente resistente a forças compressivas. Já o ácido hialurônico de baixa massa molecular estimula o crescimento de células endoteliais, induzindo a angiogênese⁹⁸.

A dosagem do ácido hialurônico tem sido usada como marcador indireto de patologias inflamatórias do fígado⁹⁹. O nível sérico do ácido hialurônico também se apresentou elevado em pacientes com câncer pancreático, de pequenas células do pulmão e da próstata¹⁰⁰.

1.9 - Heparanase

A heparanase é uma endo-beta-glucuronidase que quebra ligações glicosídicas intrassacarídicas do heparam sulfato. Essa enzima foi recentemente clonada, sendo que o gene da heparanase humana apresenta um cDNA de 3.7 Kb. O gene da heparanase ou heparanase-1 (HPA1) é formado por 40 Kb (40.000 pares de bases), composto por 12 exons e 11 introns, localizados no cromossomo 4 humano (4q21,3)¹⁰¹. O gene da heparanase codifica uma sequência de 1.629 pares de bases que corresponde a uma proteína de 543 aminoácidos que apresenta 65 kDa (Figura 4). Entretanto, a proteína madura, isolada de cultura de células e tecidos apresenta 50 kDa, sugerindo um processamento na porção N-terminal. Ainda, há evidências de que um peptídeo de 8 kDa resultante da clivagem proteolítica, que ocorre durante o processamento pós-transcricional, seja importante para a formação de um heterodímero com a

porção 50 kDa para que a heparanase apresente atividade catalítica, porém, tal evidência ainda não está totalmente comprovada^{50,102}.

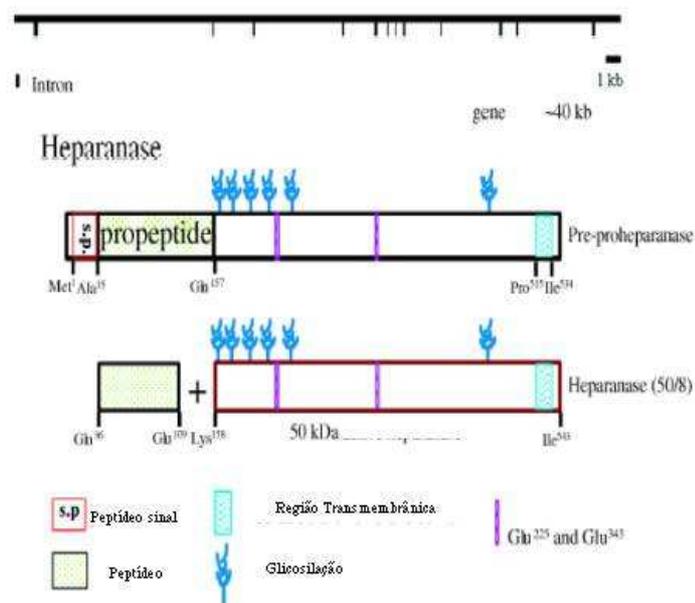


Figura 4. Esquema do gene completo da heparanase-1 localizado no cromossomo 4q21,3. A primeira linha do esquema representa o gene que codifica a enzima heparanase-1 de aproximadamente 40 Kb. Em seguida, temos a representação da forma da pré-enzima inativa (65 kDa), contendo o peptídeo sinal na porção amino terminal, o pró-peptídeo de 8 kDa e o segmento ativo da enzima de 50 kDa com seus respectivos sítios de glicosilação e finalmente a representação da heparanase-1, após o processamento pós-tradução¹⁰³.

A completa solubilização da proteína heparanase-1 de plaquetas humanas, de células tumorais humanas e de rato e do fígado de rato só foi possível mediante a presença de detergente, sugerindo dessa maneira que mais de 25% da heparanase nas células apresentam-se associadas à membrana¹⁰⁴. Ainda, a atividade da heparanase foi detectada em lisossomos de fígado de rato¹⁰⁵, mostrando ser sensível à cloroquina, portanto comprovando a presença desta no compartimento lisossomal. Porém, em ensaios utilizando células tumorais de ovário de rata e células de carcinoma de cólon humano, a

atividade da heparanase-1 mostrou-se insensível à cloroquina, sugerindo que a heparanase-1 nestas células provavelmente esteja localizada em endossomos¹⁰⁶.

Considerando existir possíveis isoformas das heparanases, recentemente, um trabalho da literatura descreveu uma isoforma da heparanase-1 em células COS-7 que perde o exon 5, não possuindo portanto, 174 bp comparando-se com o cDNA da heparanase-1 “selvagem”¹⁰⁷. Tal isoforma da heparanase é expressa como uma proteína de 55 kDa que não é encontrada como proteína de secreção de células tumorais, não possui atividade catalítica sobre as cadeias de heparam sulfato e possui uma localização difusa e não granular como característico da HPA1¹⁰⁷.

Foi reportada a clonagem de um segundo cDNA que codifica uma nova heparanase, designada heparanase-2 humana ou HPA2, codificada pelo cromossomo 10q23-24⁷². Foi observado que existem três isoformas da HPA2 de 480, 534 e 592 aminoácidos. As análises dessas proteínas evidenciam que todas essas isoformas são proteínas intracelulares associadas à membrana, contendo a porção C-terminal voltadas para o citoplasma, não possuindo atividade enzimática¹⁰⁸.

1.9.1- Heparanase e o desenvolvimento de tumores e metástases

A heparanase-1 está envolvida com a degradação das cadeias de heparam sulfato dos proteoglicanos, essencialmente presentes na superfície celular (família dos sindecam) e na matriz extracelular, como membrana basal

(perlecan)¹⁰⁹. Como já citado, os níveis elevados de expressão da heparanase em células de mamíferos possuem correlação direta com o desenvolvimento de tumores e metástases^{110,111}. O mecanismo pelo qual a heparanase-1 está envolvida com mecanismos moleculares no desenvolvimento de câncer e metástases, parece estar relacionado com a formação de oligossacarídeos biologicamente ativos, resultantes da degradação das cadeias de heparan sulfato, que por sua vez, estão envolvidos com a proliferação celular, angiogênese e diferenciação celular, como mostra a Figura 5.

Especificamente, o proteoglicano de heparan sulfato sindecam-1 e perlecan encontram-se presentes na superfície de todas as células de mamíferos e sua relação com o desenvolvimento de tumor parece depender de sua degradação por ação da heparanase-1^{108,109}.

Portanto, é evidente na literatura as correlações entre a expressão de proteoglicanos de heparan sulfato, heparanase e desenvolvimento de tumores¹¹⁰.

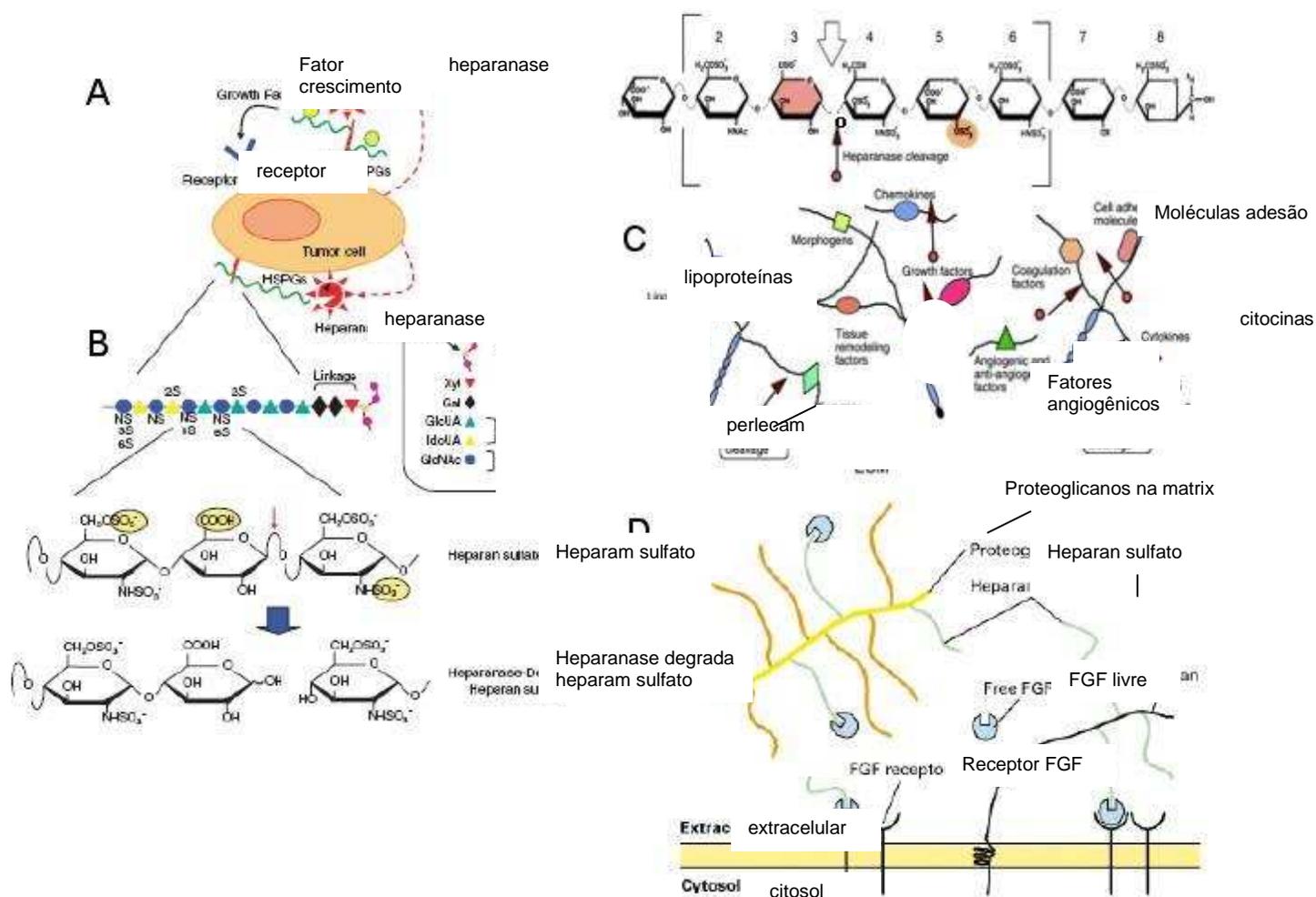


Figura 5: Mecanismo de ação da heparanase-1. **A**, Proteoglicano de heparan sulfato na superfície celular sofre ação da heparanase-1; **B**, Sítio de clivagem da heparanase-1 sobre as cadeias de heparan sulfato dos proteoglicanos de heparan sulfato, liberando oligossacarídeos; **C**, oligossacarídeos gerados por ação da heparanase-1 sequestram moléculas intensificando suas atividades biológicas como fatores angiogênicos, fatores de crescimento, moléculas de adesão, citocinas e lipoproteínas, tornando-as biologicamente ativas; **D**, oligossacarídeos gerados por ação da heparanase aumentam a afinidade do fator de crescimento FGF por seu receptor na superfície celular intensificando a resposta de proliferação celular. Adaptado por ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Outros trabalhos utilizaram técnicas de imunohistoquímica para evidenciar a presença da heparanase-1 na superfície celular e no citoplasma em adenocarcinoma de cólon humano e esôfago ^{112,113}.

Nas células epiteliais de tumores malignos de mama, a heparanase-1 apresenta localização citoplasmática. Uma marcação bastante intensa é encontrada no local do tumor e em tecidos que se encontram invadindo tecidos sadios a partir de ductos mamários, bem como em glândulas lobulares onde se originou o tumor primário¹¹⁴.

O carcinoma de células renais é uma patologia com elevada mortalidade, em que o diagnóstico precoce é importante para iniciar o tratamento do paciente, e aumentar a sobrevida e qualidade de vida do paciente. Entretanto, apesar do esforço para estudar a fisiopatologia biomolecular dessa neoplasia e descobrir um marcador tumoral sensível e eficiente para o diagnóstico precoce, pouco se sabe sobre o comportamento molecular dessa neoplasia e alterações de moléculas da matriz extracelular, que certamente muito contribuem para a evolução da doença.

2 - OBJETIVOS

1. Analisar o padrão de expressão das heparanases (HPA1 e HPA2) em tecido renal acometido por carcinoma de células renais e tecidos renais não acometidos pela neoplasia em pacientes adultos.
2. Identificação e quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados das amostras de tecidos tumorais e de tecidos não acometidos pela neoplasia, obtendo-se o perfil de heparam sulfato, condroitim sulfato e dermatam sulfato em pacientes portadores de carcinoma de células renais.
3. Identificação e quantificação de glicosaminoglicanos sulfatados (heparam sulfato, condroitim sulfato) na urina dos pacientes com carcinoma de células renais, comparando-se com a urina de indivíduos saudáveis.
4. Quantificação de ácido hialurônico na urina de pacientes com carcinoma de células renais, comparando-se com a urina de indivíduos saudáveis..
5. Correlacionar parâmetros clinicopatológicos dos pacientes com carcinoma de células renais com o perfil de glicosaminoglicanos e expressão das heparanases.

3 –MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Amostras. O estudo foi realizado pelas Disciplinas de Urologia e de Bioquímica da Faculdade de Medicina do ABC e pelas Disciplinas de Clínica Médica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo. As amostras dos pacientes foram coletadas no Hospital de Ensino Padre Anchieta, Hospital Estadual Mário Covas e Hospital Santa Marcelina. O grupo caso foi constituído de 31 pacientes submetidos a nefrectomia radical ou parcial, ocorrendo o diagnóstico clínico prévio de neoplasia renal por meio de tomografia computadorizada de abdome total. Foi realizado questionário prévio, estadiamento do tumor por meio de exames radiológicos (TNM 2002)¹¹⁵, incluindo tomografia computadorizada de abdome total e tórax. Em cada rim operado foram retirados dois fragmentos da peça cirúrgica, um contendo tecido tumoral (grupo caso) e outro de tecido macroscopicamente não neoplásico (grupo controle). Esses tecidos foram congelados em nitrogênio líquido logo após a retirada das amostras (tecido tumoral e não neoplásico) e enviados para estudo anatomopatológico e bioquímico, bem como amostras utilizadas para quantificar a expressão da heparanase-1 e realizar a análise dos glicosaminoglicanos sulfatados (condroitim sulfato, heparam sulfato e dermatam sulfato). Das 31 amostras coletadas em cirurgia, 24 amostras (77,4%) foram utilizadas para as análises de expressão da heparanase-1 por RT-PCR e estudos de imunohistoquímica para identificação das isoformas de heparanases, e apenas 11 amostras foram utilizadas para quantificações dos glicosaminoglicanos sulfatados.

Os glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, heparan sulfato e condroitim sulfato) foram dosados nas amostras de urina coletadas durante a noite pré-operatória por um período de 12 horas antes da cirurgia utilizando sonda de Foley número 16. As análises de condroitim sulfato e heparan sulfato urinários foram realizadas em amostras de 27 indivíduos saudáveis e 14 amostras de urina coletadas de pacientes no período pré-operatório e 12 amostras no período pós-operatório. Para a quantificação do ácido hialurônico urinário foram utilizadas 29 amostras de urina de indivíduos saudáveis como controle, 20 amostras coletadas de pacientes antes da cirurgia e 13 amostras no período pós-operatório. A perda no número de amostras de urina ocorreu por motivo de hematúria durante a coleta, o que prejudicava as análises bioquímicas, dificuldade de obtenção das amostras principalmente no período pós-operatório por retorno de alguns pacientes na data determinada da coleta.

O grupo controle das amostras de urina foi composto por indivíduos acompanhados em ambulatório que foram excluídos de doença renal inflamatória ou maligna, hepatopatia, disfunção renal por meio de história clínica, questionário, exames laboratoriais (hemograma completo, uréia, creatinina, TGO, TGP, PSA, TSH e sorologia para hepatite B e C), ultrassonografia renal e de vias urinárias e radiografia de tórax. Esses indivíduos foram voluntariamente obtidos no ambulatório da Urologia da Faculdade de Medicina do ABC. Todos os pacientes e participantes dos grupos assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (Anexo 5). Os procedimentos foram submetidos e aprovados no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina do ABC, processo

número 157/2004; Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP, processo número 1371/06 e Comitê de Ética em Pesquisa da Casa de Saúde Santa Marcelina, processo número 17/2005 (Anexo 6).

3.2 - Extração do RNA total dos tecidos renais obtidos após a cirurgia.

O RNA total dos fragmentos dos tecidos foi extraído para posteriormente identificar e quantificar a expressão da heparanase-1. A extração do RNA total foi realizada após o tecido renal ser homogeneizado em nitrogênio líquido utilizando almofariz e pistilo de porcelana estéreis. Em seguida, foram adicionados 700 μL da solução de TRIZOL[®] (Life Technologies) ao tecido totalmente homogeneizado e a extração do RNA total seguiu o protocolo descrito pelo fabricante. O RNA total de cada amostra foi quantificado no aparelho Gene Quant RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech[®]). Inicialmente, foi quantificado apenas o RNA, e posteriormente foi verificada a relação 280 / 260 nm, que caracteriza a pureza das amostras, isto é, se está livre de contaminações por DNA e proteínas. As análises quantitativas obtidas após a extração de RNA estão demonstradas na tabela do Anexo 1.

3.3 - Obtenção do cDNA a partir do RNA total.

Após a extração do RNA total foi realizada a obtenção do cDNA, utilizando-se o "kit" de RT-PCR da marca Invitrogen[®] (*Super Script II*). Foram adicionados 2 μg de RNA total, 1 μL do "primer" ou oligonucleotídeo iniciador oligo dT (10 μM), em um eppendorf, completando o volume com água MiliQ autoclavada até 12 μL . Primeiramente, o

molde de RNA, juntamente com 1 μ L do "*primer*" Oligo dT (10 mM) foram submetidos por 10 minutos a 70°C. Em seguida, foi adicionado uma mistura de 4 μ L de tampão 5x, da enzima transcriptase reversa, 2 μ L de DTT 0,1M (dietiltreitol) e 1 μ L de dNTPs 10 mM (nucleotídeos trifosfatados); que foi submetida por 10 minutos a 25°C e 2 minutos a 42°C. Por último, foi adicionado 1 μ L da enzima *Super Script II* (transcriptase reversa), submetendo esta mistura por 48 minutos a 42°C, (obtenção do cDNA) e 10 minutos a 70°C (inativação da transcriptase reversa). Os cDNAs obtidos a partir do RNA total foram armazenados no freezer a -20°C até uso posterior nas reações de PCR.

3.4 - Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). A partir do cDNA obtido da reação de transcrição reversa descrita anteriormente, realizou-se a reação de PCR para identificar a expressão da enzima heparanase-1 nos tecidos, utilizando oligonucleotídeos iniciadores "*primers*" 5'CTCGAGATGCTGCTGCCCTCGAAGCCTGCG3' e 5'CCATGGTCAAGTGCAAGCAGCAACTTTGGC3', respectivamente, para amplificação das extremidades N- e C-terminal da heparanase e os "*primers*" 5'AACGGGAAGCTCACTGGCATG3' (*sense*) e 5'TCCACCACCCTGTTGCTGTAG3' (*antisense*), para a amplificação da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH). O ciclo de reação de amplificação para GAPDH utilizado foi submetido à temperatura de 94°C por 5 minutos, seguindo-se de 35 repetições (94°C, 1 minuto; 58°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto) e finalizando a reação por 10 minutos a 72°C. O ciclo de reação para amplificação da heparanase utilizou a técnica de "*Touch Down PCR*", seguindo o

protocolo: 94°C por 5 minutos, seguindo-se 10 repetições (94°C, 1 minuto; 60°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto), 10 repetições (94°C, 1 minuto; 58°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto), 15 repetições (94°C, 1 minuto; 55°C, 1 minuto; 72°C, 1 minuto) e finalizando a reação por 10 minutos a 72°C. O termociclador PCT-0200 DNA Engine Version 4.0 (MJ Research) foi utilizado para as reações de amplificações descritas.

3.5 - Eletroforese em gel de agarose para visualização das reações de amplificação por PCR. As amostras amplificadas nas reações de RT-PCR semi-quantitativo foram analisadas em gel de agarose 2%, adicionando-se 1 µL de brometo de etídio (10 mg/mL), em tampão Tris-acetato EDTA. Para cada amostra, foram adicionados 10% de azul de bromofenol para a visualização da corrida eletroforética.

3.6 - RT-PCR em tempo real. A reação foi realizada utilizando o “kit” Power Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems®) em um volume correspondente a 50% do volume final da reação, com oligonucleotídeos iniciadores (*Primer sense*: 5' CCT TGC TAT CCG ACA CCT TT 3') e reverso (*Primer antisense*: 5' CAC CAC TTC TAT TCC CAT TCG 3') em uma concentração final de 2,0 µM para a heparanase-1. Foi utilizada a plataforma tecnológica ABI PRISM 7000 SDS e as condições de termociclagem foram: 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto, sendo a duração da reação aproximadamente de 2 horas. É importante ser observado que o controle foi

construído uma curva padrão e o valor da inclinação da reta serviu para o cálculo da eficiência da reação. Além disso, também foi realizada a curva de dissociação para verificar a pureza do produto formado, ou seja, se existiu mais de um tipo de produto amplificado na reação. Para normalização da expressão da heparanase-1 e heparanase-2, foram utilizadas médias de expressão de dois genes de referência, RPL13a (subunidade ribossomal 18S) utilizando *primer sense* (5' TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A 3') e o *primer antisense* (5' CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA 3'), e o gene GAPDH (gliceraldeído 3-Fosfato desidrogenase) utilizando o *primer sense* (5' GGA GAA GGC TGG GGC TC 3') e o *primer antisense* (5' GTC CTT CCA CGA TAC CAA AG 3'). Pelo fato da expressão dessas enzimas serem relativa, o cálculo foi determinado pelo número de ciclos (Cts). E o resultado final foi obtido em relação à média dos ciclos do grupo controle (amostra calibradora). O valor da amostra calibradora deve ser o mesmo para todas as amostras, inclusive para o cálculo do próprio grupo controle, como ilustrado no cálculo abaixo:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ pacientes} - \Delta Ct \text{ indivíduos sadios}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{expressão relativa}$$

3.7 - Imunohistoquímica. A imunohistoquímica foi realizada para avaliar as quatro isoformas das heparanase-1 e heparanase-2, utilizando anticorpos policlonais específicos. Deve ser observado que as regiões tumorais e não neoplásicas de cada lâmina histológica foi delimitada pelo patologista

previamente à investigação imunohistoquímica, seguida da realização da coloração de hematoxilina-eosina. Após os blocos de parafina terem sido cortados no micrótomo, as lâminas de 3 µm foram inicialmente sinalizadas e depois foram submetidas à técnica de imunohistoquímica. Primeiramente, as lâminas foram desparafinadas, permanecendo 20 minutos em xilol aquecido a 95°C, seguido de três banhos de xilol à temperatura ambiente. Após este procedimento, o tecido foi hidratado, submergindo-se as lâminas em álcool absoluto, álcool 95% e álcool 70%, respectivamente, seguido de lavagem em água corrente e depois em água destilada e deionizada. No próximo passo foi realizada a recuperação antigênica em panela a vapor (“banho-maria”), na qual as lâminas foram colocadas em solução de citrato 10 mM, pH 6,0, 95°C. Após 35 minutos, as lâminas foram retiradas e realizadas lavagem em tampão fosfato de sódio três vezes (por 3 minutos cada lavagem), 0,05 M, pH 7,4. O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com água oxigenada 10V (3%), seguindo lavagem em água corrente, água destilada e PBS três vezes (3 minutos cada lavagem). Na sequência, procedeu-se o bloqueio de sítios inespecíficos, mergulhando-se as lâminas em leite desnatado 2% diluído em PBS, por 20 minutos. Os anticorpos primários HPA1 H80 ou HPA1 C20 ou HPA2 N19 ou HPA2 C17, da empresa Santa Cruz Biotechnology foram diluídos em soro albumina bovina (BSA) na proporção de 1:100 e incubados 100 µL dessa solução em câmara úmida, durante 18 horas, em geladeira. O anticorpo policlonal HPA1 H80 foi dirigido para os peptídeos 101-180 da porção amino-terminal (N-terminal) da enzima heparanase-1 (HPA1). O anticorpo policlonal

HPA1 C20 reconhece o peptídeo na porção C-terminal (carboxi-terminal) da enzima HPA1. Os anticorpos policlonais HPA2 N19 e HPA2 C17 reconhecem respectivamente, peptídeos das porções N- e C-terminal das três isoformas das heparanases-2 humanas (HPA2a, HPA2b e HPA2c). Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS três vezes, incubadas com o anticorpo secundário biotilado e em seguida com o complexo estreptoavidina peroxidase por 15 minutos, à temperatura ambiente. No final das incubações as lâminas foram lavadas em PBS três vezes e procedeu-se à revelação da reação, utilizando o cromógeno 3-3'-diaminobenzamida (DAB 100mg em 70 mL de PBS + 3 mL de água oxigenada), por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos, contra-coradas em hematoxilina de Harris por 30 segundos e novamente lavadas em água corrente por 5 minutos para serem desidratadas, submergindo-as em álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto e em solução de xilol três vezes, respectivamente. As lâminas foram finalmente montadas com lamínula e Etelan, rotuladas e mantidas em posição horizontal por 24 horas para secagem.

3.8 - Quantificação digital das reações de imunohistoquímica. Inicialmente as lâminas foram analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse TS100 sob a mesma intensidade de luz e altura do condensador. As áreas que melhor representavam a imunomarcação foram escolhidas e analisadas em aumento de 400x. Foram realizadas fotomicrografias de 640 x 480 pixels em campos consecutivos, não coincidentes, com câmera digital Nikon Coolpix 4300, em

zoom óptico máximo. As imagens obtidas foram transferidas para um computador Pentium 4, com sistema operacional Windows XP e analisadas por programa de processamento de imagens ImageLab (Softium Informática, SP, Brasil). Foram determinados os índices IP (índice de positividade), IE (índice de expressão) e ItE (intensidade de expressão) em cada caso analisado¹¹⁶. IP representa o número de células positivas (que expressaram HPA1 ou HPA2), no total de 1000 células analisadas. ItE, representa a intensidade da coloração e foi determinada selecionando-se uma pequena região de 12 células positivamente imunomarcadas. Com o emprego do programa uma média de intensidade de expressão foi obtida em cada caso. O IE expressa a relação entre ItE e IP. Todos os índices, bem como a determinação da metodologia de quantificação digital das reações de imunohistoquímicas foram padronizadas (Figura 6).

$$IP = \frac{\text{número de células positivas}}{\text{número total de células contadas}} \times 100 \quad [\%]$$

$$ItE = 320.7 - \frac{320.7 \times \sum OD}{\sum BOD} \quad [ou/\mu m^2]$$

$$IE = \frac{IP \times ItE}{100} \quad [ou/\mu m^2]$$

Figura 6. IP: índice de positividade; ItE: intensidade de expressão; IE: índice de expressão¹¹⁷

3.9 - Extração dos glicosaminoglicanos sulfatados do tecido renal. As amostras de tecidos renais foram pulverizadas em nitrogênio líquido, posteriormente homogeneizadas em acetona e mantidos à temperatura ambiente por 18 horas, com trocas da acetona a cada 6 horas. A seguir foi realizada uma centrifugação e aspiração da acetona, secando o excesso a 50°C e, então, foi determinado o peso seco dos tecidos. Em seguida, foi efetuada a proteólise com Alcalase (Novozyme®). Para cada grama de tecido seco, adicionou-se 0,5 mL da solução enzimática (1 mL da enzima diluída em 40 mL de tampão Tris-Acetato 0,05 M, pH 7,5). A proteólise ocorreu a 50°C por 18-24 horas. Em seguida, foi adicionado TCA 90%, em presença de 5 M de NaCl. Ao sobrenadante obtido foram acrescentados 2 volumes de metanol, -20°C, durante 3 horas para a precipitação dos glicosaminoglicanos. O precipitado formado foi coletado por centrifugação, 10.000 x g por 30 minutos e seco à vácuo. Uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose para identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos.

3.10 - Extração dos glicosaminoglicanos urinários. Os glicosaminoglicanos de pacientes portadores de carcinoma de células renais e de indivíduos saudáveis (controle) foram isolados por precipitação com amina quaternária, cetil-trimetiletil-amônia (CETAVLON)^{118,119}. Em resumo, as amostras da urina foram ajustadas para pH 5,6 e diluídas com 0,5 volumes de água destilada, sendo adicionados 1,7 ml de CETAVLON 5% por 100 ml de urina e mantida a 4°C por 18 horas. Os compostos coletados por centrifugação foram lavados com

etanol absoluto e mantidos a 4°C por 18 horas. Após centrifugação o material foi seco à vácuo e homogeneizado com uma solução saturada de acetato de sódio (50 ml/L de urina). O precipitado obtido por nova centrifugação foi seco à vácuo e ressuspenso em água destilada. Em seguida, os glicosaminoglicanos foram reprecipitados com 2 volumes de metanol, mantidos a 4°C por 18 horas, sendo coletados por centrifugação, ressuspenso em água e submetidos à análise por eletroforese em gel de agarose.

3.11 - Eletroforese em gel de agarose para análise dos glicosaminoglicanos sulfatados. A identificação inicial e a quantificação dos glicosaminoglicanos extraídos da urina e amostras de tecidos renais foram realizadas por microeletroforese em gel de agarose (0,5%)¹²⁰. Após a adequada migração eletroforética, os glicosaminoglicanos foram precipitados no gel com CETAVLON 0,1%, durante 2 horas. A seguir, o gel foi seco sob calor e ventilação, corado com uma solução de azul de toluidina 0,1% em ácido acético 1% e etanol 50%. O excesso de corante foi removido com uma solução de ácido acético 1% e etanol 50%. A seguir, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e os glicosaminoglicanos quantificados por densitometria a 525 nm por comparação com padrões conhecidos de glicosaminoglicanos sulfatados. O tampão PDA (1,3-diaminopropanoacetato, pH 9,0) discrimina por ordem decrescente de mobilidade eletroforética os condroitim-4 e -6 sulfatos (CS), o dermatam sulfato (DS) e heparam sulfato (HS).

3.12 - Dosagem de ácido hialurônico. O ácido hialurônico foi dosado na urina dos pacientes com tumor e saudáveis. Foram adicionados 100 µL/poço de ácido hialurônico em várias concentrações (0 a 500µg/L) diluído em tampão Tris-HCl 0,05M, pH = 7,75 e albumina bovina sérica 1% à placa de ELISA com sonda adsorvida. As amostras foram diluídas (1:1000) em tampão de ensaio. As amostras, obtidas de uma alíquota da extração dos glicosaminoglicanos dos tecidos, foram incubadas com o ácido hialurônico por 12 horas a 4°C e em seguida submetidas à lavagem da placa com tampão Tris-HCl 0,05M, pH = 7,75 por 3 vezes. Em seguida, foi adicionado 100µL da sonda (1mg/mL proteína de ligação) diluída 1:10.000 no mesmo tampão de ensaio. A placa foi submetida à agitação branda por 2 horas e em seguida lavada 9 vezes com tampão de lavagem. Foram adicionados à placa 100 µL/poço de estreptavidina marcada com európio diluído 1:10.000 em tampão de ensaio. A estreptavidina tem afinidade pela biotina conjugada com a sonda. A placa foi submetida à agitação por 30 minutos e lavada novamente 9 vezes com tampão de lavagem. Com o objetivo de remover o európio ligado à estreptavidina, foi adicionada uma solução de “enhancement” 280 µL/poço, seguindo-se de 5 minutos de agitação branda^{121,122}. Desse modo o európio livre foi lido pelo fluorímetro, como mostra na Figura 7. A dosagem do ácido hialurônico foi expressa em ng/ml.

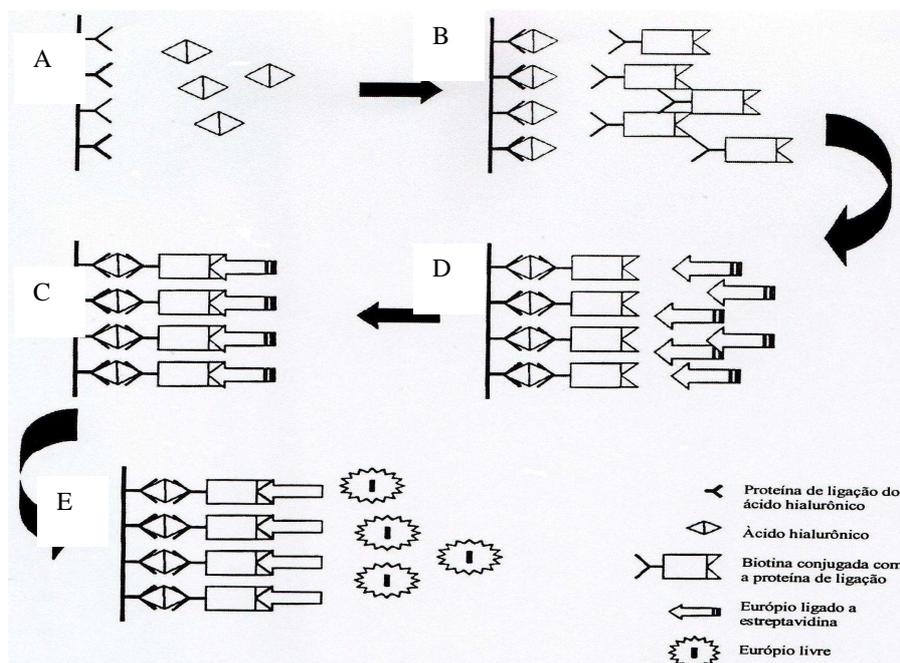


Figura 7. Representação esquemática do ensaio fluorimétrico para quantificação do ácido hialurônico. Placas de ELISA foram revestidas com a proteína de ligação do AH e sucessivamente incubadas com amostras de plasma humano, a proteína de ligação do ácido hialurônico (AH), conjugada com biotina e estreptavidina marcada com európio. Após a liberação do európio com solução "enhancement" a fluorescência final foi quantificada em um fluorímetro (Martins, Passerotti *et al.*, 2003).

3.13 - Análises estatísticas. Os dados obtidos foram organizados e tabulados em planilhas com o auxílio do programa Excell em Windows Vista (Microsoft Corporation®, Califórnia, USA). A escolha das medidas de tendência central e dispersão dos valores que compõem as amostras, assim como dos testes estatísticos para comparação entre as mesmas foram baseados nos tipos de distribuição. As distribuições foram definidas como paramétricas ou não paramétricas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, segundo o programa estatístico SPSS® versão 13.0 (SPSS® Inc; Illinois, USA). Os valores obtidos pelo estudo de cada variável contínua foram organizados e descritos por média e desvio padrão. Para as categorizadas foram utilizadas freqüências absolutas e

relativas. Para a comparação entre as médias de duas populações amostrais paramétricas, foi utilizado o teste “t” de Student, e entre as médias de três ou mais populações a análise de variância (ANOVA) com teste auxiliar de Bonferroni. Para duas populações amostrais não paramétricas, a comparação das medianas foi realizada pelo teste de Mann-Whitney e entre três ou mais populações foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Comparações da frequência de um fenômeno entre grupos de variáveis categorizadas foram realizadas com aplicação do teste exato de Fisher e teste do qui-quadrado. Para a verificação da existência de correlação entre duas variáveis contínuas, foi utilizado o teste de correlação de Pearson para as variáveis paramétricas e o teste de correlação de Spearman para as variáveis não paramétricas.

4 - RESULTADOS

No período entre dezembro de 2004 até novembro de 2005, 31 pacientes foram submetidos à nefrectomia radical aberta ou laparoscópica. Desses 31 pacientes, 5 não apresentaram carcinoma de células renais na anatomia patológica: um paciente (paciente 4), apresentou oncocitoma medindo 5,7 cm de diâmetro, dois pacientes apresentaram carcinoma de células transicionais, sendo que em um deles (paciente 5), o tumor media 17 cm (CCT GIII) e no outro (paciente 19), 7 cm (CCT GII); o paciente 8 apresentou pielonefrite (a tomografia demonstrava massa tumoral com 12 cm de diâmetro) e o paciente 13 apresentou um carcinoma de supra renal medindo 20 cm. Os demais vinte e seis pacientes foram diagnosticados com carcinoma de células renais. As amostras de urina e tecido renal de dois pacientes (2 e 6) foram perdidas durante a análise devido à falha na conservação das amostras ou extração do RNA. Esses pacientes que não apresentaram carcinoma de células renais e tiveram as amostras perdidas foram excluídos do estudo. O paciente 29 teve apenas o heparan sulfato, condroitim sulfato e ácido hialurônico urinário analisados, pois foi submetido à tumorectomia, por isso o tecido não neoplásico não foi captado para ser analisado. Portanto, a expressão da heparanase-1 e a quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados (heparan sulfato, condroitim sulfato e dermatan sulfato) foram avaliados em 24 amostras, representando 77,4% do total de amostras coletadas inicialmente em cirurgia. Os resultados do estadiamento pré- e pós-cirúrgico, histologia, grau de Fuhrman, presença de metástase e invasão da fáscia de Gerota estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Características patológicas dos pacientes submetidos à nefrectomia que apresentaram carcinoma de células renais

Pac.	Tamanho AP (cm)	Est clínico	Est patológico	Histologia	Fáscia Gerota	Metástase	Fuhrman
1	10 x 9 x 6,5	T2N0M0	T2N0Mx	CCC	N	N	2
3	24 x 17	T4N2M0	T4N2Mx	CCC (papilífero)	S	S	3
7	5	T1N0M0	T1N0Mx	CCC	N	N	2
9	8,5 x 6,7	T2N0M0	T2N0M0	CCc	N	N	2
10	15 x 10	T2N1M0	T4N2Mx	CCc (papilífero)	S	S	3
11	5	T1N0M0	T1bN0Mx	CCC	N	N	2
12	2,4	T1N0M0	T1aN0Mx	CCC	N	N	2
15	4	T1N0M0	T1N0Mx	CCC	N	N	2
16	12	T3N1M0	T3bNxMx	CCC	N	N	3
17	10	T2N0M0	T2NxMx	CCC	N	N	2
18	10	T1N0M0	T2NxMx	CCC (ductos coletores)	N	N	2
20	12	T2N0M0	T2NxMx	CCC	N	N	3
21	4,5 x 2	T1N0M0	T1NxMx	CCC (sarcomatóide)	N	N	1
22	7,5 x 7	T2N1M1	T2NxMx	CCC	N	S	3
23	8 x 7,5	T3bN0M0	T3NxMx	CCC	N	N	2
24	5 x 3,1	T1N0M0	T2NxMx	CCC	N	N	2
25	6	T1N0M0	T1NxMx	CCC	N	N	1
27	6 x 5,5	T1N0M0	T1bNxMx	CCC	N	N	2
28	6 x 5,5 x 3,5	T1N0M0	T1bNxMx	CCC	N	N	2
29	3	T1N0M0	T1NxMx	CCC	N	N	2
30	11,5 x 9,5	T2N1M0	T2N2Mx	CCC (sarcomatóide)	N	N	2
31	9,5 x 7 x 7	T2N0M0	T2N0Mx	CCC	N	N	2
32	8 x 6,5	T2N0M0	T2N0Mx	CCC	N	N	2
33	6 x 5	T1N0M0	T1bN0Mx	CCC	N	N	1

Pac: paciente, AP: anatomopatológico, Est: estadiamento, CCC: carcinoma de células claras, N: não, S: sim.

4.1 – Reações de amplificação para determinação da expressão da heparanase por análise de RT-PCR semi-quantitativa

A Figura 8 mostra a eletroforese em gel de agarose, após a reação de amplificação da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que representa o gene utilizado como controle para os estudos utilizando as amostras de pacientes com carcinomas de células renais, demonstrando a expressão de GAPDH nos tecidos tumorais e nos tecidos não acometidos por neoplasia de pacientes com carcinoma de células renais. Pode-se observar que

a amplificação da enzima GAPDH encontra-se igualmente expressa nas amostras de tecidos tumorais e não neoplásicos, resultando em uma banda de peso molecular de aproximadamente 300 pares de base (Figura 8).

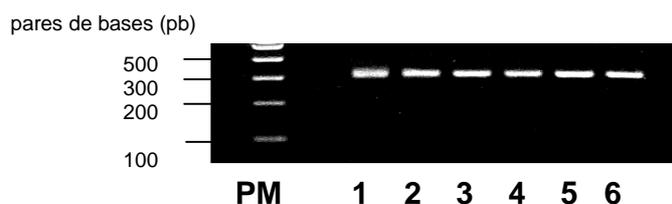


Figura 8. Expressão de GAPDH por RT-PCR semi-quantitativo. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 2%, após amplificação do segmento de cDNA da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) dos pacientes com carcinoma de células renais. **PM**, Padrão de Peso Molecular de fragmentos de DNA; **1-3**, representam os resultados obtidos de amplificações das amostras de tecido não neoplásicos; **4-6**, representam os resultados obtidos de amplificações das amostras de tecido tumoral.

A amplificação do cDNA da heparanase só foi possível utilizando-se a técnica de PCR "*Touch Down*". Tal técnica baseia-se no princípio de iniciar as reações de amplificação em temperaturas de anelamento maiores. Portanto, ocorre maior especificidade nos primeiros ciclos de amplificação, seguindo de diminuição consecutiva da temperatura de anelamento nas reações em ciclos posteriores, aumentando assim a probabilidade de amplificação.

A Figura 9 mostra a diferença significativa da expressão da heparanase quando a reação de amplificação foi realizada utilizando a técnica de "*Touch Down*".

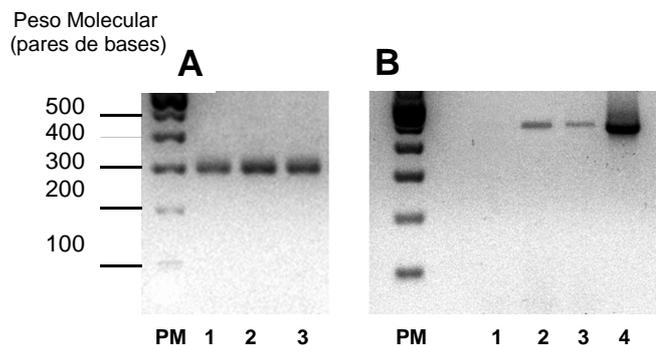


Figura 9. Amplificação da heparanase por RT-PCR “Touch Down”. Eletroforese em gel de agarose 2%, após amplificação do segmento de cDNA da enzima heparanase-1 utilizando ciclo “Touch Down”, como descrito em Métodos. **A**, amplificação do cDNA da enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH); **B**, amplificação do cDNA da enzima heparanase-1. **PM**, Padrão de Peso Molecular de fragmentos de DNA; **1**, amostra de tecido não neoplásico paciente com carcinoma de células renais; **2 e 3**, amostras de tecidos tumorais de pacientes com carcinoma de células renais; **4**, amplificação de cDNA da heparanase a partir de plasmídeo recombinante (pEGFP heparanase), contendo cDNA da heparanase-1.

A quantificação das bandas de heparanase e GAPDH foi obtida nas reações de RT-PCR por densitometria e desse modo resultando em uma quantificação relativa, comparativamente à expressão de GAPDH.

No Anexo 2 encontra-se demonstrado as quantificações das reações de amplificação de cada amostra, os valores da expressão da heparanase-1 foram obtidos pela relação heparanase/GAPDH, demonstrando que houve pureza na obtenção e quantificação das amostras de RNA para a realização das reações de amplificação e obtenção dos estudos de expressão por análises semi-quantitativas da heparanase-1.

Analisando as amostras, após densitometria, foi observada a expressão da heparanase-1 em 50% das amostras de tecidos tumorais

dos pacientes com carcinoma de células renais, isto é, 12 das 24 amostras de tecidos tumorais. Outro resultado importante que deve ser ressaltado é a expressão negativa em todas as amostras de tecidos não neoplásicos analisados nos pacientes do estudo, sem exceção ($P < 0,0001$) (Figura 10).

A Figura 10 representa o gráfico que expressa as densitometrias obtidas, após as análises de RT-PCR semi-quantitativas da expressão relativa da heparanase-1, das 24 amostras de tecidos tumorais e não neoplásicos analisadas dos pacientes do estudo.

Houve um aumento significativo da expressão relativa da heparanase-1 nos tecidos tumorais comparativamente aos tecidos não neoplásicos, respectivamente, $(0,340 \pm 0,37)$ e $(0,00 \pm 0,00)$ ($P < 0,0001$ – Kruskal-Wallis) (Figura 10).

Analisando as 12 amostras que positivamente expressaram heparanase-1 nos tecidos tumorais, dois tumores foram classificados como papilíferos, dois tumores eram carcinoma de células claras com variante sarcomatóide e seis apresentavam apenas carcinoma de células claras.

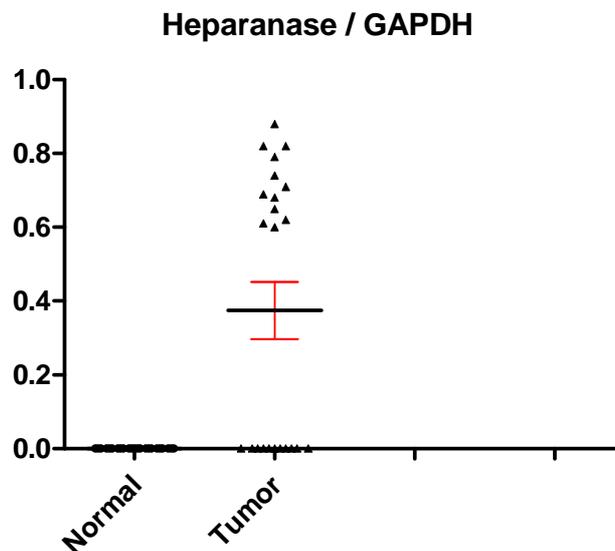


Figura 10. Expressão da heparanase. A expressão da heparanase está representada de forma relativa. O eixo Y representa os valores da relação da expressão da heparanase com a expressão da enzima GAPDH. O eixo X representa os tecidos não neoplásicos (Normal) e tecidos tumorais (Tumor) obtidos de amostras coletadas de pacientes com carcinoma de células renais. Cada ponto significa a expressão individual de um paciente; o traço horizontal em vermelho representa a média dos valores ($P < 0,0001$).

A técnica de quantificação da expressão da heparanase por RT-PCR semi-quantitativo apresentou uma dúvida sobre sua real sensibilidade e especificidade, pois a quantificação da heparanase-1 só pode ser detectada depois da realização de cerca de 30 ciclos, quando a reação de PCR já encontrava-se em fase próxima de saturação, conseqüentemente, a detecção de diferenças na expressão seria difícil de ser detectada por tal técnica. Contudo, a técnica de RT-PCR em tempo real consegue avaliar a expressão utilizando poucos ciclos (20-25 ciclos), sendo, portanto, mais sensível e eficiente para estudar diferenças na expressão gênica (Figura 11). Portanto, os fragmentos de tecido tumoral e não neoplásicos foram reavaliados para pela técnica de RT-PCR tempo real para investigar as diferenças de expressão da heparanase-1.

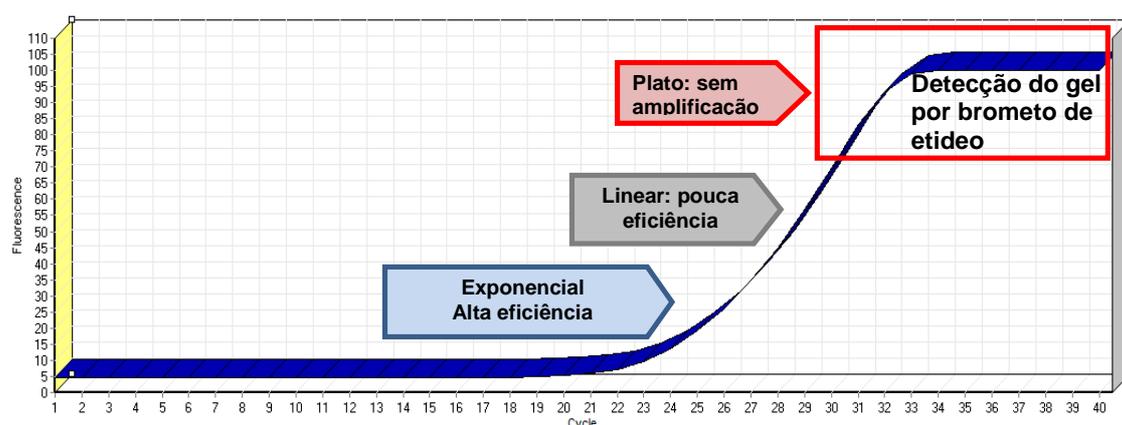


Figura 11. Vantagens de avaliação da expressão da heparanase por RT-PCR tempo real. As análises de RT-PCR em tempo real avaliam as reações na fase exponencial linear da curva acima representada, enquanto as análises de RT-PCR semi-quantitativas avaliam as reações em fase de saturação, como destacado em vermelho. Por essa razão, a reação em tempo real é mais eficiente e consegue detectar diferença de expressão gênica de forma significativamente mais sensível, quando comparada com a técnica semi-quantitativa.

As análises realizadas por RT-PCR em tempo real demonstraram aumento significativo de aproximadamente duas vezes na expressão da heparanase-1 nos tecido tumorais, quando comparados aos tecidos não neoplásicos, respectivamente ($3,99 \pm 0,25$) e ($2,09 \pm 0,20$), ($P < 0,05$) (Figura 12 e Tabela 3).

Tabela 3. Quantificação da heparanase-1 por RT-PCR em tempo real

Grupo	Média de expressão	Desvio Padrão
Tumoral	3,99	0,25
Não neoplásico	2,09	0,20

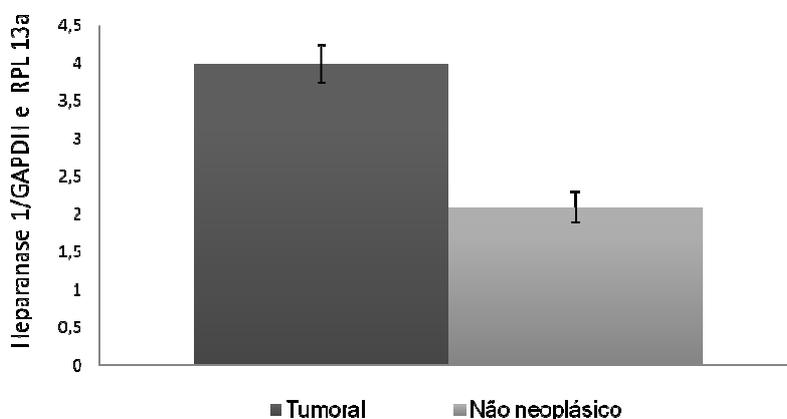


Figura 12. Expressão da heparanase-1 em tecido tumoral e não neoplásico de pacientes com carcinoma de células renais. A quantificação foi realizada por RT-PCR em tempo real como descrita em detalhes na Metodologia. Os ensaios foram realizados em triplicatas para todas as amostras incluindo os genes controle gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) e proteína ribossomal RPL 13a.

A Tabela 4 demonstra a expressão da heparanase-1, as correlações clínicas e características anatomopatológicas dos carcinomas de células renais utilizados no estudo.

A expressão da heparanase no tecido não neoplásico e tumoral não apresentou diferença estatisticamente significativa quando foi comparada entre o tamanho tumoral, a classificação de Fuhrman, presença ou ausência de invasão da gordura peri-renal, cápsula renal, seio renal, vasos, necrose, metástase, e seguimento pós-operatório. A expressão da heparanase apresentou-se mais elevada no tecido tumoral quando ocorreu invasão da fáscia de Gerota, entretanto esse resultado foi desconsiderado, como será explicado em discussão.

Tabela 4. Expressão da heparanase-1, correlações clínicas e características anátomo-patológicas dos pacientes em estudo.

Paciente	*Tamanho do tumor	Fuhrman	Metástase	Seio renal	Gordura peri renal	Cápsula renal	Necrose	Fáscia Gerota	Vasos	Seguimento
1	7-10 cm	2	N	N	N	S	N	N	N	faleceu
3	> 10 cm	3	S	N	S	S	S	S	S	faleceu
7	< 7 cm	2	N	N	N	N	N	N	N	faleceu
9	7-10 cm	2	N	S	S	S	N	N	N	S/I
10	> 10 cm	3	S	S	S	S	S	S	S	faleceu
11	< 7 cm	2	N	N	N	N	S	N	N	vivo
12	< 7 cm	2	N	N	N	N	N	N	N	vivo
15	< 7 cm	2	N	N	N	N	N	N	N	vivo
16	> 10 cm	3	N	N	N	N	N	N	S	faleceu
17	7-10 cm	2	N	N	N	N	S	N	N	S/I
18	7-10 cm	2	N	N	N	N	N	N	N	faleceu
20	> 10 cm	3	N	N	N	N	S	N	N	faleceu
21	< 7 cm	1	N	N	N	N	S	N	N	S/I
22	7-10 cm	3	S	N	N	S	N	N	N	S/I
23	7-10 cm	2	N	N	N	S	S	N	S	metástase
24	< 7 cm	2	N	N	S	S	N	N	S	vivo
25	< 7 cm	1	N	N	N	N	N	N	N	S/I
27	< 7 cm	2	N	N	N	N	N	N	N	Vivo
28	< 7 cm	2	N	N	N	N	N	N	N	S/I
29	< 7 cm	2	N	N	N	N	N	N	N	vivo
30	7-10 cm	2	S	N	N	S	S	N	N	S/I
31	7-10 cm	2	N	N	N	N	S	N	N	metástase
32	7-10 cm	2	N	N	N	N	N	N	N	S/I
33	< 7 cm	1	N	N	N	N	S	N	N	S/I

* Tamanho do tumor de acordo com a informação obtida pela anatomia patológica; N: não; S: sim; (S/I): sem informação

4.2 - Análises imunohistoquímicas

Nos estudos imunohistoquímicos foi decidido investigar a expressão das isoformas de heparanases (HPA1 e HPA2) no tecido tumoral comparativamente ao tecido não acometido pela neoplasia nas lâminas histológicas dos pacientes com carcinomas de células renais, com a finalidade de possivelmente correlacionar a presença de tais isoformas de heparanases com o tumor renal.

Observar-se que a heparanase-1 (HPA1) corresponde à forma enzimaticamente ativa, enquanto a heparanase-2 (HPA2) não possui atividade enzimática. Para tal investigação, como descrito em detalhes na metodologia, foram utilizados quatro anticorpos policlonais específicos. A Figura 13 representa o controle negativo das reações de imunohistoquímica. Cumpre ser observado que também foi realizado o controle negativo utilizando apenas anticorpos primários na reação e também não houve nenhuma imunomarcacão.

As Figuras 14 e 15 demonstram que houve marcação com todos os quatro anticorpos policlonais utilizados para identificar as isoformas de HPA1 e HPA2, tanto nos tecidos não neoplásicos como nos tecidos tumorais, analisados a partir das lâminas histológicas dos pacientes com carcinoma de células renais.

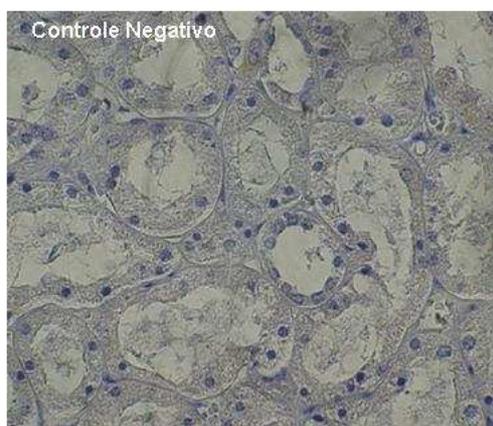


Figura 13. Imunohistoquímica do tecido renal de pacientes com carcinoma de células renais com utilização apenas de anticorpos secundários. Microfotografia com aumento de 400x.

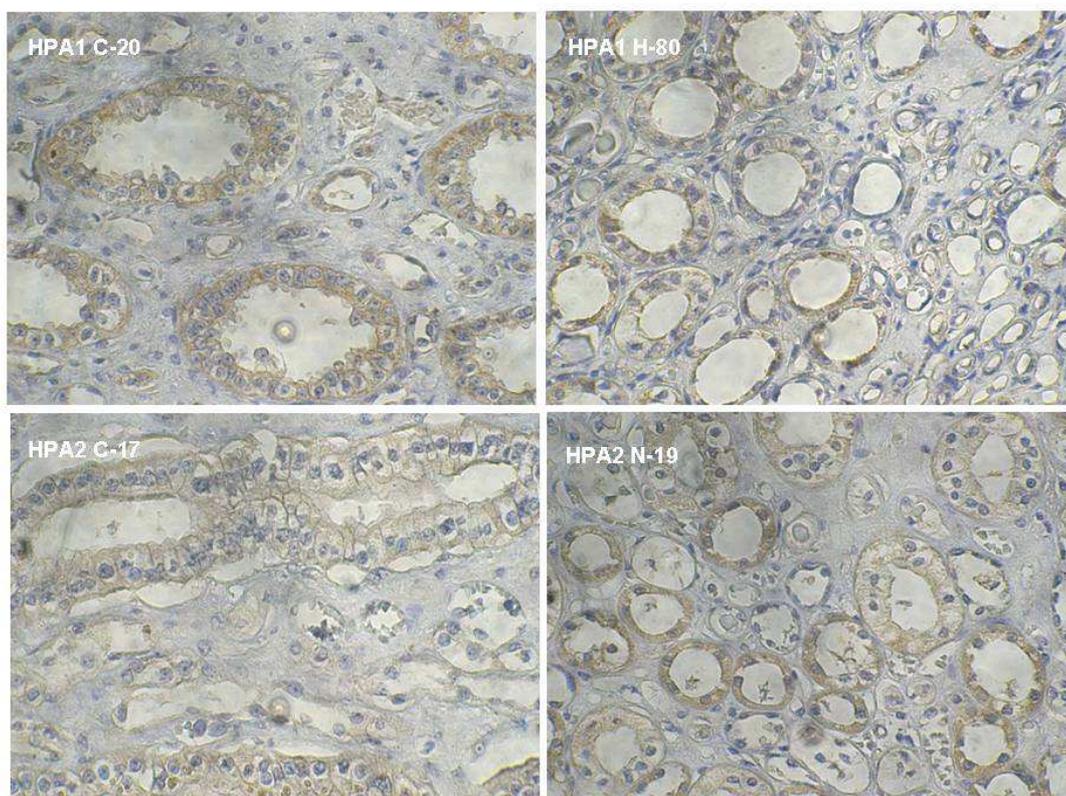


Figura 14. Identificação por imunohistoquímica de heparanase-1 e heparanase-2 em região não neoplásica de tecido renal de pacientes com carcinoma de células renais. A identificação da região não neoplásica a ser avaliada para a reação de imunohistoquímica das isoformas de HPA1 e HPA2 foi previamente definida em cada lâmina por patologista após coloração com hematoxilina-eosina. Os anticorpos primários utilizados foram HPA1 H80 e HPA1 C20 para identificação da heparanase-1 e anticorpos HPA2 N19 e HPA2 C17 para heparanase-2, seguindo revelação com peroxidase como descrito em Métodos. Microfotografia com aumento de 400x.

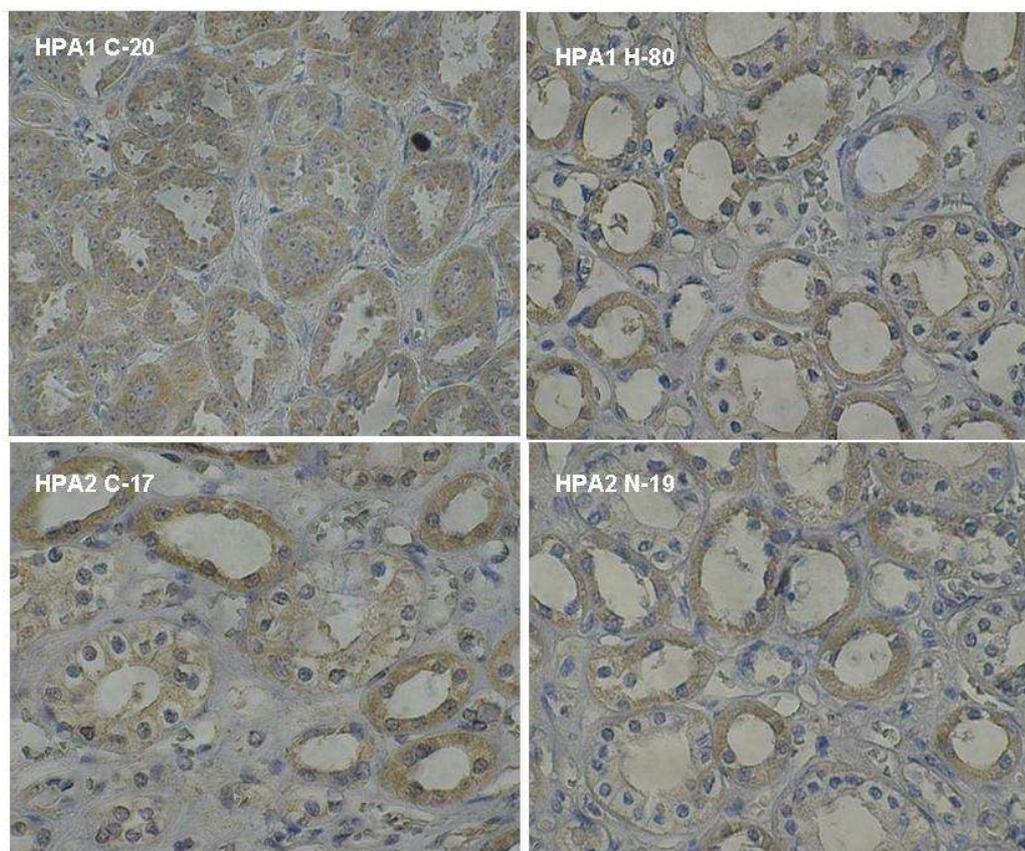


Figura 15. Identificação por imunohistoquímica de heparanase-1 e heparanase-2 em região tumoral de tecido renal de pacientes com carcinoma de células renais. A identificação da região tumoral a ser avaliada para a reação de imunohistoquímica das isoformas de HPA1 e HPA2 foi previamente definida em cada lâmina por patologista após coloração com hematoxilina-eosina. Os anticorpos primários utilizados foram HPA1 H80 e HPA1 C20 para identificação da heparanase-1 e anticorpos HPA2 N19 e HPA2 C17 para heparanase-2, seguindo revelação com peroxidase como descrito em Métodos. Microfotografia com aumento de 400x.

A média de expressão determinada pelo índice de positividade (IP), intensidade de expressão (ItE) e índice de expressão (IE) das várias isoformas de heparanases obtidas com cada anticorpo específico está representada na Tabela 5.

Tabela 5. Expressão das isoformas de HPA1 e HPA2 por quantificação digital das reações de imunohistoquímica.

Anticorpos	IP (%)	ItE (u.o./μm^2)	IE (u.o./μm^2)
CONTROLES			
HPA1 H80	12,69 \pm 4,25	101,18 \pm 17,99	12,27 \pm 4,24
HPA1 C20	32,14 \pm 4,63	90,32 \pm 15,80	29,09 \pm 7,25
HPA2 N19	16,30 \pm 6,21	81,38 \pm 17,97	13,06 \pm 5,34
HPA2 C17	6,40 \pm 2,56	101,74 \pm 27,14	6,13 \pm 2,62
CASOS			
HPA1 H80	14,03 \pm 27,64	86,62 \pm 25,55	16,46 \pm 30,35
HPA1 C20	82,83 \pm 22,94	91,54 \pm 24,44	76,76 \pm 30,46
HPA2 N19	15,05 \pm 29,89	90,26 \pm 30,74	15,65 \pm 34,81
HPA2 C17	16,05 \pm 29,63	92,46 \pm 26,86	14,27 \pm 26,93

IP, Índice de Positividade; ItE, Intensidade de Expressão; IE, Índice de Expressão. Os valores expressam a média e o desvio padrão, consecutivamente. CONTROLES, tecidos não acometidos por neoplasia e CASOS, tecidos tumorais.

Realizando análises estatísticas comparativas com os dados obtidos da quantificação digital das reações de imunohistoquímica entre o grupo caso (tecidos tumorais) e grupo controle (tecidos não neoplásicos), foi observado que a enzima heparanase-1 apresenta maior expressão nos tecidos tumorais comparativamente aos tecidos não neoplásicos ($P \leq 0.002$). Entretanto, não existe diferença de expressão significativa entre a imunomarcção da isoforma de heparanase-2 quando analisamos tecido tumoral e não neoplásicos de pacientes com carcinoma de células renais.

A intensidade de expressão (ItE) nos tecidos tumorais para HPA1 e HPA2 foi a mesma para os diferentes anticorpos utilizados HPA1 H80,

HPA1 C20, HPA2 N19 e HPA2 C17, não havendo diferença estatística significativa ($P = 0,891$ – teste ANOVA) (Figura 15 e Tabela 5).

Contudo, na Figura 15, que mostra a imunomarcção de apenas um paciente, mas representa expressivamente o que ocorreu com todas as imunomarcções e os valores representados na Tabela 5, evidenciam que a imunomarcção com o anticorpo HPA1 C20, encontra-se estatisticamente aumentada, quando comparada às três outras imunomarcções obtidas com os anticorpos HPA1 H80, HPA2 C17 e HPA2 N19, para os índices de positividade e índice de expressão nos tecidos tumorais ($P < 0,0001$ – teste de Kruskal-Wallis).

Os resultados obtidos sugerem, portanto, que a isoforma HPA1 enzimaticamente ativa de 50 kDa, reconhecida pelo anticorpo HPA1 C20, diferente das demais isoformas da heparanase que são cataliticamente inativas HPA1 65 kDa (identificada pelo anticorpo HPA1 H80) e as isoformas da HPA2 que são identificadas, respectivamente, pelos anticorpos, HPA2 N19 e HPA2 C17, possivelmente representa a isoforma de heparanase significativamente mais importante na carcinogênese de células renais. Tais dados indicam que tal isoforma seja potencialmente a mais importante como marcador de diagnóstico e possível alvo de terapia anti-tumoral.

Cumprir ser observado que o anticorpo policlonal HPA1 C20 também identifica a porção C-terminal da isoforma inativa da enzima HPA1 65 kDa. Entretanto, os valores obtidos da quantificação digital nas reações de imunohistoquímica indicam que o aumento no índice de expressão e índice de positividade não expressa apenas a somatória da isoforma inativa, mas sim um

aumento significativo da isoforma de 50 kDa (Figura 16), visto que o valor obtido com a imunomarcacão do anticorpo HPA1 C20   quatro vezes maior que o valor da imunomarcacão do anticorpo HPA1 H80.

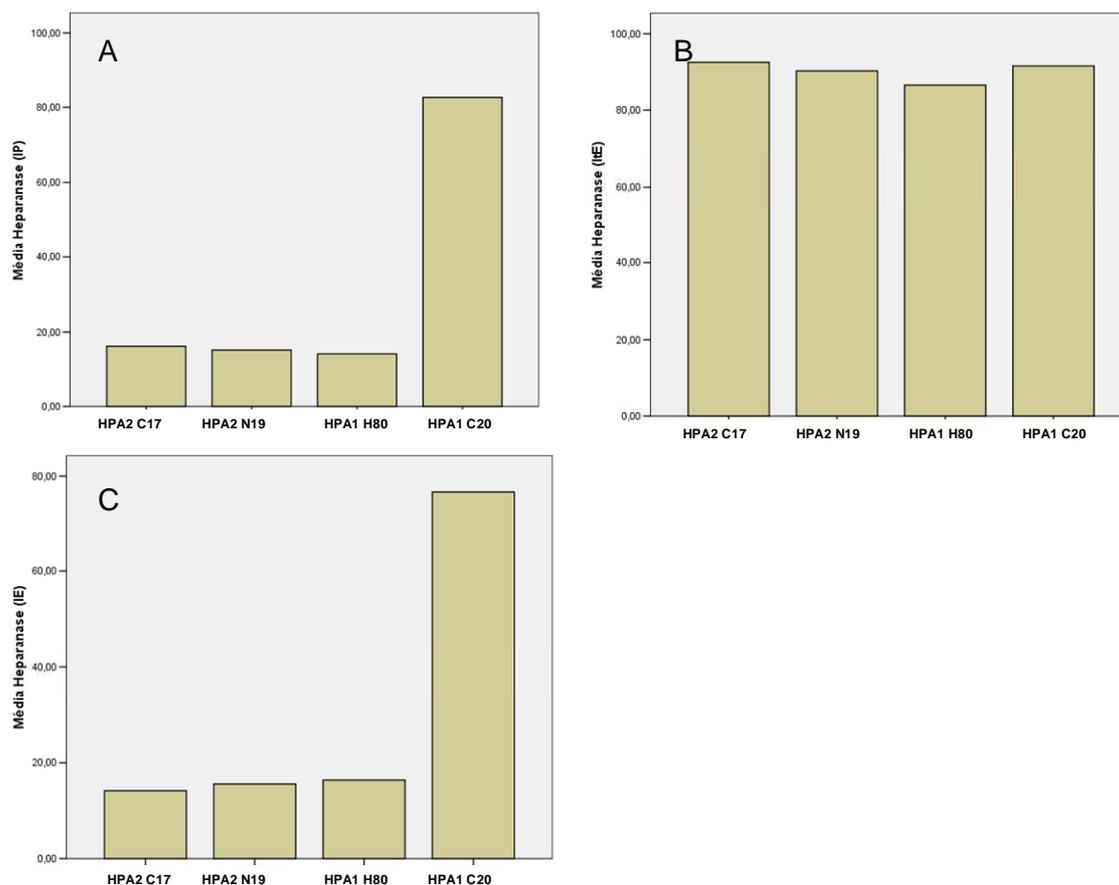


Figura 16. Quantificao digital da expressão das isoformas de heparanases em tecidos tumorais. Os gráficos representam a quantificao digital das reao es de imunohistoquímica nos tecidos tumorais. O  ndice de positividade (IP), que representa o número de células positivas no total de 1000 células analisadas; a intensidade de expressão (ItE) obtida com cada anticorpo específico e o  ndice de expressão (IE), que relaciona IP e ItE foram obtidos utilizando os anticorpos policlonais HPA1 H80, HPA1 C20, HPA2 N19 e HPA2 C17 (Santa Cruz) para determinar quantitativamente diferenças na expressão das proteínas heparanase-1 e heparanase-2 nos tecidos tumorais como descrito em detalhes na metodologia. **A**, IP expressão aumentada de HPA1 C20 comparada às expresso es de HPA1 H80, HPA2 C17 e HPA2 N19 ($P < 0,0001$ – teste de Kruskal-Wallis); **B**, ItE: expresso es semelhantes de HPA1 C20, HPA1 H80, HPA2 C17 e HPA2 N19 ($P = 0,891$ – ANOVA); **C**, IE: expressão aumentada de HPA1 C20 comparada às expresso es de HPA1 H80, HPA2 C17 e HPA2 N19 ($P < 0,0001$ – teste de Kruskal-Wallis).

4.3 – Identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados nas amostras de tecidos renais tumorais e não neoplásicos.

A identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados em cada amostra de tecido tumoral e não neoplásico dos pacientes com carcinoma de células renais foi realizada em 11 amostras do total de 24 amostras que foram analisadas anteriormente nos estudos de imunohistoquímica e expressão de heparanase. A razão da utilização de apenas 45,8% das amostras anteriormente analisadas essencialmente se deve ao fato da quantidade de tecidos de determinadas amostras terem sido insuficientes para todos os estudos. O perfil dos glicosaminoglicanos sulfatados foi obtido por eletroforese em gel de agarose, seguido de densitometria para quantificação precisa de cada composto.

A Figura 17 ilustra o resultado de uma eletroforese em gel de agarose de uma amostra para identificar e quantificar os glicosaminoglicanos sulfatados.

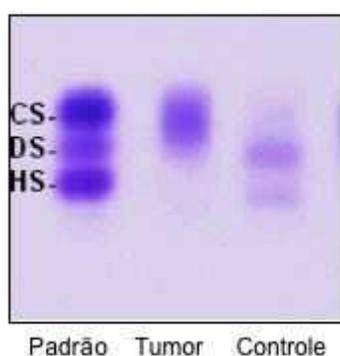


Figura 17. Eletroforese para quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados (GAG). CS, condroitim sulfato; DS, dermatam sulfato; HS, heparam sulfato; **Padrão**, padrão de GAG (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); **Tumor**, GAG obtidos de tecido tumoral de paciente com carcinoma de células renais; **Controle**, GAG extraídos de tecido não neoplásico de paciente com carcinoma de células renais.

Os resultados da quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados, descritas anteriormente, estão representados na Tabela 6. É importante salientar que o valor representado por cada quantificação na Tabela 6, indica a média de triplicatas de ensaios realizados no mínimo duas vezes, sendo o erro descrito para tal metodologia menor que 5%.

Tabela 6. Identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados nos tecidos não neoplásicos e tumorais

Amostras	Peso seco	µg/g peso seco	Glicosaminoglicanos %			Glicosaminoglicanos µg/g peso seco		
			HS	DS	CS	HS	DS	CS
#10 Não neoplásico	0,0244	136,3	16,4	68,1	15,5	22,4	92,8	21,1
#16 Não neoplásico	0,0476	79,4	31,6	56,2	12,2	25,1	44,6	9,7
#21 Não neoplásico	0,0293	201,9	37,3	46,5	16,2	75,4	93,8	32,7
#24 Não neoplásico	0,1607	29,1	7,6	78,0	14,4	2,2	22,7	4,2
#25 Não neoplásico	0,0427	79,6	13,0	77,1	9,9	10,4	61,4	7,9
#27 Não neoplásico	0,2215	30,2	35,0	55,5	9,5	10,6	16,8	2,9
#28 Não neoplásico	0,0776	32,6	20,9	65,7	13,4	6,8	21,4	4,4
#30 Não neoplásico	0,0811	76,3	12,8	67,8	19,4	9,7	51,7	14,8
#31 Não neoplásico	0,1429	38,7	20,7	63,4	15,8	8,0	24,6	6,1
#32 Não neoplásico	0,0924	66,9	29,4	62,6	8,0	19,7	41,8	5,4
#33 Não neoplásico	0,1972	20,5	19,4	72,3	8,3	4,0	14,8	1,7
Média		71,9				17,6	44,2	10,0
#10 Tumor	0,1713	40,9	2,0	35,4	62,6	0,8	14,5	25,6
#16 Tumor	0,0939	103,7	2,8	0,0	97,2	2,9	0,0	100,8
#21 Tumor	0,0619	83,0	11,3	43,7	45,0	9,4	36,3	37,3
#24 Tumor	0,18	32,9	2,3	50,4	47,3	0,7	16,6	15,6
#25 Tumor	0,049	111,7	4,9	0,0	95,1	5,4	0,0	106,2
#27 Tumor	0,037	195,3	5,6	35,3	59,0	11,0	69,0	115,3
#28 Tumor	0,1174	24,4	1,6	0,0	98,4	0,4	0,0	24,1
#30 Tumor	0,1048	76,2	4,1	42,2	53,7	3,1	32,2	40,9
#31 Tumor	0,2438	43,7	5,2	39,9	54,9	2,3	17,4	24,0
#32 Tumor	0,125	37,0	5,8	1,9	92,3	2,14	0,7	34,1
#33 Tumor	0,1163	35,7	7,1	0,0	92,9	2,5	0,0	33,1
Média		71,3				3,69	16,9	50,6

CS, Condroitim sulfato; **DS**, Dermatam sulfato; **HS**, Heparan sulfato

A Figura 18 representa graficamente as concentrações de heparam sulfato (HS), dermatam sulfato (DS) e condroitim sulfato (CS) dos tecidos não neoplásicos e tumorais.

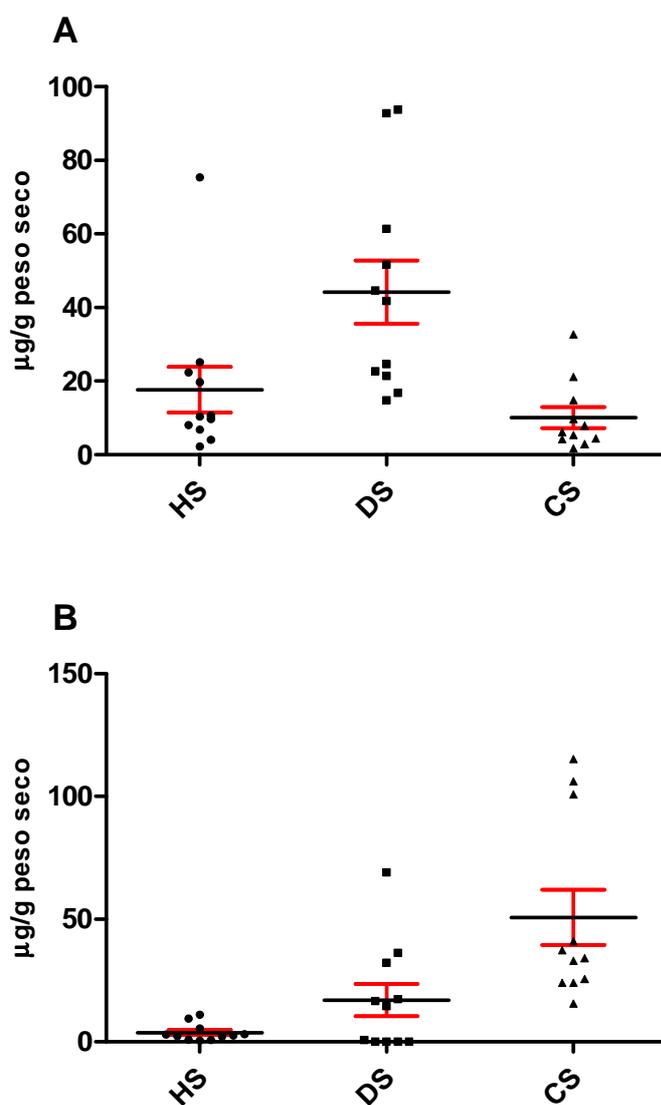


Figura 18. Glicosaminoglicanos sulfatados em carcinoma de células renais. A extração, identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados dos tecidos não neoplásicos (**A**) e tecidos tumorais (**B**) foi realizada seguindo o protocolo descrito em detalhes em Métodos. No eixo Y encontra-se representado os valores da concentração dos glicosaminoglicanos sulfatados em ($\mu\text{g/g}$), microgramas por grama de tecido seco (pó-cetônico). O eixo X representa os diferentes glicosaminoglicanos sulfatados. HS, heparam sulfato; DS, dermatam sulfato; CS, condroitim sulfato. Cada ponto significa a expressão individual de um paciente. O traço horizontal em vermelho representa a média dos valores ($P < 0,05$).

Foi observado redução na quantidade de HS e DS nos tecidos tumorais quando comparados com os tecidos não neoplásicos. Porém, um comportamento inverso pode ser observado para o CS, havendo um aumento bastante expressivo da quantidade de CS nos tecidos tumorais, quando comparados com os tecidos não neoplásicos.

Nas análises estatísticas, a média de heparam sulfato presente nos tecidos tumorais de células renais foi significativamente menor quando comparada ao valor obtido para os tecidos não neoplásicos, respectivamente, ($3,6 \pm 3,5 \mu\text{g/g}$ peso seco e $17,6 \pm 20,5 \mu\text{g/g}$ peso seco), ($P = 0,007$ – Kruskal-Wallis e $P = 0,004$ – Mann-Whitney).

O dermatam sulfato, assim como o heparam sulfato, apresentou diminuição significativa nos tecidos tumorais quando comparados com os valores obtidos para os tecidos não neoplásicos, respectivamente, ($16,9 \pm 21,7 \mu\text{g/g}$ peso seco) e ($44,2 \pm 28,5 \mu\text{g/g}$ peso seco) ($P = 0,044$ – Anova e $P = 0,052$ – Bonferroni).

A concentração de condroitim sulfato foi maior no tecido tumoral ($50,6 \pm 37,2 \mu\text{g/g}$ peso seco), quando comparado com o tecido não neoplásico ($10,0 \pm 9,4 \mu\text{g/g}$ peso seco) com significância de $P = 0,001$ – Anova e $P = 0,001$ – Bonferroni.

A Tabela 7 resume as médias obtidas da quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados nas amostras de tecidos tumorais e não neoplásicos de pacientes com carcinoma de células renais.

Tabela 7. Quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados em tecidos tumorais e não neoplásicos de pacientes com carcinoma de células renais.

	Heparam sulfato ($\mu\text{g/g}$ peso seco)	Dermatam sulfato ($\mu\text{g/g}$ peso seco)	Condroitim sulfato ($\mu\text{g/g}$ peso seco)
Tumorais	3,6 \pm 3,5	16,9 \pm 21,7	50,6 \pm 37,2
Não neoplásicos	17,6 \pm 20,5	44,2 \pm 28,5	10,0 \pm 9,4

P para heparam sulfato, dermatam sulfato e condroitim sulfato, respectivamente, 0,007, 0,04 e 0,001. Os valores representam a média e desvio padrão obtido das quantificações das 11 amostras dos tecidos tumorais e não neoplásicos de pacientes com carcinoma de células renais, sendo que cada amostra foi submetida à eletroforese em triplicata e o ensaio de quantificação realizado no mínimo duas vezes.

A proporção de condroitim sulfato aumentou aproximadamente cinco vezes e a proporção do heparam sulfato diminuiu cinco vezes nos tecidos tumorais, comparativamente aos tecidos não neoplásicos. Já a proporção do dermatam sulfato diminuiu aproximadamente três vezes no tecido tumoral, comparando-se com o tecido não neoplásico (Figura 19).

Embora tenham ocorrido alterações significativas nas proporções dos glicosaminoglicanos sulfatados entre o tecido tumoral e o tecido não neoplásico, refletindo, possivelmente, um papel importante de tais compostos nos mecanismos de carcinogênese, não foi detectado alteração na quantidade total de glicosaminoglicanos sulfatados entre os tecidos tumorais e não neoplásicos, isto é, a média de glicosaminoglicanos sulfatados total encontrados nos tecidos tumorais e não neoplásicos foram, respectivamente, 71,3 e 71,9 $\mu\text{g/g}$ de tecido seco (Figura 19 e Tabela 7).

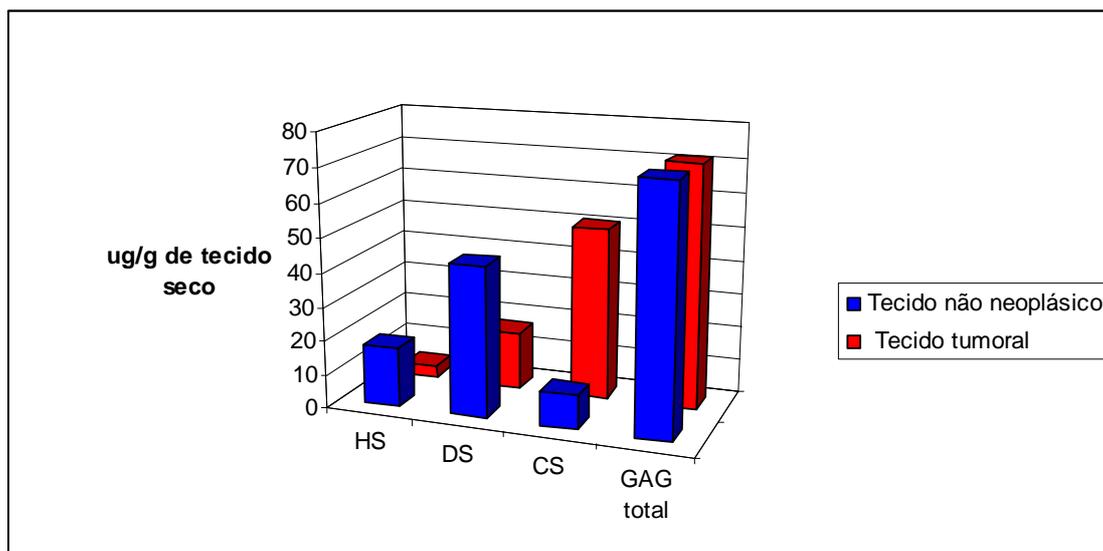


Figura 19. Comparação entre a concentração de glicosaminoglicanos sulfatados nos tecidos tumorais e não neoplásicos. Os glicosaminoglicanos sulfatados foram quantificados nos tecidos tumorais e não neoplásicos obtidos de pacientes com carcinoma de células renais por eletroforese em gel de agarose.

4.4 - Glicosaminoglicanos sulfatados na urina

A análise dos glicosaminoglicanos urinários foi realizada nos grupos controle (amostras de urina coletadas de indivíduos não acometidos por neoplasias), tumor (amostras de urina coletadas no período pré-operatório de pacientes com carcinoma de células renais) e no pós-operatório (amostras de urina coletadas de pacientes com carcinoma de células renais após cirurgia).

No grupo controle, o condroitim sulfato e heparim sulfato foram analisados em 27 pacientes, enquanto no grupo tumor e grupo pós-operatório, tais compostos foram analisados, respectivamente, em 14 e 12 pacientes.

O procedimento para a coleta de amostras de urina envolveu a utilização de sonda, como descrito na metodologia. Tal procedimento pode causar hematúria o que inviabiliza o processamento de tais amostras para a obtenção

de glicosaminoglicanos, sendo essa uma das razões de perda no número de amostras de pacientes analisadas em nossos estudos.

Pode ser observado na Figura 20 que a concentração do condroitim sulfato e heparam sulfato urinário foi maior no grupo controle quando comparado aos grupos tumor e pós-operatório. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os valores encontrados para os grupos estudados.

O valor médio de condroitim sulfato urinário no grupo controle ($1,2 \pm 1,12$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina), no grupo pré-operatório ($0,98 \pm 0,51$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina) e no grupo pós-operatório ($0,95 \pm 0,28$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina). As análises estatísticas demonstraram que não houve diferença significativa nas concentrações de condroitim sulfato urinário entre as amostras do grupo controle e do grupo pré-operatório e comparando-se as amostras obtidas do grupo de pacientes nos grupos pré e pós-operatório respectivamente, Teste *t* de Student, $P = 0,486$ e $P = 0,395$.

Os valores de heparam sulfato urinário obtidos para o grupo controle ($0,45 \pm 0,36$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina), no grupo pré-operatório ($0,31 \pm 0,21$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina) e no grupo pós-operatório ($0,29 \pm 0,12$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina) também não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os grupos controle e pré-operatório e comparando-se as amostras obtidas do grupo de pacientes no pré- e pós-operatório, respectivamente, Teste *t* de Student, $P = 0,184$ e $P = 0,219$.

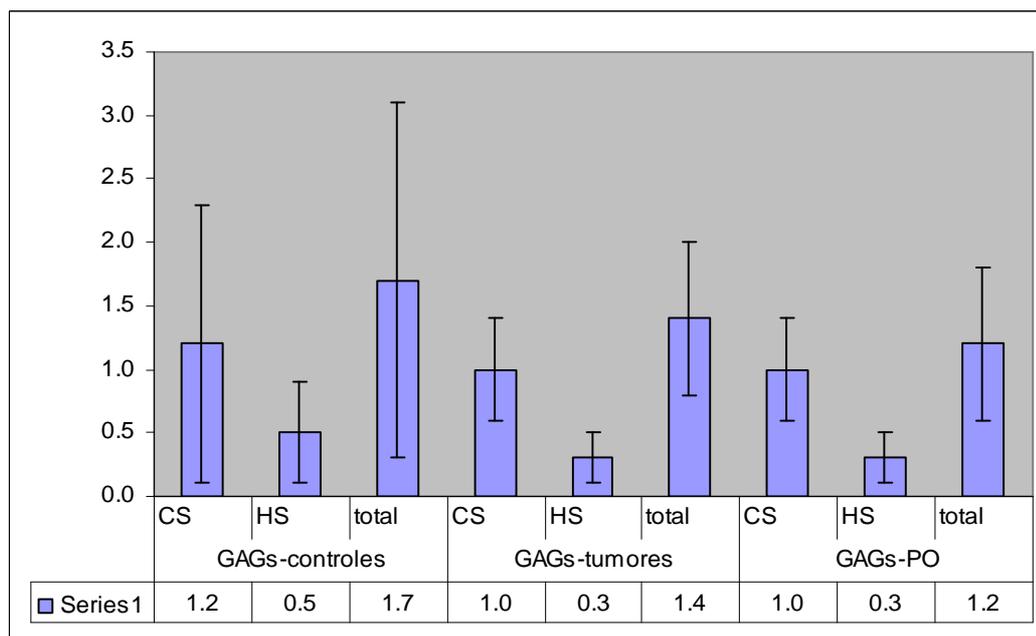


Figura 20. Glicosaminoglicanos sulfatados urinários. Os valores estão expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de creatinina e indicam a média dos valores obtidos da quantificação em amostras de urina de 27 indivíduos sadios (controle), 14 urinas coletadas no pré-operatório de pacientes com carcinoma de células renais e 12 amostras de urina coletadas no pós-operatório de pacientes com carcinoma de células renais. A coleta das amostras de urina, a identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados foram realizadas por eletroforese em gel de agarose e densitometria, como descrito detalhadamente em Métodos. Os valores expressam a média obtida de ensaios realizados em triplicatas e o erro da metodologia é menor que 5%.

Os valores do HS e CS nas amostras de urina foram comparados entre o tamanho do tumor (lesão < 7 cm, entre 7-10 cm e > 10 cm), evolução com óbito do paciente, estadiamento (pT1, pT2, pT3, pT4), grau de Fuhrman, presença ou ausência de trombo tumoral, de necrose tumoral e de metástase, invasão ou não da gordura perirrenal, do seio renal, da fásia de Gerota ou da cápsula renal. Não foi verificada nenhuma correlação estatística entre os glicosaminoglicanos urinários e os parâmetros clínicos e histológicos citados.

4.5 - Análise do ácido hialurônico urinário

O ácido hialurônico foi quantificado em amostras de urina de 29 indivíduos saudáveis (grupo controle), 20 amostras de urina de pacientes com carcinoma de células renais coletadas antes da cirurgia (denominado grupo tumor) e 13 amostras coletadas após o procedimento cirúrgico (denominado grupo pós-operatório).

A quantificação do ácido hialurônico urinário, Figura 21, evidencia que não houve diferença significativa nas amostras pré- e pós-operatórias de pacientes com carcinoma de células renais e grupo controle ($P = 0,147$ ANOVA).

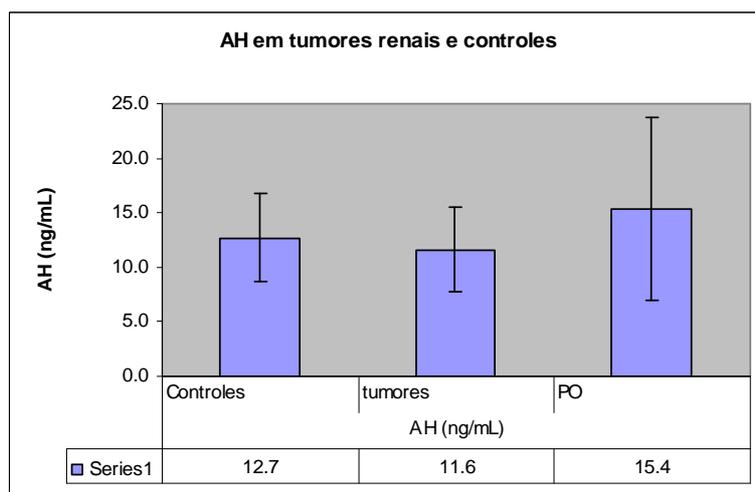


Figura 21. Dosagem de ácido hialurônico urinário. As amostras de indivíduos saudáveis (controles); amostras coletadas de pacientes com carcinoma de células renais antes da cirurgia (tumores) e após a cirurgia (pós-operatório, PO). A dosagem do ácido hialurônico foi realizada utilizando-se a técnica descrita em Métodos (Martins, Passerotti et al., 2003). Os valores representados indicam a média de ensaios realizados em triplicatas, obtidos em cada grupo. Os valores estão expressos em ng de ácido hialurônico/ml ($P = 0,147$).

5 - DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos por RT-PCR semi-quantitativo, foi observado que a heparanase-1 apresenta-se expressa em 50% dos tecidos tumorais de pacientes com carcinoma de células renais, enquanto não houve expressão nos tecidos não neoplásicos dos mesmos pacientes analisados.

Esse dado representa uma informação muito importante sobre a expressão da heparanase-1 em carcinoma de células renais: quando a análise da expressão de heparanase-1 for negativa, não se descarta a possibilidade de diagnóstico positivo para carcinoma; entretanto, quando o resultado da expressão da heparanase for positivo, podemos descartar a chance de um falso positivo, situação que poderia ser muito prejudicial ao paciente.

A expressão do RNA mensageiro da heparanase-1 em tecidos normais é restrita apenas nos tecidos da placenta e órgãos linfóides. Alguns estudos revelaram a expressão da heparanase-1 em alguns tipos de tumores malignos, como o de mama, cólon, pulmão, pâncreas, próstata e ovário. No adenocarcinoma de cólon, foi observado que a expressão da heparanase-1 aumenta quando ocorre um maior grau de indiferenciação celular^{112,123}. No carcinoma de células renais o aumento do tamanho tumoral pode estar relacionado com maior malignidade e indiferenciação celular¹²⁴.

A expressão da heparanase-1 apresentou aumento significativo quando ocorreu invasão da fáscia de Gerota na análise do tecido tumoral ($P = 0,047$ - teste "U" de Mann-Whitney). A invasão da fáscia de Gerota pelo tumor é considerado pelo estadiamento TNM 2002, como pT4, independente do

tamanho da lesão tumoral. Esse dado patológico reflete uma gravidade da lesão tumoral, piorando o prognóstico e a sobrevida global do paciente, tanto que ambos os pacientes que apresentaram a invasão da fáscia de Gerota, faleceram aproximadamente 1 ano após a nefrectomia radical. Entretanto, apenas 2 pacientes apresentaram invasão da fáscia de Gerota e esses mesmos pacientes, também apresentaram o maior tamanho tumoral e estadiamento mais avançado do estudo. Por essa razão, é possível sugerir que existe uma relação com o tamanho do tumor, invasão da fáscia de Gerota e ação da heparanase-1, embora não tenha sido observada uma correlação estatisticamente significativa entre o tamanho do tumor e expressão da heparanase-1 no presente estudo. Entretanto, essa hipótese apresenta viés, sendo o grande inconveniente o tamanho da amostra e o número de casos que apresentaram invasão da fáscia de Gerota, por essa razão, o estudo certamente terá continuidade para reavaliar esse aspecto.

Dados descritos na literatura demonstram uma correlação entre o aumento na expressão da heparanase-1 com o crescimento tumoral, o aumento da angiogênese e a maior agressividade do tumor¹²⁵.

O presente estudo não demonstrou que existe correlações diretas entre a expressão da heparanase-1 com metástases, invasão da veia renal, grau de Fuhrman, invasão da gordura perineural, estadiamento avançado, sobrevida e necrose tumoral. Provavelmente, tal resultado se deve ao fato de que os subgrupos possuíram um número reduzido de pacientes e os grupos estudados não foram homogêneos, limitando as análises estatísticas.

Ainda, é muito importante observar que apenas 16,7% dos pacientes nesse estudo apresentaram metástases no diagnóstico, portanto, tumores em estádios mais avançados, o que possivelmente também prejudicou a avaliação estatística da correlação entre metástases e expressão de heparanase-1.

Esse trabalho foi pioneiro em demonstrar a expressão de ambas heparanases, HPA1 e HPA2 em carcinoma de células renais, utilizando técnicas de imunohistoquímica. Utilizando-se quatro diferentes anticorpos policlonais foi possível concluir que a forma latente da HPA1 (65 kDa) e as variantes da HPA2, também inativas enzimaticamente, apresentaram a mesma imunomarcagem no carcinoma de células renais. Por outro lado, o anticorpo HPA1 C20, que identifica ambas variantes da HPA1, a forma latente (65 kDa) e a forma ativa (50 kDa), apresentou uma expressão significativamente aumentada quando comparada com os outros três anticorpos.

Tais resultados sugerem que a forma HPA1 50 kDa possa ser a isoforma que apresente expressão diferencialmente aumentada no carcinoma de células renais. Esta análise mostra que a forma enzimaticamente ativa da HPA1 de 50 kDa pode estar relacionada com a fisiopatologia do carcinoma de células renais, podendo ser útil como alvo de terapia molecular para o tratamento desse tipo de câncer.

O índice de expressão (IE) e o índice de positividade (IP) foram maiores no anticorpo HPA1 C20, o qual identifica de maneira específica a porção C-terminal da HPA1, a enzima de 50 kDa, cataliticamente ativa, além de identificar a forma latente de 65 kDa. Esse resultado pode sugerir

que a expressão diferencial obtida com o anticorpo HPA1 C20, isto é, o aumento significativo observado da expressão com tal anticorpo se deva possivelmente à variante HPA1 de 50 kDa, visto que o mesmo aumento não foi observado com o anticorpo HPA1 H80, o qual indica com precisão a região de aminoácidos que compreende a porção N-terminal da forma latente, inativa da HPA1 que apresenta 65 kDa. Por consequência, a HPA1 enzimaticamente ativa pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do carcinoma de células renais.

Os dados obtidos demonstraram aumento significativo de condroitim sulfato e diminuição de heparam sulfato e dermatam sulfato nas amostras de tecidos tumorais, quando comparados com amostras de tecidos não neoplásicos. Esses dados obtidos com carcinoma de células renais adicionam resultados obtidos da literatura com outros tipos de tumores que também obtiveram aumento de condroitim sulfato e diminuição de heparam sulfato e dermatam sulfato^{70,83}.

Apesar das alterações observadas em cada tipo de glicosaminoglicano sulfatado analisado nos carcinomas de células renais, não foi verificada variação na quantidade total de glicosaminoglicanos sulfatados, quando comparado tecidos tumorais com não neoplásicos.

A diminuição na quantidade de heparam sulfato encontrada nos tecidos tumorais de pacientes com carcinoma de células renais pode estar relacionada com o aumento na expressão da enzima heparanase-1 (isoforma enzimaticamente ativa 50 kDa), que degrada especificamente cadeias de

heparam sulfato de proteoglicanos ou com diminuição da síntese do heparam sulfato por enzimas específicas envolvidas na biossíntese desse composto.

Outros estudos da literatura evidenciaram o aumento de glicosaminoglicanos sulfatados na urina de pacientes com carcinoma de células renais, havendo aumento da excreção de tais compostos de acordo com o maior diâmetro do tumor renal^{126,127}. Todos esses trabalhos apenas citam o aumento da concentração dos glicosaminoglicanos sulfatados na urina, sem especificar qual o tipo de glicosaminoglicano sulfatado.

No presente estudo, foi identificado e quantificado especificamente cada glicosaminoglicano sulfatado urinário em amostras de pacientes com carcinoma de células renais (amostras coletadas pré- e pós-operatório) e amostras de indivíduos saudáveis (controle).

Houve diminuição não significativa da concentração do condroitim sulfato e heparam sulfato urinário entre os grupos controle, tumor e pós-operatório, contrariamente aos resultados obtidos em outros estudos já publicados^{126,127}. Talvez esse resultado estatístico possa ser explicado pelo número reduzido de amostras devido a perda de acompanhamento dos pacientes no pós-operatório e diminuição da coleta de urina no pós-operatório em cerca de 30% das amostras.

Cumprir ser observado que os pacientes que apresentaram maior concentração de condroitim sulfato e concentração diminuída de heparam sulfato nas amostras pré-operatórias evoluíram com uma tendência a significância estatística de maior índice de óbito ($P = 0,057$). Esse dado pode

indicar que o aumento de condroitim sulfato e diminuição do heparam sulfato nas amostras de urina podem ser indicativos de maior malignidade e possivelmente um pior prognóstico da doença. Entretanto, esse resultado deve ser confirmado com o aumento da amostra e maior variação do estadiamento e tamanho do tumor entre os pacientes, por isso, esse resultado não foi demonstrado como resultado desse estudo.

Com relação ao ácido hialurônico, alguns estudos demonstram haver elevação dos valores na urina em vários tipos histológicos de tumores, como próstata, pâncreas e tumor de Wilms. O tumor de Wilms é a neoplasia renal mais frequente na infância e o aumento desse composto na urina provavelmente se deve à existência de elementos embrionários no rim infantil¹²⁸. A excreção aumentada do ácido hialurônico em pacientes com tumor de Wilms é amplamente estudada e reconhecida, mas não existem trabalhos na literatura que tenham avaliado a concentração urinária do ácido hialurônico em pacientes com carcinoma de células renais.

No entanto, a fisiopatologia do carcinoma de células renais é totalmente diferente que a do tumor de Wilms. Talvez por essa razão não tenha sido observado correlação significativa entre a excreção de ácido hialurônico de indivíduos sadios e pacientes com carcinoma de células renais.

Durante esse estudo, houve dificuldades técnicas de encontrar o oligonucleotídeo iniciador ideal para obter a amplificação do cDNA da heparanase-1 e dificuldades para padronizar o método ideal de extração do RNA total de tecidos de carcinoma de células renais, o que acarretou a perda de

algumas amostras. Por essas razões, as análises de glicosaminoglicanos e heparanase-1 teciduais foram extraídas de um número menor, quando comparado ao número de amostras coletadas. O número reduzido das amostras de urina ocorreu principalmente pelo fato de que, em muitos casos na coleta, as amostras apresentavam alto teor de hemáceas, comprometendo as etapas de extração dos glicosaminoglicanos sulfatados e ácido hialurônico. Portanto, o número de amostras em cada subgrupo avaliado nesse estudo, em vários casos ficou reduzido, comprometendo as análises estatísticas e podendo ter causado um viés nos resultados obtidos. Apesar disso, na maioria dos artigos descritos na literatura são utilizados aproximadamente 30-40 pacientes por ano, o que demonstra um número satisfatório de amostras no presente estudo.

Durante esse estudo foi tentado formar um grupo controle ideal com fragmentos de rim em pacientes sem nenhum tipo de neoplasia. Para isso, um grupo controle do tecido tumoral constituído por fragmentos de tecido renal normal adquirido de 30 pacientes no Instituto Médico Legal do Serviço de Verificação de Óbitos da Universidade Estadual de São Paulo. Todos os 30 fragmentos de tecido renal foram adquiridos de pacientes que não apresentavam doença renal, hepática, infecção urinária ou qualquer tipo de tumor confirmado por exames laboratoriais e anatomopatológicos. A causa de morte foi sempre doença cardiovascular. O fragmento renal foi retirado até, no máximo, 6 horas após o óbito e conservado em nitrogênio líquido. Após a extração do RNA total, a viabilidade do RNA extraído demonstrou que tal RNA

apresentava degradação ampla, provavelmente devido à lise celular. Portanto, esse grupo controle foi completamente descartado desse estudo.

Os resultados obtidos das análises da expressão da heparanase e suas isoformas e do estudo do perfil de glicosaminoglicanos nos tecidos e na urina de pacientes com carcinoma de células renais evidenciam que tais compostos apresentam alterações durante o desenvolvimento tumoral e oferecem novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares da fisiopatologia da doença e assim auxiliam na busca de potenciais marcadores e alvos moleculares para novas terapias.

6 – CONCLUSÕES

1. O aumento da expressão de heparanase-1 está diretamente relacionado com a presença de tumores em carcinomas de células renais.
2. Os resultados obtidos por imunohistoquímica demonstram que tanto heparanase-1 (HPA1), como heparanase-2 (HPA2) encontram-se expressas em carcinoma de células renais.
3. A isoforma HPA1 apresenta aumento significativo na imunomarcção em tecidos tumorais comparativamente com tecidos não neoplásicos do mesmo paciente, o mesmo não é observado para HPA2.
4. Todos os anticorpos que identificam as isoformas de HPA1 e HPA2 não apresentaram diferença estatisticamente significante na intensidade de imunomarcção (ItE) entre os tecidos de carcinoma de células renais.
5. O índice de expressão (IE) e o índice de positividade (IP) aumentam significativamente nos tecidos de carcinoma de células renais com o anticorpo HPA1 C20, comparativamente com os anticorpos que reconhecem as formas inativas de HPA1 e HPA2.
6. A forma ativa de 50 kDa da heparanase-1 parece estar diretamente relacionada com o carcinoma de células renais.
7. A quantidade total de glicosaminoglicanos sulfatados é a mesma nos tecidos tumorais e não neoplásicos de pacientes com carcinoma de células renais.
8. Os tecidos tumorais apresentam significativa diminuição na quantidade de heparam sulfato e dermatam sulfato e aumento do condroitim sulfato comparativamente com tecidos não neoplásicos de carcinoma de células renais.
9. Não existem diferenças estatisticamente significantes na quantificação dos glicosaminoglicanos sulfatados (heparam sulfato e condroitim sulfato) em amostras urina dos pacientes com carcinoma de células renais, tanto

coletadas antes da cirurgia como após o procedimento cirúrgico, quando comparada com os valores obtidos para amostras de urina de indivíduos saudáveis.

10. Não existem diferenças estatisticamente significantes na quantidade de ácido hialurônico urinário de pacientes com carcinoma de células renais (amostras coletadas pré- e pós-operatório), comparativamente com amostras de urina de indivíduos não acometidos por neoplasias.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., and Thun, M. J.: Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin*, 57: 43, 2007.
2. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. et al.: Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 58: 71, 2008.
3. Ficarra, V., Galfano, A., Guille, F., Schips, L., Tostain, J., Mejean, A. et al.: A new staging system for locally advanced (pT3-4) renal cell carcinoma: a multicenter European study including 2,000 patients. *J Urol*, 178: 418, 2007.
4. Ficarra, V., Galfano, A., Mancini, M., Martignoni, G., and Artibani, W.: TNM staging system for renal-cell carcinoma: current status and future perspectives. *Lancet Oncol*, 8: 554, 2007.
5. La, V. C., Negri, E., D'Avanzo, B., and Franceschi, S.: Smoking and renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 50: 5231, 1990.
6. Kahaly, G., Hansen, C., Otto, E., Forster, G., Beyer, J., and Hommel, G.: Diabetic microangiopathy and urinary glycosaminoglycans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 105: 145, 1997.
7. Phillips, J. L., Pavlovich, C. P., Walther, M., Ried, T., and Linehan, W. M.: The genetic basis of renal epithelial tumors: advances in research and its impact on prognosis and therapy. *Curr Opin Urol*, 11: 463, 2001.
8. Lubensky, I. A., Gnarr, J. R., Bertheau, P., Walther, M. M., Linehan, W. M., and Zhuang, Z.: Allelic deletions of the VHL gene detected in multiple microscopic clear cell renal lesions in von Hippel-Lindau disease patients. *Am J Pathol*, 149: 2089, 1996.
9. Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L. et al.: Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 260: 1317, 1993.
10. Krek, W.: VHL takes HIF's breath away. *Nat Cell Biol*, 2: E121, 2000.
11. Clark, P. E.: Recent advances in targeted therapy for renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol*, 17: 331, 2007.
12. Delahunt, B., Bethwaite, P. B., and Nacey, J. N.: Outcome prediction for renal cell carcinoma: evaluation of prognostic factors for tumours divided according to histological subtype. *Pathology*, 39: 459, 2007.
13. Patard, J. J., Leray, E., Rioux-Leclercq, N., Cindolo, L., Ficarra, V., Zisman, A. et al.: Prognostic value of histologic subtypes in renal

- cell carcinoma: a multicenter experience. *J Clin Oncol*, 23: 2763, 2005.
14. Fuhrman, S. A., Lasky, L. C., and Limas, C.: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 6: 655, 1982.
 15. Jasso, R. V., Brambila, S. E., and Alcaraz, M. E.: [Prognostic factors in localised and regionally advanced renal cell carcinoma]. *Actas Urol Esp*, 32: 320, 2008.
 16. Ljungberg, B., Landberg, G., and Alamdari, F. I.: Factors of importance for prediction of survival in patients with metastatic renal cell carcinoma, treated with or without nephrectomy. *Scand J Urol Nephrol*, 34: 246, 2000.
 17. Motzer, R. J., Bacik, J., Schwartz, L. H., Reuter, V., Russo, P., Marion, S. et al.: Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 22: 454, 2004.
 18. Pahernik, S., Ziegler, S., Roos, F., Melchior, S. W., and Thuroff, J. W.: Small renal tumors: correlation of clinical and pathological features with tumor size. *J Urol*, 178: 414, 2007.
 19. Schlomer, B., Figenshau, R. S., Yan, Y., Venkatesh, R., and Bhayani, S. B.: Pathological features of renal neoplasms classified by size and symptomatology. *J Urol*, 176: 1317, 2006.
 20. Elmore, J. M., Kadesky, K. T., Koeneman, K. S., and Sagalowsky, A. I.: Reassessment of the 1997 TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer*, 98: 2329, 2003.
 21. Thompson, R. H., Leibovich, B. C., Chevillie, J. C., Webster, W. S., Lohse, C. M., Kwon, E. D. et al.: Is renal sinus fat invasion the same as perinephric fat invasion for pT3a renal cell carcinoma? *J Urol*, 174: 1218, 2005.
 22. Terrone, C., Gontero, P., Volpe, A., Porpiglia, F., Bollito, E., Zattoni, F. et al.: Proposal of an improved prognostic classification for pT3 renal cell carcinoma. *J Urol*, 180: 72, 2008.
 23. Gudbjartsson, T., Hardarson, S., Petursdottir, V., Thoroddsen, A., Magnusson, J., and Einarsson, G. V.: Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. *Eur Urol*, 48: 593, 2005.

24. Kim, H., Cho, N. H., Kim, D. S., Kwon, Y. M., Kim, E. K., Rha, S. H. et al.: Renal cell carcinoma in South Korea: a multicenter study. *Hum Pathol*, 35: 1556, 2004.
25. Minervini, A., Di, C. C., Gacci, M., Serni, S., Menicagli, M., Lanciotti, M. et al.: Prognostic role of histological necrosis for nonmetastatic clear cell renal cell carcinoma: correlation with pathological features and molecular markers. *J Urol*, 180: 1284, 2008.
26. Delahunt, B., Ribas, J. L., Nacey, J. N., and Bethwaite, P. B.: Nucleolar organizer regions and prognosis in renal cell carcinoma. *J Pathol*, 163: 31, 1991.
27. Moch, H., Sauter, G., Buchholz, N., Gasser, T. C., Bubendorf, L., Waldman, F. M. et al.: Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Hum Pathol*, 28: 1255, 1997.
28. Migita, T., Oda, Y., Naito, S., and Tsuneyoshi, M.: Low expression of p27(Kip1) is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer*, 94: 973, 2002.
29. Uemura, H., Nakagawa, Y., Yoshida, K., Saga, S., Yoshikawa, K., Hirao, Y. et al.: MN/CA IX/G250 as a potential target for immunotherapy of renal cell carcinomas. *Br J Cancer*, 81: 741, 1999.
30. Kim, H. L., Seligson, D., Liu, X., Janzen, N., Bui, M. H., Yu, H. et al.: Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10: 5464, 2004.
31. Kim, H. L., Seligson, D., Liu, X., Janzen, N., Bui, M. H., Yu, H. et al.: Using tumor markers to predict the survival of patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol*, 173: 1496, 2005.
32. Robson, C. J., Churchill, B. M., and Anderson, W.: The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol*, 101: 297, 1969.
33. Clayman, R. V., Kavoussi, L. R., Soper, N. J., Dierks, S. M., Meretyk, S., Darcy, M. D. et al.: Laparoscopic nephrectomy: initial case report. *J Urol*, 146: 278, 1991.
34. Colombo, J. R., Jr., Haber, G. P., Aron, M., Cocuzza, M., Colombo, R., Kaouk, J. et al.: Oncological outcomes of laparoscopic radical nephrectomy for renal cancer. *Clinics*, 62: 251, 2007.
35. Patard, J. J., Shvarts, O., Lam, J. S., Pantuck, A. J., Kim, H. L., Ficarra, V. et al.: Safety and efficacy of partial nephrectomy for all T1 tumors

- based on an international multicenter experience. *J Urol*, 171: 2181, 2004.
36. Permpongkosol, S., Bagga, H. S., Romero, F. R., Sroka, M., Jarrett, T. W., and Kavoussi, L. R.: Laparoscopic versus open partial nephrectomy for the treatment of pathological T1N0M0 renal cell carcinoma: a 5-year survival rate. *J Urol*, 176: 1984, 2006.
 37. Berger, A., Kamoi, K., Gill, I. S., and Aron, M.: Cryoablation for renal tumors: current status. *Curr Opin Urol*, 19: 138, 2009.
 38. Malcolm, J. B., Berry, T. T., Williams, M. B., Logan, J. E., Given, R. W., Lance, R. S. et al.: Single center experience with percutaneous and laparoscopic cryoablation of small renal masses. *J Endourol*, 23: 907, 2009.
 39. Motzer, R. J., Bacik, J., Murphy, B. A., Russo, P., and Mazumdar, M.: Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 20: 289, 2002.
 40. Coppin, C., Porzsolt, F., Awa, A., Kumpf, J., Coldman, A., and Wilt, T.: Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001425, 2005.
 41. Negrier, S., Escudier, B., Lasset, C., Douillard, J. Y., Savary, J., Chevreau, C. et al.: Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie. *N Engl J Med*, 338: 1272, 1998.
 42. Negrier, S., Gomez, F., Douillard, J. Y., Ravaud, A., Chevreau, C., Buclon, M. et al.: Prognostic factors of response or failure of treatment in patients with metastatic renal carcinomas treated by cytokines: a report from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *World J Urol*, 23: 161, 2005.
 43. Lopez, H. E., Kirchner, H., and Atzpodien, J.: Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma: risks and benefits in 215 consecutive single institution patients. *J Urol*, 155: 19, 1996.
 44. Escudier, B.: Advanced renal cell carcinoma: current and emerging management strategies. *Drugs*, 67: 1257, 2007.
 45. Escudier, B., Szczylik, C., Hutson, T. E., Demkow, T., Staehler, M., Rolland, F. et al.: Randomized phase II trial of first-line treatment with sorafenib versus interferon Alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 27: 1280, 2009.

46. Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A. et al.: Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356: 2271, 2007.
47. Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Rixe, O. et al.: Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356: 115, 2007.
48. Konety, B. R., Nangia, A. K., Nguyen, T. S., Veitmeier, B. N., Dhir, R., Acierno, J. S. et al.: Identification of nuclear matrix protein alterations associated with renal cell carcinoma. *J Urol*, 159: 1359, 1998.
49. Miner, J. H.: Renal basement membrane components. *Kidney Int*, 56: 2016, 1999.
50. Vlodaysky, 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*, 12: 121, 2002.
51. Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. et al.: Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 68: 729, 1999.
52. Couchman, J. R., Abrahamson, D. R., and McCarthy, K. J.: Basement membrane proteoglycans and development. *Kidney Int*, 43: 79, 1993.
53. Tersariol, I. L., Ferreira, T. M., Medeiros, M. G., Porcionatto, M. A., Moraes, C. T., Abreu, L. R. et al.: Sequencing of heparan sulfate proteoglycans: identification of variable and constant oligosaccharide regions in eight heparan sulfate proteoglycans of different origins. *Braz J Med Biol Res*, 27: 2097, 1994.
54. Schonherr, E. and Hausser, H. J.: Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol*, 7: 89, 2000.
55. Shriver, Z., Liu, D., and Sasisekharan, R.: Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions. *Trends Cardiovasc Med*, 12: 71, 2002.
56. Russell, D. L., Ochsner, S. A., Hsieh, M., Mulders, S., and Richards, J. S.: Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology*, 144: 1020, 2003.

57. Ruoslahti, E., Bourdon, M., and Krusius, T.: Molecular cloning of proteoglycan core proteins. *Ciba Found Symp*, 124: 260, 1986.
58. Blackhall, F. H., Merry, C. L., Davies, E. J., and Jayson, G. C.: Heparan sulfate proteoglycans and cancer. *Br J Cancer*, 85: 1094, 2001.
59. Caulfield, J. P. and Farquhar, M. G.: Distribution of anionic sites in glomerular basement membranes: their possible role in filtration and attachment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 1646, 1976.
60. Pavlov, S. B.: [Urinary excretion of glycosaminoglycans in patients with chronic pyelonephritis and chronic glomerulonephritis]. *Klin Med (Mosk)*, 76: 41, 1998.
61. van Bruggen, M. C., Kramers, K., Hylkema, M. N., van den, B. J., Bakker, M. A., Assmann, K. J. et al.: Decrease of heparan sulfate staining in the glomerular basement membrane in murine lupus nephritis. *Am J Pathol*, 146: 753, 1995.
62. Konukoglu, D., Akcay, T., and Erozcenci, A.: The importance urinary glycosaminoglycan as a marker for superficial bladder tumors. *Cancer Biochem Biophys*, 15: 91, 1995.
63. Akcay, T., Erozcenci, A., Erbas, M., Konukoglu, D., Ataus, S., Kural, A. R. et al.: Urinary excretion of glycosaminoglycans in patients with superficial bladder tumors. *Cancer Biochem Biophys*, 13: 279, 1993.
64. Tencer, J., Torffvit, O., Grubb, A., Bjornsson, S., Thysell, H., and Rippe, B.: Decreased excretion of urine glycosaminoglycans as marker in renal amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant*, 12: 1161, 1997.
65. Yokoyama, H., Sato, K., Okudaira, M., Morita, C., Takahashi, C., Suzuki, D. et al.: Serum and urinary concentrations of heparan sulfate in patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 56: 650, 1999.
66. Lee, E. Y., Kim, S. H., Whang, S. K., Hwang, K. Y., Yang, J. O., and Hong, S. Y.: Isolation, identification, and quantitation of urinary glycosaminoglycans. *Am J Nephrol*, 23: 152, 2003.
67. Dietrich, C. P., Sampaio, L. O., Toledo, O. M., and Cassaro, C. M.: Cell recognition and adhesiveness: a possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides. *Biochem Biophys Res Commun*, 75: 329, 1977.
68. Dietrich, C. P., Nader, H. B., and Straus, A. H.: Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin. *Biochem Biophys Res Commun*, 111: 865, 1983.

69. Dietrich, C. P. and Armelin, H. A.: Sulfated mucopolysaccharides from normal Swiss 3T3 cell line and its tumorigenic mutant ST1: possible role of chondroitin sulfates in neoplastic transformation. *Biochem Biophys Res Commun*, 84: 794, 1978.
70. Dietrich, C. P., Martins, J. R., Sampaio, L. O., and Nader, H. B.: Anomalous structure of urinary chondroitin sulfate from cancer patients. A potential new marker for diagnosis of neoplasias. *Lab Invest*, 68: 439, 1993.
71. Pinhal, M. A., Smith, B., Olson, S., Aikawa, J., Kimata, K., and Esko, J. D.: Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 12984, 2001.
72. Porcionatto, M. A., Nader, H. B., and Dietrich, C. P.: Heparan sulfate and cell division. *Braz J Med Biol Res*, 32: 539, 1999.
73. Porcionatto, M. A., Pinto, C. R., Dietrich, C. P., and Nader, H. B.: Heparan sulfate proteoglycan and control of cell proliferation: enhanced synthesis induced by phorbol ester (PMA) during G(1)-phase. *Braz J Med Biol Res*, 27: 2185, 1994.
74. Porcionatto, M. A., Moreira, C. R., Lotfi, C. F., Armelin, H. A., Dietrich, C. P., and Nader, H. B.: Stimulation of heparan sulfate proteoglycan synthesis and secretion during G1 phase induced by growth factors and PMA. *J Cell Biochem*, 70: 563, 1998.
75. Kraemer, P. M.: Heparan sulfates of cultured cells. II. Acid-soluble and -precipitable species of different cell lines. *Biochemistry*, 10: 1445, 1971.
76. Delacoux, F., Fichard, A., Geourjon, C., Garrone, R., and Ruggiero, F.: Molecular features of the collagen V heparin binding site. *J Biol Chem*, 273: 15069, 1998.
77. Faham, S., Linhardt, R. J., and Rees, D. C.: Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Curr Opin Struct Biol*, 8: 578, 1998.
78. Iozzo, R. V. and San Antonio, J. D.: Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest*, 108: 349, 2001.
79. Vlodaysky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Metzger, S., Chajek-Shaul, T., Atzmon, R. et al.: Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and normal development. *Biochimie*, 83: 831, 2001.

80. Carney, S. L. and Muir, H.: The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol Rev*, 68: 858, 1988.
81. Michelacci, Y. M., Mourao, P. A., Laredo, J., and Dietrich, C. P.: Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage. *Connect Tissue Res*, 7: 29, 1979.
82. Mourao, P. A., Rozenfeld, S., Laredo, J., and Dietrich, C. P.: The distribution of chondroitin sulfates in articular and growth cartilages of human bones. *Biochim Biophys Acta*, 428: 19, 1976.
83. Jeronimo, S. M., Sales, A. O., Fernandes, M. Z., Melo, F. P., Sampaio, L. O., Dietrich, C. P. et al.: Glycosaminoglycan structure and content differ according to the origins of human tumors. *Braz J Med Biol Res*, 27: 2253, 1994.
84. Dietrich, C. P., Sampaio, L. O., Montes de, O. H., and Nader, H. B.: Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation. *An Acad Bras Cienc*, 52: 179, 1980.
85. Mourao, P. A., Toledo, S. P., and Dietrich, C. P.: [Urinary mucopolysaccharides in acheiropodia]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*, 32: 229, 1977.
86. Scott, J. E., Orford, C. R., and Hughes, E. W.: Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation. *Biochem J*, 195: 573, 1981.
87. Delpech, B., Girard, N., Bertrand, P., Courel, M. N., Chauzy, C., and Delpech, A.: Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Intern Med*, 242: 41, 1997.
88. Mathews, M. B.: Connective tissue. Macromolecular structure and evolution. *Mol Biol Biochem Biophys*, 1, 1975.
89. Gibson, P. R., Fraser, J. R., Colman, J. C., Jones, P. A., Jennings, G., and Dudley, F. J.: Change in serum hyaluronan: a simple index of short-term drug-induced changes in hepatic sinusoidal perfusion. *Gastroenterology*, 105: 470, 1993.
90. Dorfman, A., Markovitz, A., and Cifonellei, J. A.: Metabolism of hyaluronic acid and chondroitinsulfuric acids. *Fed Proc*, 17: 1093, 1958.
91. Fraser, J. R., Laurent, T. C., and Laurent, U. B.: Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*, 242: 27, 1997.

92. Sampaio, L. O. and Dietrich, C. P.: Changes of sulfated mucopolysaccharides and mucopolysaccharidases during fetal development. *J Biol Chem*, 256: 9205, 1981.
93. Folkman, J. and Shing, Y.: Control of angiogenesis by heparin and other sulfated polysaccharides. *Adv Exp Med Biol*, 313: 355, 1992.
94. Laurent, T. C., Laurent, U. B., and Fraser, J. R.: The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunol Cell Biol*, 74: A1, 1996.
95. Yung, S. and Chan, T. M.: Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities? *Perit Dial Int*, 27 Suppl 2: S104, 2007.
96. Laurent, T. C. and Fraser, J. R.: Hyaluronan. *FASEB J*, 6: 2397, 1992.
97. Weigel, P. H., Hascall, V. C., and Tammi, M.: Hyaluronan synthases. *J Biol Chem*, 272: 13997, 1997.
98. Philipson, L. H. and Schwartz, N. B.: Subcellular localization of hyaluronate synthetase in oligodendroglioma cells. *J Biol Chem*, 259: 5017, 1984.
99. Guechot, J., Poupon, R. E., and Poupon, R.: Serum hyaluronan as a marker of liver fibrosis. *J Hepatol*, 22: 103, 1995.
100. Cooper, E. H. and Forbes, M. A.: Serum hyaluronic acid levels in cancer. *Br J Cancer*, 58: 668, 1988.
101. Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R. et al.: Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nat Med*, 5: 793, 1999.
102. Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G., and Narayanasami, U.: Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2: 521, 2002.
103. Goldshmidt, O., Zcharia, E., Abramovitch, R., Metzger, S., Aingorn, H., Friedmann, Y. et al.: Cell surface expression and secretion of heparanase markedly promote tumor angiogenesis and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 10031, 2002.
104. Dong, J., Kukula, A. K., Toyoshima, M., and Nakajima, M.: Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene. *Gene*, 253: 171, 2000.

105. Kjellen, L., Pertoft, H., Oldberg, A., and Hook, M.: Oligosaccharides generated by an endoglucuronidase are intermediates in the intracellular degradation of heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 260: 8416, 1985.
106. Yanagishita, M.: Inhibition of intracellular degradation of proteoglycans by leupeptin in rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem*, 260: 11075, 1985.
107. Nasser, N. J., Avivi, A., Shushy, M., Vlodaysky, I., and Nevo, E.: Cloning, expression, and characterization of an alternatively spliced variant of human heparanase. *Biochem Biophys Res Commun*, 354: 33, 2007.
108. Reiland, J., Sanderson, R. D., Waguespack, M., Barker, S. A., Long, R., Carson, D. D. et al.: Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate: functional implications for tumor cell invasion. *J Biol Chem*, 279: 8047, 2004.
109. Cohen, I. R., Murdoch, A. D., Naso, M. F., Marchetti, D., Berd, D., and Iozzo, R. V.: Abnormal expression of perlecan proteoglycan in metastatic melanomas. *Cancer Res*, 54: 5771, 1994.
110. Hulett, M. D., Freeman, C., Hamdorf, B. J., Baker, R. T., Harris, M. J., and Parish, C. R.: Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. *Nat Med*, 5: 803, 1999.
111. Vlodaysky, I., Elkin, M., Pappo, O., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R. et al.: Mammalian heparanase as mediator of tumor metastasis and angiogenesis. *Isr Med Assoc J*, 2 Suppl: 37, 2000.
112. Friedmann, Y., Vlodaysky, I., Aingorn, H., Aviv, A., Peretz, T., Pecker, I. 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*, 157: 1167, 2000.
113. Waterman, T. A., Hagen, J. A., Peters, J. H., DeMeester, S. R., Taylor, C. R., and Demeester, T. R.: The prognostic importance of immunohistochemically detected node metastases in resected esophageal adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*, 78: 1161, 2004.
114. Zcharia, E., Metzger, S., Chajek-Shaul, T., Friedmann, Y., Pappo, O., Aviv, A. et al.: Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and mammary gland morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 6: 311, 2001.

115. LH Sobin and C Wittekind, TNM classification malignant tumours (6th), Willey-Liss, 2002, pp 193-195. 2009.
Ref Type: Generic
116. Matos, L. L., Stabenow, E., Tavares, M. R., Ferraz, A. R., Capelozzi, V. L., and Pinhal, M. A.: Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (Sao Paulo)*, 61: 417, 2006.
117. Matos, L. L., Stabenow, E., Tavares, M. R., Ferraz, A. R., Capelozzi, V. L., and Pinhal, M. A.: Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics (Sao Paulo)*, 61: 417, 2006.
118. Kaplan, D.: Classification of the mucopolysaccharidoses based on the pattern of mucopolysacchariduria. *Am J Med*, 47: 721, 1969.
119. Meyer, K.: Biochemistry and biology of mucopolysaccharides. *Am J Med*, 47: 664, 1969.
120. Dietrich, C. P. and Dietrich, S. M.: Electrophoretic behaviour of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem*, 70: 645, 1976.
121. Martins, J. R., Furlanetto, R. P., Oliveira, L. M., Mendes, A., Passerotti, C. C., Chiamolera, M. I. et al.: Comparison of practical methods for urinary glycosaminoglycans and serum hyaluronan with clinical activity scores in patients with Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 60: 726, 2004.
122. Martins, J. R., Passerotti, C. C., Maciel, R. M., Sampaio, L. O., Dietrich, C. P., and Nader, H. B.: Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal Biochem*, 319: 65, 2003.
123. McKenzie, E., Tyson, K., Stamps, A., Smith, P., Turner, P., Barry, R. et al.: Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member. *Biochem Biophys Res Commun*, 276: 1170, 2000.
124. Thompson, R. H., Kurta, J. M., Kaag, M., Tickoo, S. K., Kundu, S., Katz, D. et al.: Tumor Size is Associated With Malignant Potential in Renal Cell Carcinoma Cases. *J Urol*, 2009.
125. Mikami, S., Oya, M., Shimoda, M., Mizuno, R., Ishida, M., Kosaka, T. et al.: Expression of heparanase in renal cell carcinomas: implications for tumor invasion and prognosis. *Clin Cancer Res*, 14: 6055, 2008.

126. Rodriguez-Cuartero, A., Ojea-Arnedo, J. L., and Perez-Blanco, F. J.: Urinary glycosaminoglycans in renal cell carcinoma. *Clin Nephrol*, 50: 394, 1998.
127. Sarica, K., Turkolmez, K., Soygur, T., Ozer, G., Yaman, M. O., Baltaci, S. et al.: Evaluation of urinary glycosaminoglycan excretion in patients with renal cell carcinoma. *Eur Urol*, 31: 54, 1997.
128. Lin, R. Y., Argenta, P. A., Sullivan, K. M., Stern, R., and Adzick, N. S.: Urinary hyaluronic acid is a Wilms' tumor marker. *J Pediatr Surg*, 30: 304, 1995.

8 - ANEXO

Anexo 1. Concentração de RNA total extraído das amostras de tecidos.

Amostra	RNA total(ug/uL)	Volume total (uL)	Relação (280nm/260nm)	Proteína (ug/mL)
#03 NN	8,470	50	1,849	0,0
#03 Tumor	13,615	50	1,826	0,1
#09 NN	3,850	50	1,848	0,0
#09 Tumor	3,920	50	1,821	0,0
#10 NN	0,421	25	1,328	0,0
#10 Tumor	20,804	50	0,0	0,0
#11 NN	7,308	25	1,518	0,0
#11 Tumor	13,804	50	1,652	0,0
#12 NN	6,476	50	1,653	0,1
#12 Tumor	3,062	50	1,672	0,1
#15 NN	18,500	50	1,515	0,1
#15 Tumor	11,500	50	1,795	0,0
#16 NN	16,700	50	1,502	0,1
#16 Tumor	15,400	50	1,701	0,1
#18 NN	4,060	50	1,818	0,0
#18 Tumor	11,900	50	1,848	0,1
#20 NN	4,267	50	1,802	0,0
#20 Tumor	2,962	50	1,808	0,0
#21 NN	5,495	50	1,879	0,0
#21 Tumor	14,350	50	1,919	0,0
#22 NN	2,756	50	1,763	0,0
#22 Tumor	3,045	50	1,713	0,0
#23 NN	9,660	25	1,534	0,0
#23 Tumor	8,120	50	1,635	0,0
#24 NN	3,976	50	0,0	0,0
#24 Tumor	3,68	50	0,0	0,0
#25 NN	9,814	50	1,765	0,1
#25 Tumor	8,559	50	1,565	0,2
#27 NN	5,075	50	1,844	0,0
#27 Tumor	4,200	50	1,843	0,0
#28 NN	16,251	50	1,908	0,1
#28 Tumor	16,322	75	1,709	0,2
#30 NN	8,540	50	1,804	0,1
#30 Tumor	8,736	50	1,678	0,1
#31 NN	7,560	50	1,851	0,0
#31 Tumor	4,340	50	1,819	0,0
#32 NN	13,303	75	1,878	0,1
#32 Tumor	9,196	75	1,766	0,1
#33 NN	11,408	75	1,936	0,0
#33 Tumor	9,547	75	1,800	0,1

NN: tecido não neoplásico

Anexo 2: Quantificação das reações de amplificações de GAPDH e heparanase

	Amostra	GAPDH (u.d.)	Heparanase (u.d.)	Expressão Heparanase/GAPDH
#01	NN	104,06	---	---
	Tumor	101,13	70,15	0,69
#03	NN	109,34	---	---
	Tumor	110,71	81,53	0,74
#07	NN	125,74	---	---
	Tumor	111,34	---	---
#09	NN	124,85	---	---
	Tumor	100,14	---	---
#10	NN	83,09	---	---
	Tumor	108,97	89,64	0,82
#11	NN	110,18	---	---
	Tumor	124,99	84,63	0,68
#12	NN	109,48	---	---
	Tumor	109,84	86,34	0,79
#15	NN	114,66	---	---
	Tumor	117,48	71,99	0,61
#16	NN	107,77	---	---
	Tumor	114,18	68,32	0,60
#17	NN	107,61	---	---
	Tumor	111,57	---	---
#18	NN	134,82	---	---
	Tumor	118,03	84,12	0,71
#20	NN	94,94	---	---
	Tumor	117,53	---	---
#21	NN	103,56	---	---
	Tumor	107,86	94,75	0,88
#22	NN	116,74	---	---
	Tumor	107,87	---	---
#23	NN	126,69	---	---
	Tumor	123,11	---	---
#24	NN	114,81	---	---
	Tumor	104,89	68,27	0,65
#25	NN	127,14	---	---
	Tumor	121,76	---	---
#27	NN	136,12	67,07	0,67
	Tumor	129,37	---	---
#28	NN	122,56	---	---
	Tumor	129,97	---	---
#29	NN	122,98	---	---
	Tumor	110,65	---	---
#30	NN	114,26	---	---
	Tumor	117,19	73,05	0,62
#31	NN	109,16	---	---
	Tumor	129,47	---	---
#32	NN	107,22	---	---
	Tumor	110,64	---	---
#33	NN	120,84	---	---
	Tumor	112,13	---	---

(---): não houve expressão da heparanase

NN: não neoplásico

Anexo 3: A expressão da heparanase dividido em grupos de acordo com tamanho do tumor renal

Tamanho (cm) (1: até 7; 2: 7-10; 3: > 10)	Heparanase
1	0
1	0,68
1	0,79
1	0,61
1	0,88
1	0,65
1	0,67
1	0
1	0
1	0
1	0
2	0,69
2	0
2	0
2	0,71
2	0
2	0
2	0
2	0
3	0,74
3	0,82
3	0,6
3	0
3	0,68

Anexo 4: Comparação entre o estadiamento e expressão da heparanase com o seguimento dos pacientes

Pac	Estadiamento	Heparanase	Seguimento
1	T2	0,69	faleceu (outra causa)
3	T4	0,74	faleceu
7	T1	0	faleceu (outra causa)
9	T2	0	?
10	T4	0,82	faleceu
11	T1	0,68	vivo
12	T1	0,79	vivo
15	T1	0,61	vivo
16	T3	0,6	faleceu
17	T2	0	?
18	T2	0,71	faleceu
20	T2	0	faleceu
21	T1	0,88	?
22	T2	0	?
23	T3	0	metástase
24	T2	0,65	vivo
25	T1	0	?
27	T1	0	vivo
28	T1	0,67	?
29	T1	0	vivo
30	T2	0,68	?
31	T2	0	metástase
32	T2	0	?
33	T1	0	?

(?): paciente perdeu o seguimento

Pac: paciente

Anexo 5: Consentimento informado

Dosagem de glicosaminoglicanos e heparanase na urina, no tecido renal normal e com câncer de pacientes com câncer renal

CONSENTIMENTO INFORMADO E ESCLARECIDO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA:

O câncer renal é responsável por 3% de todos os tumores no adulto, sendo o câncer urológico mais letal. O crescimento tumoral lento, o baixo risco de se espalhar no início, e o difícil diagnóstico histológico pré-operatório ajudam os pacientes a evoluírem sem sintomas. Deste modo, vários casos já se apresentam espalhados por várias partes do corpo na ocasião do diagnóstico da doença. O achado, por ultra-sonografia e/ou tomografia, incidental, de pequenas lesões nos rins tem sido responsável pelo diagnóstico mais precoce dos tumores renais.

O estudo da biologia molecular têm tido papel fundamental na compreensão das alterações estruturais funcionais dessas células tumorais. A pesquisa de alterações moleculares nas células tumorais, estruturas próximas a essas células e partes da membrana celular são de fundamental importância no desenvolvimento de novos marcadores tumorais, mais sensíveis e específicos.

Esse estudo identifica e quantifica as moléculas (glicosaminoglicanos e heparanase) na urina e no tecido normal e tumoral do rim como marcador tumoral.

A sua participação será voluntária e você poderá recusar-se a participar ou mesmo retirar-se do estudo a qualquer momento, sem ocorrência de multas ou perda dos benefícios a que tenha direito, seu tratamento futuro não será afetado de nenhuma forma por essa opção.

OBJETIVO

Identificar e quantificar os glicosaminoglicanos e heparanase na urina, no tecido renal tumoral e normal de pacientes com câncer renal.

PROCEDIMENTOS A SEREM SEGUIDOS

Caso você aceite a participar desse estudo, o seu médico deverá preencher um questionário. O estudo é dividido em quatro grupos. Caso você pertença ao grupo caso, no pré-operatório, amostras de urina serão colhidas para dosagem de glicosaminoglicanos. Uma amostra do tecido tumoral (TT) e normal do rim (TN) serão encaminhadas para análise anátomo-patológica em nosso serviço. No 4º mês pós-operatório, novas amostras de urina serão coletadas para a dosagem das mesmas moléculas supra citadas.

Caso você pertença ao grupo controle, amostras de urina (PU) serão colhidas para a dosagem de glicosaminoglicanos.

Caso você pertença ao grupo controle-cadáver, você deverá ser o parente ou responsável pelo cadáver. Uma pequena amostra do rim será coletada durante a autópsia para dosar os glicosaminoglicanos e heparanase.

GARANTIA DE SIGILO

Todas as informações que forem obtidas sobre você durante o estudo serão confidenciais, e não serão reveladas a terceiros sem autorização prévia. Na publicação dos resultados do estudo o seu nome não será identificado.

RESSARCIMENTO DE DESPESAS

O trabalho não tem fins lucrativos e enquadra-se única e puramente no contexto científico. Sua participação no estudo não acarretará nenhuma despesa adicional. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação.

GARANTIA DE INFORMAÇÃO

Você, seu parente ou responsável legal, tem o direito de fazer qualquer pergunta sobre sua doença ou qualquer aspecto com relação ao estudo. Em

caso de dúvidas, você deve contatar Dr. Lucas Teixeira Batista, no Hospital de Ensino Padre Anchieta ou Hospital Estadual Mário Covas, setor de Urologia ou no Hospital Santa Marcelina.

Após ter recebido todas as informações relacionadas ao estudo, eu, _____, certifico que o Dr. _____, respondeu todas as minhas perguntas sobre o estudo e minha condição, isto não afetará meus cuidados médicos ou de parentes meus no presente e no futuro. Todas as informações a meu respeito serão confidenciais. Concordo que os dados obtidos e fornecidos neste estudo sejam documentados e publicados sem haver a identificação do paciente. O paciente poderá a qualquer momento e por qualquer motivo se retirar deste estudo, bastando que para isso expresse essa vontade ao médico responsável. Sua desistência não implicará em forma alguma em alteração do seu tratamento.

_____, _____
 data, local Assinatura do paciente/representante

legal

_____, _____
 data, local Assinatura do médico

Anexo 6: Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 16 de fevereiro de 2007.
CEP 1371/06

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) LUCAS TEIXEIRA E AGUIAR BATISTA
Co-Investigadores: Maria Aparecida da Silva Pinhal (orientadora)
Disciplina/Departamento: Clínica Médica/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: CAPES.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Identificação e quantificação de glicosaminoglicanos e heparanase no plasma, na urina, no tecido renal normal e tumoral de pacientes em carcinoma de células renais”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: intervenção diagnóstica.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: sem risco, desconforto leve, envolvendo coleta de sangue.

OBJETIVOS: Identificação e quantificação dos glicosaminoglicanos no plasma, na urina de pacientes com carcinoma de células renais. Identificação e quantificação da estrutura molecular dos glicosaminoglicanos no tecido tumoral, normal e transição entre tumoral e normal de pacientes com carcinoma de células renais. Identificação e quantificação da heparanase no sangue, no tecido tumoral, normal e transição entre tumoral e normal de pacientes com carcinoma de células renais. Avaliar os glicosaminoglicanos e heparanase como um novo marcador tumoral para o carcinoma de células renais..

RESUMO: O estudo será realizado na Faculdade de Medicina do ABC (aprovação do CEP), Hospital de Ensino Padre Anchieta e Hospital Estadual Mário Covas pelas disciplinas de Urologia e de Bioquímica. Serão constituídos 3 grupos, sendo um caso e dois controles. O grupo caso será constituído de 30 pacientes submetidos à nefrectomia radical ou parcial e diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma de células renais. Glicosaminoglicanos serão dosados em amostras de sangue e urina e a heparanase será dosada no plasma. Em cada rim operado será retirado seis fragmentos da peça cirúrgica contendo tecido tumoral, margem entre tumor e tecido normal e tecido macroscopicamente normal, e enviados para estudo anátomo-patológico e bioquímico, para identificar e quantificar a estrutura molecular referente aos glicosaminoglicanos e heparanase. Os grupos controles serão subdivididos em grupo cadavérico (GC) , cujos fragmentos renais serão adquiridos no Serviço de Verificação de Óbitos da USP; e grupo controle com amostras de plasma e urina (GPU), composto por 30 pacientes acompanhados em ambulatório. Serão realizadas dosagens de glicosaminoglicanos e heparanase.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo fundamentado, visando avaliar glicosaminoglicanos e heparanase em pacientes com carcinoma de células renais. Serão realizadas dosagens em sangue, urina e tecido renal tumoral e normal.

MATERIAL E MÉTODO: Descreve a metodologia empregada, sendo técnicas de domínio da orientadora.

TCLE: adequado de acordo com a Res 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: CAPES.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 11/2/2008 e 5/2/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

Anexar o endereço do pesquisador e do CEP no novo TCLE



Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina do ABC
Mantida pela Fundação do ABC

REGISTRO CEP FMABC PROTOCOLO Nº 157/2004

Santo André, 09 de dezembro de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).
Prof. Dr. Eric Roger Wroclawski

Prezado(a) Senhor(a):

Servimo-nos do presente para informar a V. Sa., que o protocolo de pesquisa intitulado: **"IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEOGLICANOS NO PLASMA, NA URINA, NO TECIDO RENAL NORMAL E TUMORAL DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIAS"** foi aprovado em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa da FMABC, realizada em **08/12/2004**.

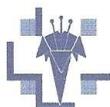
Salientamos que o CEP/FMABC deverá ser comunicado quando o projeto for concluído.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos com os protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Elie Fiss
Presidente do Comitê de Ética
em Pesquisa da FMABC



Comitê de Ética em Pesquisa - CSSM
Rua Santa Marcelina, 177- CEP: 08270-070 - São Paulo - SP
Fone(011) 6170.6000 - 6170.6237 - Fax (11) 6524.9260
www.santamarcelina.org - comissoes@santamarcelina.org

CEP nº 17/2005

São Paulo, 11 de maio de 2005.

Ilmo. (a). Sr. (a).

Pesquisador(a): **Minori Saito**

Ref.: Projeto de Pesquisa

“Identificação e quantificação de glicosaminoglicanos no plasma, na urina, no tecido renal, normal e tumoral de pacientes com carcinoma de células renais”.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Casa de Saúde Santa Marcelina analisou e aprovou o projeto acima, na octogésima segunda reunião do dia vinte e nove do mês de abril de dois mil e cinco.

Atenciosamente,

Dra. Giuseppina Raineri

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - CSSM

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)