

CLARICE SILVIA TAEMI ORIGASSA

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA
HEPARANASE EM PLASMA DE PACIENTES COM CARCINOMAS
GATROINTESTINAIS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.**

**SÃO PAULO
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CLARICE SILVIA TAEMI ORIGASSA

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA
HEPARANASE EM PLASMA DE PACIENTES COM CARCINOMAS
GATROINTESTINAIS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências.**

**SÃO PAULO
2009**

ORIGASSA, Clarice Silvia Taemi

Identificação e quantificação das isoformas da heparanase em plasma de pacientes com carcinomas gatrointestinais, São Paulo, 2009, xxip, 118f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina.

Título em Inglês: Identification and quantification of plasma heparanase isoforms in gastrointestinal carcinoma patients.

Descritores: 1. Carcinomas 2. Heparan sulfato 3. Plasma 4. Heparanases

Tese preparada no Departamento de Medicina durante o curso de pós-graduação em Clínica Médica e apresentada à Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Professora Doutora Maria Aparecida da Silva Pinhal

Co-orientadora: Professora Doutora Helena Bonciani Nader

CLARICE SILVIA TAEMI ORIGASSA

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS ISOFORMAS DA
HEPARANASE EM PLASMA DE PACIENTES COM CARCINOMAS
GATROINTESTINAIS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Mariana da Silva Araujo (UNIFESP)

Prof. Dra. Ethel Zimberg Chehter (FMABC)

Prof. Dr. Tarcísio Triviño (UNIFESP)

Prof. Dr. Wilson Roberto Catapani (FMABC)

Aprovada em 14/05/2009

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Matriz extracelular..... | 1 |
| Componentes estruturais da matriz extracelular..... | 2 |
| 1.1.1. Colágenos..... | 2 |
| 1.1.2. Fibronectinas..... | 4 |
| 1.1.3. Lamininas..... | 6 |
| 1.1.4. Glicosaminoglicanos..... | 8 |
| 1.1.5. Proteoglicanos..... | 14 |
| 1.2. Classificação dos proteoglicanos..... | 16 |
| Família dos Sindecans..... | 17 |
| Sindecam-4..... | 19 |
| Sindecam-3..... | 20 |
| Sindecam-2..... | 21 |
| Sindecam-1..... | 22 |
| 1.3. Biossíntese dos glicosaminoglicanos..... | 24 |
| 1.4. Estrutura e função do heparam sulfato..... | 26 |
| 1.5. Degradação dos proteoglicanos..... | 30 |
| 1.5.1. Heparanase-1..... | 32 |
| 1.5.2. Heparanase-2..... | 38 |
| 1.5.3. Distribuição e função da heparanase..... | 40 |
| 1.6. Matriz extracelular e metástases tumorais..... | 41 |
| 1.7. Heparanase como alvo para o desenvolvimento de drogas anticâncer..... | 46 |
| 1.8. Neoplasia..... | 47 |
| Progressão da neoplasia gastrointestinal..... | 50 |
| 1.9. Câncer gastrointestinal e a ação da heparanase..... | 53 |
| 1.9.1. Câncer colorretal..... | 53 |
| 1.9.2. Câncer de esôfago..... | 55 |
| 1.9.3. Câncer de estômago..... | 59 |
| 1.9.4. Câncer de fígado..... | 61 |
| 2. OBJETIVOS..... | 64 |

| | |
|---|------------|
| 3. MATERIAIS..... | 65 |
| 3.1. Reagentes e materiais..... | 65 |
| 3.2. Tampões e soluções..... | 67 |
| 3.3. Equipamentos..... | 68 |
| 4. MÉTODOS..... | 69 |
| 4.1. Casuística..... | 69 |
| 4.2. Método de Bradford..... | 70 |
| 4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida..... | 73 |
| 4.4. Técnica de Western Blot..... | 73 |
| 4.5. Quantificação da reação de Western Blot..... | 76 |
| 4.6. Coleta de sangue periférico e separação da fração mononuclear..... | 76 |
| 4.7. Extração de RNA total das células da fração mononuclear..... | 77 |
| 4.8. Teste de Integridade do RNA..... | 77 |
| 4.9. Obtenção do cDNA a partir do RNA total..... | 78 |
| 4.10. PCR em tempo real..... | 78 |
| 4.11. Análises estatísticas..... | 80 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 82 |
| 5.1. Análise das isoformas de heparanase-1 (HPA1)..... | 83 |
| 5.2. Análise das isoformas de heparanase-2 (HPA2)..... | 90 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 99 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 100 |
| ANEXO..... | 117 |
| RESUMO..... | 123 |
| ABSTRACT..... | 124 |
| ARTIGO..... | 125 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Tecido conjuntivo e esquema de uma membrana basal..... | 2 |
| Figura 2. Estrutura geral da molécula de colágeno..... | 3 |
| Figura 3. Estrutura da fibronectina com o sítio RGD de ligação à célula..... | 6 |
| Figura 4. Estrutura da Laminina..... | 8 |
| Figura 5. Unidades estruturais dos principais glicosaminoglicanos..... | 9 |
| Figura 6. Unidade estrutural dos diferentes glicosaminoglicanos..... | 12 |
| Figura 7. Distribuição dos glicosaminoglicanos sulfatos na escala filogenética..... | 14 |
| Figura 8. Tipos de ligações dos glicosaminoglicanos sulfatados ao esqueleto protéico..... | 15 |
| Figura 9. Proteoglicanos de heparam sulfato de superfície celular..... | 18 |
| Figura 10. Representação esquemática dos sindecans presentes em mamíferos..... | 23 |
| Figura 11. Esquema da biossíntese do heparam sulfato..... | 25 |
| Figura 12. Diferentes passos na síntese das cadeias de glicosaminoglicanos de CS, DS, HS e heparina na região de ligação GlcA-Gal-Gal- Xyl..... | 27 |
| Figura 13. Dissacarídeo de Heparan sulfato..... | 28 |
| Figura 14. Estrutura de heparam sulfatos de diferentes origens..... | 29 |
| Figura 15. Catabolismo dos proteoglicanos de heparam sulfato..... | 32 |
| Figura 16. Representação esquemática do gene completo da heparanase Cromossomo 4q21,3..... | 34 |
| Figura 17. Mecanismo de ativação e ação da heparanase..... | 36 |
| Figura 18. Heparanase ocorre como uma enzima inativa a pró-heparanase que pode ser convertida para uma enzima ativa, sofrendo ação de proteases como catepsina-L..... | 37 |
| Figura 19. Mecanismo de ação da heparanase-1..... | 41 |
| Figura 20. Interações entre células tumorais e matriz extracelular..... | 44 |
| Figura 21. Internalização da heparanase-1..... | 46 |

| | |
|---|----|
| Figura 22. Mecanismos de oncogênese pela ativação de proto-oncogene, mutação ou perda de genes supressores tumorais, ativação de genes anti-apoptóticos ou perda de genes pró-apoptóticos..... | 48 |
| Figura 23. Degradação do heparam sulfato da membrana basal por ação da heparanase..... | 52 |
| Figura 24. Esquema representativo das etapas do método imunoenzimático de imunomarcção..... | 75 |
| Figura 25. Análise por <i>Western Blot</i> em plasma de paciente com carcinoma gastrointestinal e indivíduo saudável..... | 84 |
| Figura 26. Expressão da heparanase-1 isoforma 50 kDa..... | 86 |
| Figura 27. Expressão da heparanase-1 isoforma 65 kDa..... | 87 |
| Figura 28. Análise por <i>Western Blot</i> em plasma de paciente com carcinoma gastrointestinal e indivíduo saudável..... | 91 |
| Figura 29. Expressão da heparanase-2..... | 92 |
| Figura 30. Expressão das isoformas de heparanase..... | 94 |
| Figura 31A. Expressão em tempo real da HPA1..... | 96 |
| Figura 31B. Expressão em tempo real da HPA2..... | 97 |

ÍNDICE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA I. Principais componentes da unidade estrutural dos GAG..... | 11 |
| TABELA II. Localização e função dos glicosaminoglicanos..... | 13 |
| TABELA III. Localização de classificação dos proteoglicanos..... | 17 |
| TABELA IV. Comparação entre as heparanases 1 e 2..... | 39 |
| TABELA V. Dados descritivos dos pacientes e doadores..... | 82 |
| TABELA VI. Análise quantitativa de HPA1 e HPA2..... | 93 |

ABREVIACÕES

- AH** – Ácido hialurônico
- BSA** – Albumina sérica bovina
- C4S** – Condroitim 4-sulfato
- C6S** – Condroitim 6-sulfato
- CS** – Condroitim sulfato
- DAB** – 3,3' – diaminobenzamidina
- DS** – Dermatam sulfato
- GAG** – Glicosaminoglicano
- GAGs** – Glicosaminoglicanos sulfatados
- Gal** – Galactose
- GalNAc, 6S** – Galactosamina *N*-acetilada, 6-sulfatada
- GalNAc** – *N*-acetilgalactosamina
- GlcA** – Ácido glucurônico
- GlcN** – Glucosamina
- GlcNAc** – Glucosamina *N*-acetilada
- GlcNS, 6S** – Glucosamina *N*- e 6-sulfatada
- GlcNS** – Glucosamina *N*-sulfatada
- HEP** – Heparina
- HEX** - Hexosamina
- HS** – Heparan sulfato
- LN** - Laminina
- MEC** – Matriz extracelular
- PBS** – Salina tamponada com fosfato
- PG** – Proteoglicano
- PGCS** – Proteoglicano de condroitim sulfato
- PGHS** – Proteoglicano de heparan sulfato
- PM** – Peso molecular
- QS** – Queratam sulfato
- SDS** – Dodecil sulfato de sódio

TEMED – *N, N,* - tetrametilenodiamino
mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro
cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
DAB - 3,3' diaminobenzamida
PBS – Tampão salina fosfato
TBS – Tampão salina trifosfato
CEP – Comitê de ética em pesquisa
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
SDS - Dodecilsulfato de sódio
Primer - Oligonucleotídeo iniciador
PCR - Reação em cadeia da polimerase
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
FN – Fibronectinas
LN – Lamininas

INTRODUÇÃO

1. Matriz extracelular

Estruturalmente, a matriz extracelular (Carey *et al.*, 1992) é dividida em membrana basal, matriz conjuntiva e matriz sanguínea; atua como um suporte tridimensional que isola compartimentos dos tecidos, permite a interação entre as células, determina a arquitetura dos tecidos e age como filtro molecular, como mostra na Figura 1 (Yurchenco *et al.*, 1990).

A matriz extracelular é composta de macromoléculas como proteínas fibrosas (colágeno, elastina, fibrilina), proteínas não fibrosas (fibronectina, laminina, vitronectina, entactina, trombospondina) e proteoglicanos (Carey *et al.*, 1992; Iozzo, 1998; McKenzie, 2007) (Figura 1).

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 integrinas, proteoglicanos de heparan sulfato, desencadeando eventos de transdução de sinais (Freeman *et al.*, 1998; Schonherr *et al.*, 2000).

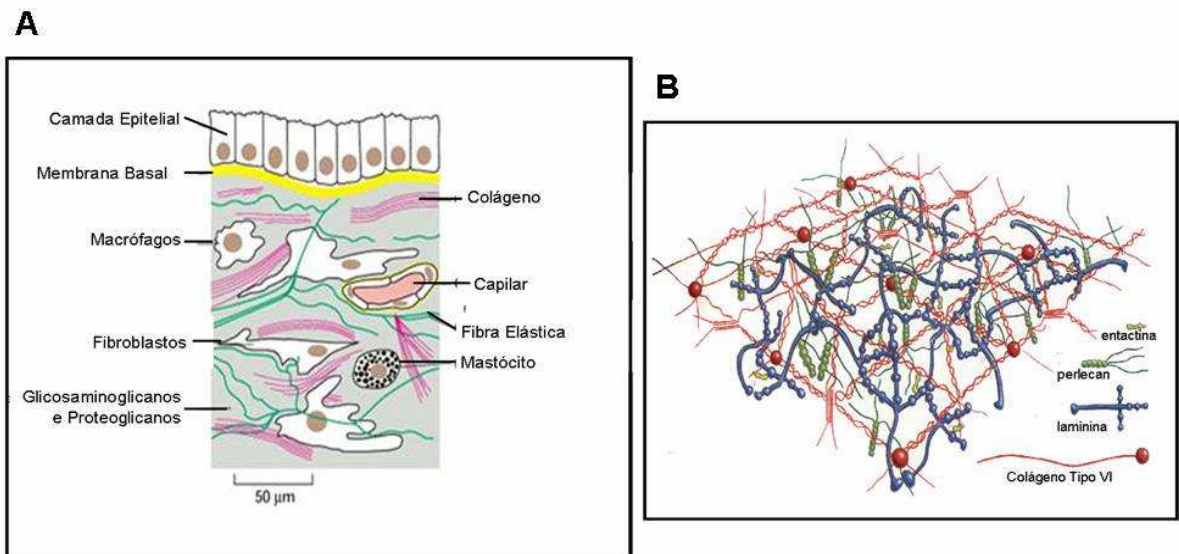


Figura 1. Tecido conjuntivo e esquema de uma membrana basal. **A.** Esquema geral da matriz extracelular e seus constituintes, representada abaixo da camada epitelial. **B.** Membrana basal e moléculas constituintes: laminina, colágeno, entactina e proteoglicanos de heparan sulfato (Shafat *et al.*, 2006).

Componentes estruturais da Matriz Extracelular

1.1.1. Colágenos

Colágenos são glicoproteínas fibrosas, insolúveis e muito mais abundantes do que as demais moléculas da matriz extracelular. Os colágenos são compostos de três cadeias polipeptídicas, conhecidas como cadeias α , formadas por unidades repetitivas Gly-X-Y, onde X é um aminoácido e Y é frequentemente prolina ou hidroxiprolina. As cadeias α se dobram formando pelo menos um domínio tripla hélice (Nanci, 1999) (Figura 2).

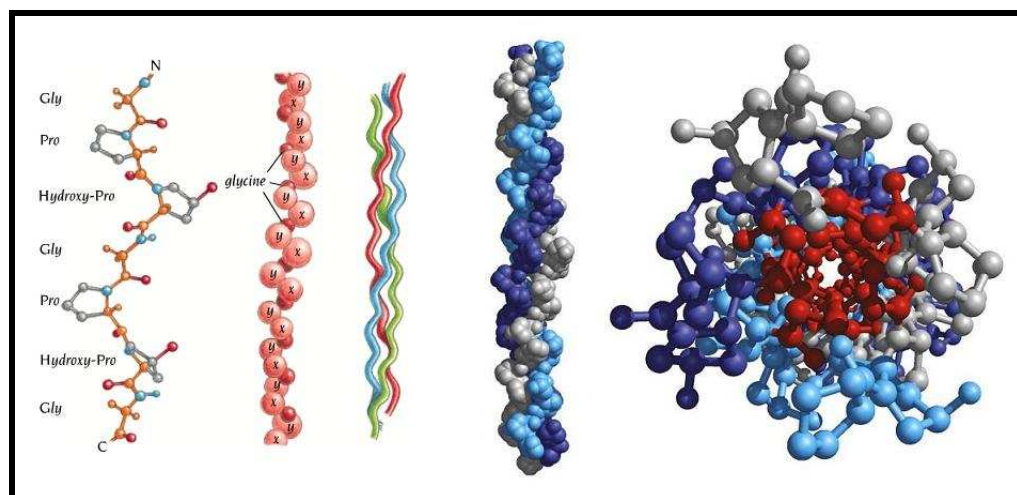


Figura 2. Estrutura geral da molécula de colágeno (Meyer *et al.*, 2002).

A maioria dos colágenos estão presentes em tecidos como associações homotriméricas e/ou heterotriméricas e tem distribuições e funções tecido-específicas (Meyer *et al.*, 2002). Podem ser agrupados em diferentes famílias com base principalmente nessas características estruturais (Myllyharju *et al.*, 2001):

- 1) colágenos que formam fibrilas: tipos III, V e XI;
- 2) colágenos associados a fibrilas: tipos IX, XII, XIV, XVI e XIX;
- 3) colágenos que formam redes hexagonais: tipos VIII e X;
- 4) colágenos tipo IV de membrana basal;
- 5) colágenos tipo VI associados à membrana basal;
- 6) colágenos tipo VII que formam fibrilas de ancoragem para a membrana basal;
- 7) colágenos com domínios transmembranares: tipos XIII e XVII;
- 8) colágenos tipo XV e XVIII.

Os colágenos compreendem uma família de 26 proteínas com uma grande variedade de funções estruturais e fisiológicas, os quais estão

estritamente localizados no espaço extracelular. Todos os diferentes tipos de colágenos apresentam composição e seqüências de aminoácidos distintos, o que confere a esta classe de glicoproteína grande variabilidade estrutural e funcional, que estão envolvidos na hemostasia, cicatrização, adesão e migração celular. Na córnea e humor vítreo eles são conhecidos por dar transparência, força e elasticidade (Meyer *et al.*, 2002). Além disso, a endostatina, um fragmento liberado do colágeno tipo XVIII, é um potente inibidor da angiogênese e crescimento tumoral (Myllyharju *et al.*, 2001).

1.1.2. Fibronectinas

Fibronectinas (FN) correspondem a dímeros formados por unidades de 230-250 kDa unidos por pontes dissulfeto que podem se organizar em multímeros superiores na matriz extracelular insolúvel pela união de intercadeias dissulfeto (Mosher *et al.*, 1992).

As cadeias polipeptídicas das fibronectinas caracterizam-se por conter pequenas seqüências repetitivas de aminoácidos, cuja similaridade permitiu classificá-las como do tipo I, II ou III (Petersen *et al.*, 1983). Análises, por fragmentação proteolítica e por técnica que utilizam DNA recombinante, mostraram que cada cadeia polipeptídica possui pelo menos cinco domínios estruturais e funcionais, separados por regiões flexíveis. Cada domínio é formado por um conjunto de seqüências do tipo I, II ou III que, por serem sítios de alta afinidade de ligação para macromoléculas da matriz extracelular e para receptores de superfície celular, estão envolvidos em diferentes funções (Aota *et al.*, 1991).

Alguns desses sítios já estão bem caracterizados, como a seqüência tipo III encontrada na região central de cada cadeia, que tem um domínio formado pelo tripeptídeo Arg-Gly-Asp (seqüência RGD) (Figura 3) (Limper *et al.*, 1992). Essa seqüência é reconhecida pela maioria dos receptores de FN encontrados em células que aderem a essa molécula. Um segundo sítio capaz de promover adesão celular é o segmento conjuntivo tipo III (III CS), que é reconhecido pelas integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$. Entre esses dois, há um outro sítio bem característico, formado por três seqüências tipo III (seqüências 12 a 14), caracterizado por sua capacidade de se ligar a heparina e que, portanto, está associado à região de ligação do heparan sulfato a FN. Análises com mutantes e com modelos tridimensionais indicaram que a seqüência tipo III de número 13 é o principal sítio de ligação à heparina (Busby *et al.*, 1995).

Fibronectinas são proteínas bem caracterizadas da matriz extracelular proeminentes na matriz de uma variedade de tecidos conjuntivos, sendo mais abundantes durante o desenvolvimento embrionário e o remodelamento de tecido. Nessas situações, correspondem a proteínas insolúveis cujas cadeias são interligadas por pontes dissulfeto constituindo polímeros de alta massa molecular (Langenbach *et al.*, 1999). As fibronectinas também estão presentes no plasma em altas concentrações. Ambas as formas encontradas na matriz e no plasma foram inicialmente identificadas como proteínas que promovem a fixação e achatamento do tecido conjuntivo celular em substratos artificiais e colágenos (Armstrong *et al.*, 2000).

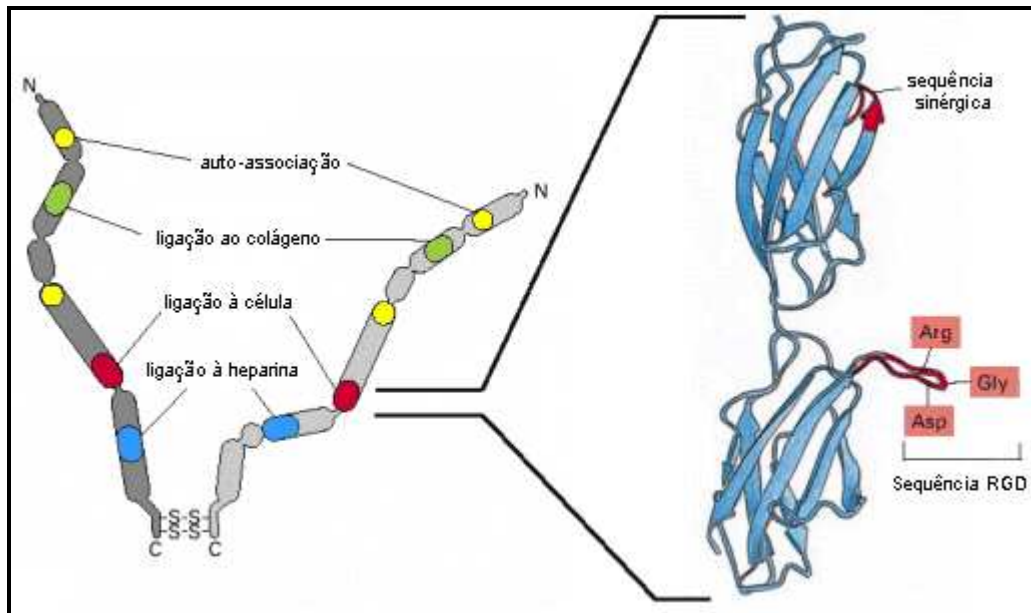


Figura 3. Estrutura da fibronectina com o sítio RGD de ligação à célula. As duas cadeias polipeptídicas são similares, mas não são idênticas. São produtos do mesmo gene que sofreram "splicing" diferentes. As cadeias são unidas por duas pontes dissulfeto próximas ao C-terminal. Cada cadeia contém aproximadamente 2.500 aminoácidos e estão arranjadas em 5 ou 6 diferentes domínios, sendo especializado em se ligar a uma determinada molécula ou a uma célula (Busby *et al.*, 1995).

Além disso, as fibronectinas estão envolvidas em uma variedade de processos celulares como adesão, migração, diferenciação, proliferação e apoptose, tanto em tecidos embrionários, como tecidos adultos. O envolvimento das FN nesses processos está intimamente relacionado com sua capacidade de interagir com receptores de superfície celular e, conseqüentemente, modelar respostas intracelulares (Romberger, 1997).

1.1.3. Lamininas

Lamininas (LN) são glicoproteínas de alta massa molecular (~900 kDa) que contém três subunidades polipeptídicas distintas, ligadas entre si por pontes dissulfeto, sendo denominadas α (~400 kDa), β (~220 kDa) e γ (~200 kDa) (Yurchenco *et al.*, 1993). A combinação das três subunidades resulta em uma

molécula assimétrica em forma de cruz, com três braços curtos de tamanhos semelhantes em um braço mais longo, sendo que cada porção N-terminal dos peptídeos forma o braço curto e o restante do peptídeo se projeta ao longo do braço maior. Duas regiões globulares pequenas estão presentes nos terminais de cada braço curto e uma estrutura multiglobular, o domínio G, formado apenas pela subunidade α , está presente no terminal do braço longo (Mercurio, 1995) (Figura 4).

Existem cinco tipos geneticamente distintos de subunidades α , três de β e três de γ , que formam diferentes heterodímeros, originando lamininas 1 a 15, expressas de maneira tecido-específica durante o desenvolvimento bem como no adulto (Colognato *et al.*, 2000). Todas as subunidades α das lamininas possuem um grande domínio globular e uma região carboxi-terminal (domínio G), a qual consiste de cinco subdomínios globulares homólogos (ou módulos) de aproximadamente 200 aminoácidos cada (G1-G5 ou LG1-LG5). Esta região contém sítios de ligação para a matriz extracelular (por exemplo, perlecan e fibulina-1) bem como receptores celulares, incluindo integrinas, sindecans e α -dystroglican (Colognato *et al.*, 2000). O domínio RGD não é reconhecido por outras moléculas, como em fibronectinas.

Lamininas são proteínas exclusivas da lâmina basal. As funções regulatórias da membrana basal podem ser amplamente atribuídas à interação da laminina com seus receptores. As lamininas desempenham funções específicas na interface epitélio-conjuntivo, como filtro regulando a passagem de proteínas entre estes compartimentos, ou como barreira prevenindo o contato do epitélio com muitos tipos celulares (exceto macrófago, linfócito e neurônios).

Ainda, conectam células adjacentes na musculatura lisa (Sanes *et al.*, 1990), mantém a integridade de diferentes tecidos e servem como substrato para a migração celular em tecidos que foram danificados ou para a disseminação de células tumorais malignas (Liotta, 1992). Exercem também papel crucial na adesão, proliferação, migração e diferenciação celular em diversos tipos celulares.

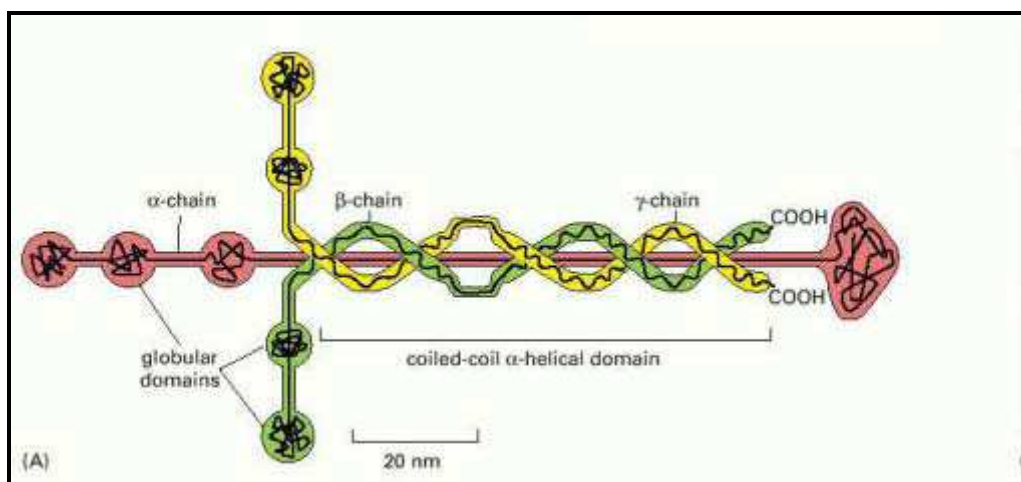


Figura 4. Estrutura da Laminina (Colognato *et al.*, 2000).

1.1.4. Glicosaminoglicanos

Glicosaminoglicanos (GAG) são polímeros lineares de açúcares constituídos por unidades dissacarídicas repetitivas compostas por uma hexosamina (glucosamina ou galactosamina) e um açúcar não nitrogenado (ácido D-glucurônico, ácido L-idurônico ou D-galactose), unidos entre si por ligações glicosídicas. Estes polímeros possuem uma alta densidade de cargas negativas conferidas pela presença de grupamentos carboxílicos dos ácidos urônicos e/ou grupamentos sulfatos (Couchman *et al.*, 1993) (Figura 5). Devido

à alta densidade de carga negativa, estes compostos são altamente hidrofílicos capazes de incorporar grande quantidade de água em sua estrutura (Shriver *et al.*, 2002).

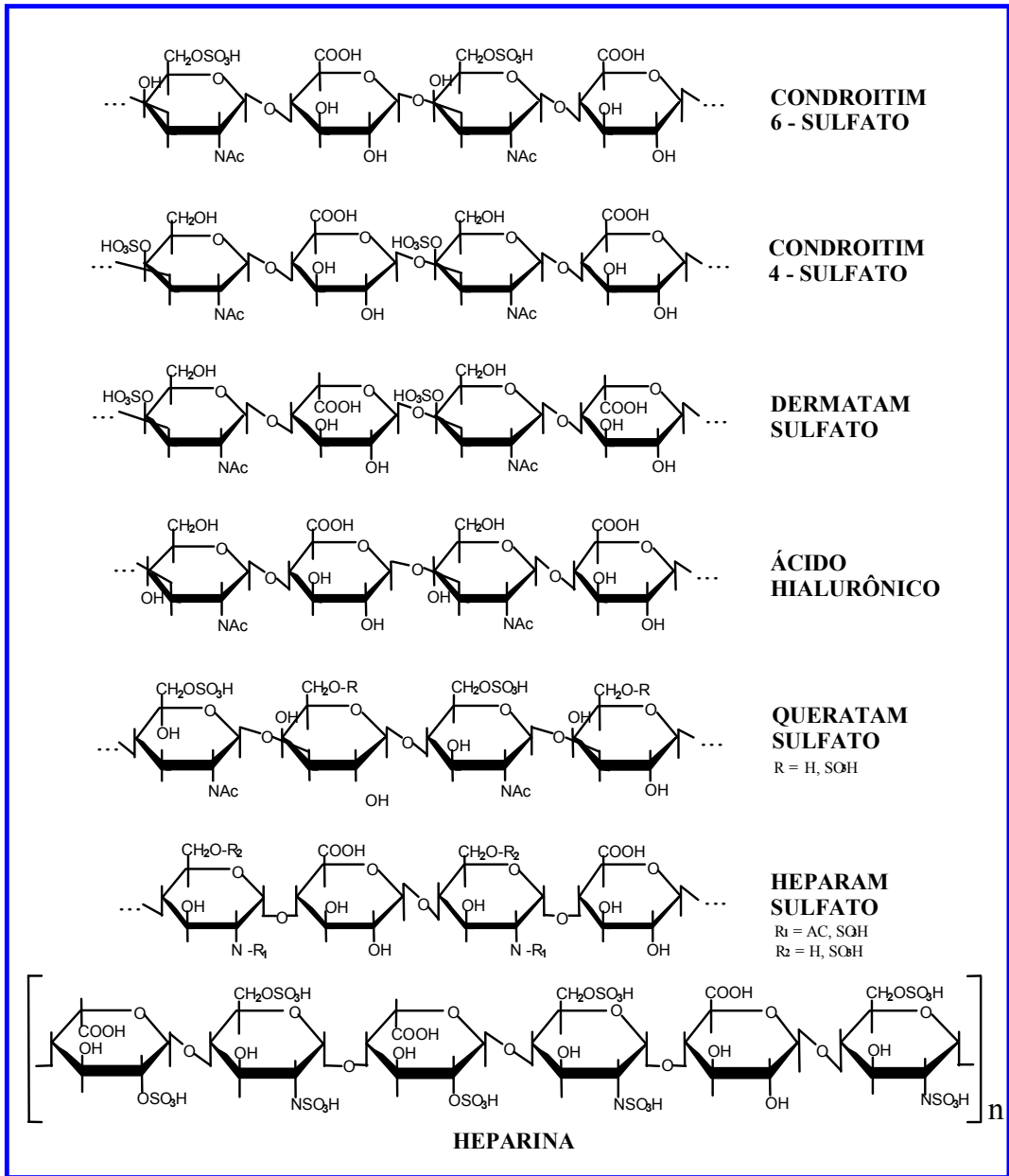


Figura 5. Unidades estruturais dos principais glicosaminoglicanos. A Figura ilustra a unidade estrutural dos GAG. A D-glucosamina é uma hexosamina constituinte da heparina, heparam sulfato, queratam sulfato e ácido hialurônico e a D-galactosamina está presente em condroitim 4 e 6-sulfato e dermatam sulfato. O açúcar não nitrogenado é um ácido urônico (β -D-glucurônico ou α -L-idurônico), exceto no queratam sulfato que apresenta D-galactose. As posições dos grupamentos sulfatos podem ser em C-2 e C-6 na hexosamina e C-2 no ácido urônico. A hexosamina está unida ao ácido urônico por ligação α em heparina e heparam sulfato e β nos demais compostos (Dietrich *et al.*, 1983).

Esses glicoconjugados complexos foram inicialmente denominados de mucopolissacarídeos por Meyer (1938) e são hoje chamados glicosaminoglicanos, de acordo com a nomenclatura proposta por Jeanloz (Jeanloz, 1960) (Tabela I). Os glicosaminoglicanos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não nitrogenado, ao grau de sulfatação e à posição em que estão sulfatados. A Figura 6 mostra os principais componentes dissacarídicos de cada glicosaminoglicano, bem como os tipos de ligações glicosídicas presentes, tanto interdissacarídica como intradissacarídica.

Os principais glicosaminoglicanos conhecidos são heparam sulfato (HS) (Russell *et al.*, 2001), heparina (HEP), condroitim 4-sulfato (C4S), condroitim 6-sulfato (C6S), dermatam sulfato (DS) (Russell *et al.*, 2003), queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (AH) (Ruoslahti *et al.*, 1986).

A presença de glicosaminoglicanos durante o desenvolvimento embrionário, bem como sua distribuição na escala filogenética, vem sendo estudada desde os anos 70 pelo nosso laboratório e estes estudos demonstraram a presença dos glicosaminoglicanos desde espongiários até mamíferos superiores, estando presentes em todos os filos que apresentam organização tissular e em quantidades variáveis de um ou mais tipos de glicosaminoglicanos (Dietrich *et al.*, 1977a; Nader *et al.*, 1977; Sampaio *et al.*, 1977; Pavao *et al.*, 1995), como mostra a Figura 7.

As funções dos GAG são determinadas de acordo com o tecido e com as características próprias de cada composto, ou seja, a conformação estrutural, a densidade e distribuição de cargas negativas. A Tabela II mostra resumidamente a localização e as funções dos glicosaminoglicanos.

Todos os glicosaminoglicanos encontram-se ligados a um esqueleto proteico formando macromoléculas denominadas proteoglicanos, com exceção do ácido hialurônico.

TABELA I
PRINCIPAIS COMPONENTES DA UNIDADE ESTRUTURAL DOS GLICOSAMINOGLICANOS

| GLICOSAMINOGLICANO | MONOSSACARÍDEOS | POSIÇÃO DO SULFATO | LIGAÇÃO GLICOSÍDICA |
|-----------------------------|------------------------|--------------------|---------------------|
| Condroitim | N-Acetil Galactosamina | - | β (1→4) |
| | Ácido Glucurônico | - | β (1→3) |
| Condroitim 4-Sulfato | N-Acetil Galactosamina | 4 | β (1→4) |
| | Ácido Glucurônico | - | β (1→3) |
| Dermatam Sulfato | N-Acetil Galactosamina | 4 | β (1→4) |
| | Ácido Idurônico | - | α (1→3) |
| | Ácido Glucurônico | - | β (1→3) |
| Condroitim 6-Sulfato | N-Acetil Galactosamina | 6 | β (1→4) |
| | Ácido Glucurônico | - | β (1→3) |
| Ácido Hialurônico | N-Acetil Glucosamina | - | β (1→4) |
| | Ácido Glucurônico | - | β (1→3) |
| Queratam Sulfato | N-Acetil Galactosamina | 6 | β (1→3) |
| | Galactose | 6 | β (1→4) |
| Heparam Sulfato | Glucosamina | 2,6 | α (1→4) |
| | N-Acetil Glucosamina | 6 | α (1→4) |
| | Ácido Glucurônico | - | β (1→4) |
| | Ácido Idurônico | - | α (1→4) |
| Heparina | Glucosamina | 2,6 | α (1→4) |
| | Ácido Glucurônico | - | β (1→4) |
| | Ácido Idurônico | 2 | α (1→4) |

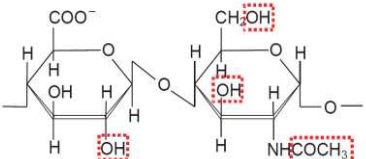
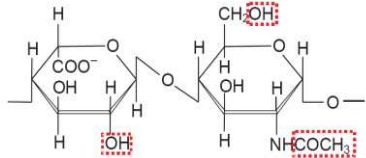
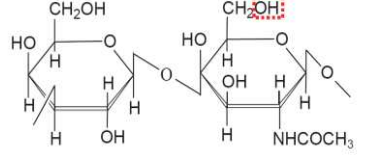
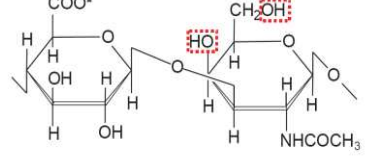
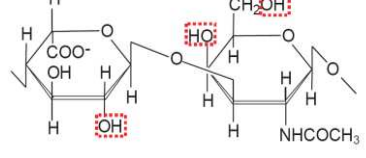
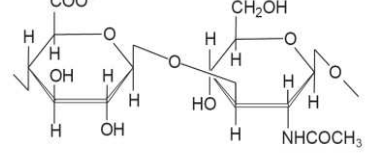
| GAG | Acido Hexurônico ou Idurônico | Galactose | Hexosamina | Composição Dissacarídica |
|------------------------------|--|-----------------|--------------------------|--|
| Heparam sulfato/ Heparina | Ácido D-glucurônico (GlcA) Acido L-idurônico (IdoA) | - | D-glucosamina (GlcNAc) |  <p>GlcA $\beta(1\rightarrow4)$ 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 6. 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.

TABELA II
LOCALIZAÇÃO E FUNÇÃO DOS GLICOSAMINOGLICANOS

| GAG | Localização | Função |
|-----------------------------------|--|--|
| Heparam Sulfato | Em todos os tecidos. superfície celular, matriz extracelular e membrana basal. | Molécula de adesão e reconhecimento celular (1). Papel na divisão celular (2-8). |
| Condroitim 4- ou 6-Sulfato | Matriz de tecidos conjuntivos, cartilagens, ossos, vasos sangüíneos (1, 2, 9-13). Matriz de tecidos embrionários e tumorais (14-21). | Papel no crescimento e ossificação (4-sulfato) (2, 3, 9-13). Proliferação celular (2, 3, 16, 18, 22, 23). |
| Dermatam Sulfato | Predominantemente em tecidos conjuntivos densos, intestinos, pele e tendão (1, 2, 24-26). | Relacionada com a organização, velocidade de deposição e manutenção das fibrilas de colágeno (25-27). |
| Ácido Hialurônico | Tecidos conjuntivos, cordão umbilical, líquido sinovial e amniótico, ascites (28), matriz extracelular, humor vítreo e cartilagem (29, 30). | Lubrifica e protege as articulações, retém água na matriz, interagem com outros PGs. |
| Heparina | Distribuição irregular. Mastócitos, pulmão, pele, intestinos de adultos. Exclusivamente em tecidos hematopoiéticos em tecidos fetais (31, 34). | Papel biológico possivelmente associado com defesa do organismo. Papel farmacológico: potente anticoagulante e antitrombótico (31-37). |
| Queratam Sulfato I | Estroma de córnea (25, 26, 38). | Confere transparência óptica a córnea. |
| Queratam Sulfato II | Cartilagem articular adulta (10-14). | Processos de crescimento. |

(1)- (Dietrich *et al.*, 1977b); (2) - (Dietrich 1984); (3) - (Dietrich *et al.*, 1980); (4) - (Franco *et al.*, 2001); (5) - (Porcionatto *et al.*, 1994); (6) - (Porcionatto 1996); (7) - (Porcionatto *et al.*, 1998); (8) - (Porcionatto *et al.*, 1999); (9) - (Knudson *et al.*, 2001); (10) - (Mourao *et al.*, 1973); (11) - (Mourao *et al.*, 1976); (12) - (Michelacci *et al.*, 1979); (13) - (Michelacci *et al.*, 1989); (14) - (Sampaio *et al.*, 1981); (15) - (Sampaio *et al.*, 1977); (16) - (Dietrich *et al.*, 1978); (17) - (De Klerk *et al.*, 1984); (18) - (Dietrich *et al.*, 1993); (19) - (Martins *et al.*, 2000); (20) - (Berto *et al.*, 2003); (21) - (Oba-Shinjo *et al.*, 2003); (22) - Ramathan *et al.*, 1996; (23) - (Huang *et al.*, 1987); (24) - (Poblacion *et al.*, 1986); (25) - (Scott 1992); (26) - (Scott 2001); (27) - (Sampaio *et al.*, 1988); (28) - (Gibson *et al.*, 1993); (29) - (Laurent 1986); (30) - (Dahl *et al.*, 1983); (31) - (Nader *et al.*, 1984); (32) - (Nader *et al.*, 1989); (33) - (Bauer *et al.*, 2001); (34) - (Avraham *et al.*, 1989); (35) - (Kjellen *et al.*, 1989); (36) - (Opal *et al.*, 2002); (37) - (Soriano *et al.*, 2000).

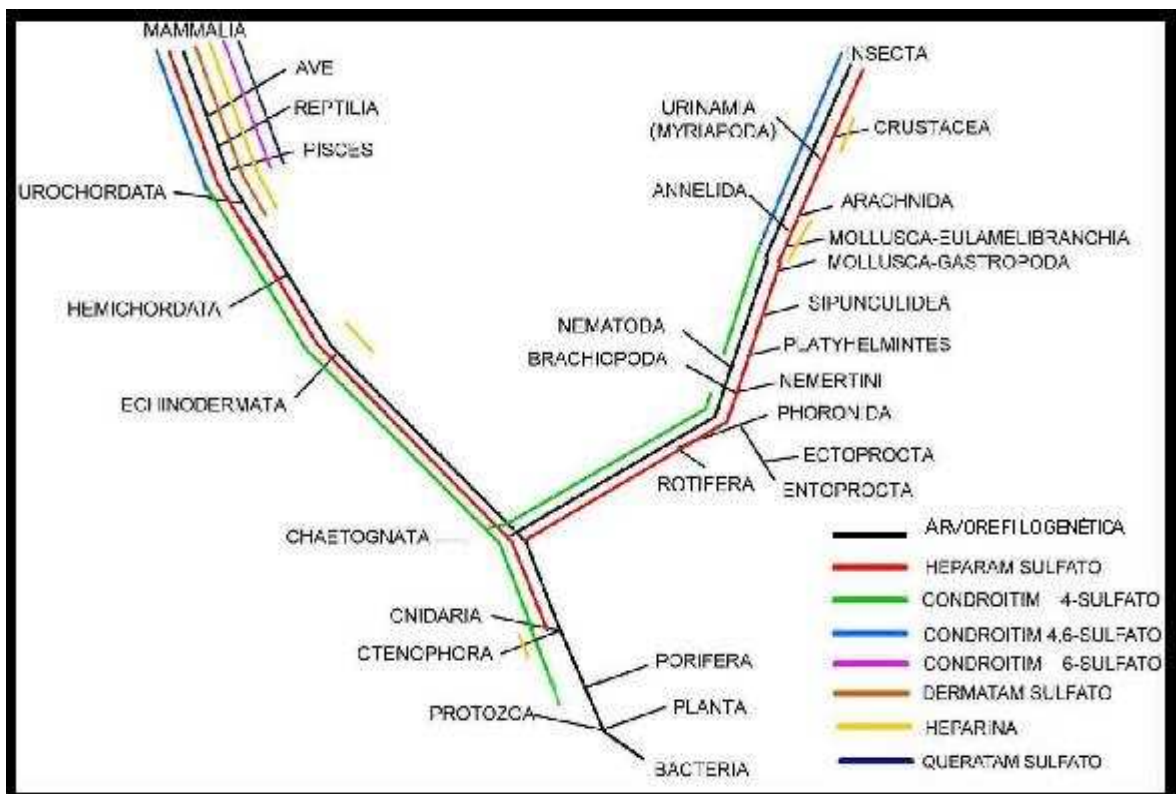


Figura 7. Distribuição dos glicosaminoglicanos sulfatos na escala filogenética. Os glicosaminoglicanos sulfatados encontram-se largamente distribuídos na escala filogenética, desde espongiários até mamíferos superiores. Heparan sulfato e condroitim sulfato estão presentes tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Já o dermatan sulfato está presente em cordados e hemicordados. Por outro lado, o queratan sulfato é encontrado somente em cordados. Heparina, por sua vez, está presente principalmente em vertebrados, com exceção de algumas espécies de ctenóforas, moluscos, anelídios e crustáceos.

1.1.5. Proteoglicanos

Com exceção do ácido hialurônico, os glicosaminoglicanos ocorrem nos tecidos covalentemente ligados a proteínas, formando assim os proteoglicanos. As cadeias de glicosaminoglicanos estão unidas pelo terminal redutor a um tetrassacarídeo, ácido β -D-glucurônico- β -D-galactose- β -D-galactose- β -D-xilose, estando a xilose ligada por uma ligação O-glicosídica ao grupamento hidroxila de um resíduo de serina da proteína (Figura 8). Por outro lado, nota-se que o queratan sulfato apresenta particularidades em relação à região de

ligação com a cadeia proteica, o que o distingue dos demais glicosaminoglicanos (Figura 8).

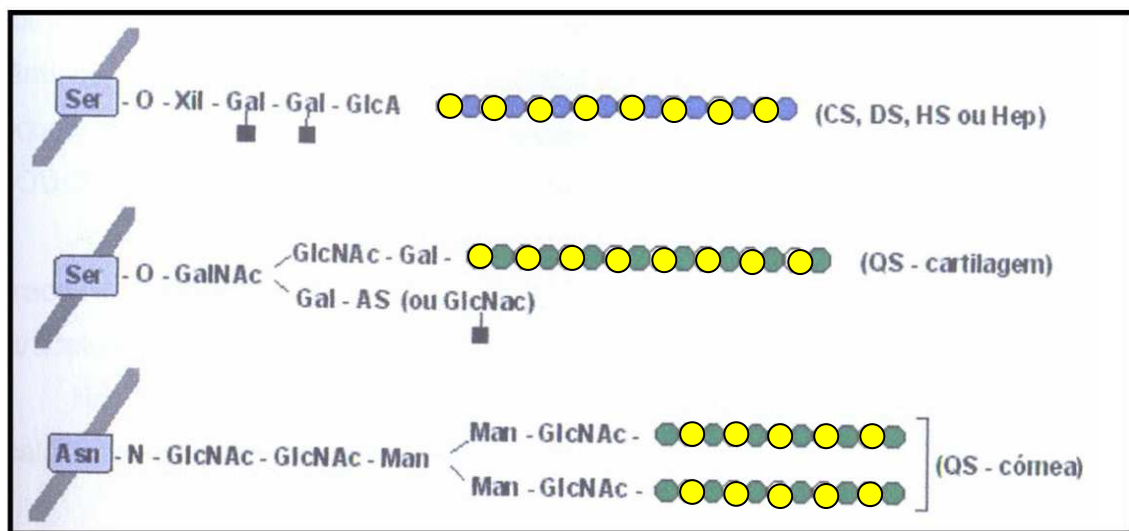


Figura 8. Tipos de ligações dos glicosaminoglicanos sulfatados ao esqueleto proteico (Hardingham *et al.*, 1992). Condrotim sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparam sulfato (Russell *et al.*,) e heparina (Hep) ligam-se a um resíduo de L-serina da porção protéica por uma região de ligação comum, composta pelo tetrassacarídeo β -D-xilose- β -D-galactose- β -D-galactose ácido D-glucurônico(Xil-Gal-Gal-GlcA). O queratam sulfato está ligado à porção protéica do proteoglicano por meio de oligossacarídeos dos tipos O-ligados (cartilagem) ou N-ligados (córnea). GalNAc: N-acetil-D-galactosamina; GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina; AS: ácido siálico; Man: D-manose; Ser: L-serina, Asn: L-asparagina; ● : hexosamina; ● : ácido urônico; ● : D-galactose ■ : possível sítio de sulfatação.

O queratam sulfato tipo I apresenta-se ligado à proteína por uma ligação N-glicosídica entre N-acetil-D-glucosamina e o grupo amida de um resíduo de L-asparagina, enquanto o queratam sulfato tipo II apresenta-se unido ao núcleo proteico por ligação O-glicosídica entre N-acetil-D-galactosamina e o grupo hidroxila de uma serina ou treonina.

Os proteoglicanos são, portanto, compostos de alta massa molecular, formados de um esqueleto proteico ao qual estão ligadas covalentemente, cadeias de glicosaminoglicanos e de oligossacarídeos N- e/ou O-ligados.

1.2. Classificação dos Proteoglicanos

Inicialmente os proteoglicanos foram classificados baseando-se no tipo de glicosaminoglicanos constituintes (Poole 1986). Após os estudos de sequenciamento, clonagem gênica e imunoquímica, constatou-se que vários proteoglicanos, de diferentes origens, apresentam esqueletos proteicos idênticos, surgindo uma nova classificação baseada na homologia de seus esqueletos proteicos, considerando também a localização celular (Couchman *et al.*, 1993; Iozzo, 1998).

A classificação pela localização celular divide os proteoglicanos em três categorias: a) intracelulares, presentes em grânulos, como exemplo o proteoglicano de heparina (serglicina); b) associados à superfície celular (exemplos, sindecam e glipicam, proteoglicanos de heparam sulfato); c) e presentes na MEC ou associado à matriz extracelular. Alguns aspectos da família dos sindecans serão discutidos a seguir.

Na Tabela III estão classificados alguns proteoglicanos, de acordo com a sua localização e homologia dos esqueletos proteicos.

TABELA III

LOCALIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS PROTEOGLICANOS

| Proteoglicano | No. Cadeias | Tipo GAG | Esqueleto Protéico kDa | Localização |
|------------------------------------|-------------|----------|------------------------|---|
| <u>Família Hialectans</u> | | | | |
| Agrecam | 20-30 | CS, DS | 220 | Cartilagem, cérebro e vasos sanguíneos |
| Brevican | 1 a 3 | CS | 100 | Cérebro |
| Neurocam | 3 a 7 | CS | 136 | Cérebro e cartilagem |
| Versicam | 10-30 | CS, DS | 26/ 5-360 | Tecidos embrionários |
| <u>Família "Leucine Rich"</u> | | | | |
| Biglicam | 2 | CS, DS | 40 | Tecido conjuntivo |
| Decorim | 1 | CS, DS | 40 | Conjuntivo, ossos, dentes |
| Epificam | 2 a 3 | CS, DS | 35 | Cartilagem epifisária |
| Fibromodulina | 2 a 3 | QS | 42 | Tecido Conjuntivo |
| Lumicam | 3 a 4 | QS | 38 | Córnea, intestino, fígado, músculo, cartilagem |
| Mimecam e Osteoglicina | 2 a 3 | QS | 35 | Córnea e Tecidos conjuntivos |
| Osteoaderina | 2 a 3 | QS | 42 | Ossos |
| PRELP | 2 a 3 | QS | 44 | Tecido conjuntivo |
| <u>Proteoglicanos Facultativos</u> | | | | |
| Colágeno $\alpha 2$ (IX) | 1 | CS, DS | 68 | Cartilagem, humor vítreo |
| Apicam | nd | CS | 120 | Cérebro |
| <u>OUTROS PGS</u> | | | | |
| Fosfocam | nd | CS | 173 | Cérebro |
| Testicam | 1 a 2 | HS, CS | 44 | Testículos e cérebro |
| <u>PGS de Membrana Basal</u> | | | | |
| Agrim | 3 | HS | 250 | Junções neuromusculares, membrana basal renal e de pulmão |
| Bamacam | 3 | CS | 138 | Membrana basal |
| Leprecam | nd | CS | 220 | Membrana basal |
| Perlecam | 3 | HS, CS | 400-467 | Membrana basal, cartilagem |
| <u>PGS de Superfície Celular</u> | | | | |
| Sindecans | 2 a 3 | HS, CS | 22-88 | Epitélio, Fibroblasto, endotélio, sistema nervoso, células musculares lisas |
| Glipicans | 2 a 3 | 3 a 4 | HS | Epitélio, Fibroblasto, sistema nervoso central |
| <u>PGS Facultativos</u> | | | | |
| $\alpha 5\beta 1$ | nd | CS, HS | nd | Melanoma humano (Mel-85), CHO |
| Betaglicano | 0 a 4 | CS, HS | 110 | Fibroblasto |
| CD-44 | 0 a 4 | HS | 32 a 38/49 | Linfócitos e epitélio |
| Receptor de transferrina | 4 a 6 | HS | 2 a 90 | Fibroblasto |
| Trombomodulina | 0 a 1 | CS | 58 a 60 | Endotélio |
| NG2 | 2 a 3 | CS | 300 | Células neurais e mesenquimais |

(Nº, número de cadeias de glicosaminoglicanos; GAG, glicosaminoglicano; kDa, 10^3 Daltons)

Família dos Sindecans

O termo sindecam tem origem na palavra grega *syndein* que significa "o que liga junto" devido à propriedade desses compostos de ligar componentes do citoesqueleto à matriz extracelular (Saunders *et al.*, 1989).

Sindecans constituem uma família de quatro membros de proteoglicanos transmembrânicos que apresentam em geral cadeias de heparan sulfato covalentemente ligadas, sendo que condroitim sulfato também pode ocorrer em

algumas situações. Essa família de proteoglicanos caracteriza-se por apresentar um domínio transmembrânico, outro citoplasmático bem conservado e uma região extracelular variável entre os diferentes sindecans. Até o presente momento, foram isolados quatro tipos de sindecans: sindecam-1, sindecam-2 (conhecido também por fibroglicam), sindecam-3 (ou N-sindecam) e sindecam-4 (denominado anfiglicam ou riudocam).

O esqueleto proteico dos sindecans compreende uma família de quatro genes distintos em mamíferos. Sua localização cromossomal, organização do exon e sequência estão relacionados com o sindecam simples de drosophila (D-sindecam), sugerindo que a família de genes surge pela duplicação gênica e evolução divergente de um simples gene ancestral, e que os sindecans representam subfamílias. Cada produto gênico é uma simples proteína de membrana tipo 1, com um domínio extracelular aparentemente estendido de tamanho variado, que contém cadeias de HS ligadas covalentemente distantes da membrana plasmática (Figura 9).

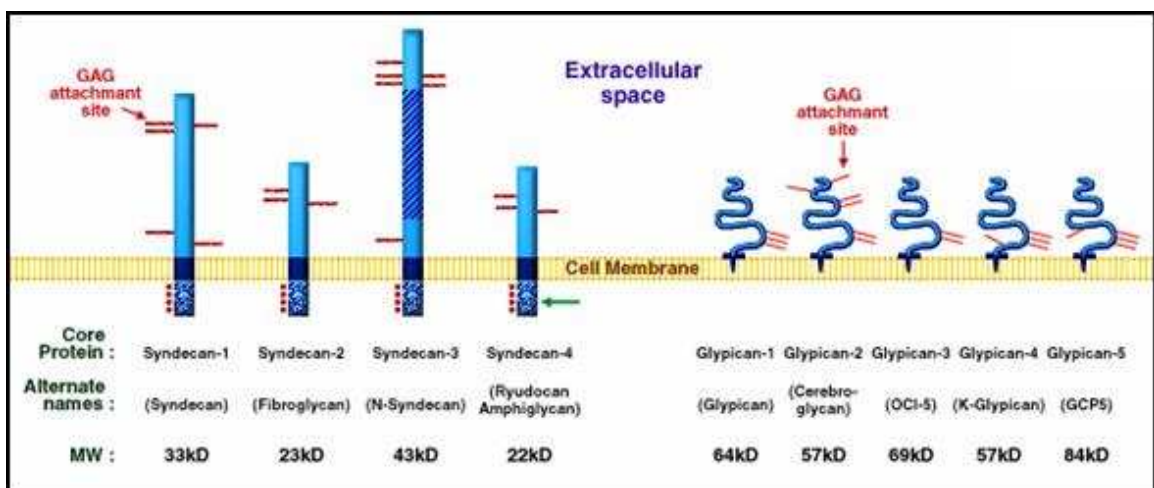


Figura 9. Proteoglicanos de heparan sulfato de superfície celular: sindecans e glicicans. Esquema dos proteoglicanos transmembrânicos sindecans e ancorados a GPI glicicans. As linhas vermelhas indicam o sítio de ligação dos GAG ao esqueleto proteico, representado em azul (Saunders *et al.*, 1989).

A seqüência Ser-Gly-X-Gly precedida por resíduos de aminoácidos acídicos é consenso para glicosilação de cadeias HS; na junção do domínio extracelular com a porção transmembrânica, ocorre à presença de aminoácidos básicos susceptíveis à ação de proteases. A porção transmembrânica e o pequeno domínio citoplasmático da proteína são muito conservados, incluindo a exata conservação de quatro resíduos de tirosina, sendo um na junção da porção transmembrânica com o domínio citoplasmático e três no domínio citoplasmático (Bernfield *et al.*, 1999).

Sindecam-4

Sindecam-4 foi inicialmente isolado de aorta de coelho (Castillo *et al.*, 1987) sendo, posteriormente, detectado em células de embrião de galinha, células epiteliais, fibroblastos e endotélio microvascular de rato (Kojima *et al.*, 1992; Horowitz *et al.*, 2002). Foi demonstrado que o sindecam-4 do endotélio de aorta de coelho, que está presente tanto na superfície celular quando no meio de cultura, tem atividade anticoagulante, inibindo a via extrínseca da coagulação (Colburn *et al.*, 1982). É um co-receptor junto as integrinas nas interações entre o citoesqueleto e a matriz extracelular.

O sindecam-4, inicialmente descrito em células endoteliais de aorta de coelho, apresenta uma massa molecular em torno de 220 kDa, possuindo um esqueleto protéico de 22 kDa e quatro cadeias de HS de aproximadamente 50 kDa cada (Castillo *et al.*, 1987; Nader *et al.*, 1987).

Outro proteoglicano de HS, foi descrito para células endoteliais de aorta bovina (Saku *et al.*, 1989), e um proteoglicano de heparam sulfato denominado

riudocam, foi descrito para células endoteliais de rato (Kojima *et al.*, 1992). A porção N-terminal do riudocam apresenta semelhanças com o proteoglicano de células endoteliais de aorta de coelho, demonstrando assim que há homologias com relação ao esqueleto protéico dos proteoglicanos de heparam sulfato que são sintetizados por células endoteliais de aorta de coelho e de rato.

O sindecam-4 está localizado na adesão focal de um grande número de células, de uma maneira dependente PKC, e pode funcionar como um co-receptor com integrinas (Tkachenko *et al.*, 2004), região variável citoplasmática, peculiar do sindecam-4, interage com o domínio catalítico de PKC α e estimula sua atividade. Estas observações sugerem fortemente a participação do sindecam-4 nos mecanismos de transdução de sinal (Couchman *et al.*, 1997).

Sindecam-3

O sindecam-3 possui um domínio transmembrânico, uma pequena cauda citoplasmática composta por quatro aminoácidos e um domínio extracelular que carrega as cadeias de HS. As cadeias de HS ligam FGF-2 (*fibroblast growth factor*) e HB-GAM (*heparin-binding growth-associated molecule*). Sindecam-3 pode também ter um papel na sinalização, sendo conhecido por ativar a via de quinase *src* quando se liga à HB-GAM. A sinalização pode envolver a oligomerização do esqueleto protéico do sindecam-3 (Kaksonen *et al.*, 2002).

O sindecam-3 está presente em células de Schwann e em cérebro de rato neonato (Carey *et al.*, 1992), sendo o principal sindecam presente durante o desenvolvimento do sistema nervoso central e periférico. O sindecam-3 é um receptor para a pleitrofina, que é um fator de crescimento e diferenciação que

promove crescimento de neuritos e desenvolvimento de axônios (Raulo *et al.*, 1994). Sugere-se que o sindecam-3 tenha um papel na adesão e migração celular durante o desenvolvimento do sistema nervoso, além de participar da plasticidade sináptica no hipocampo (Kaksonen *et al.*, 2002; Reizes *et al.*, 2008).

Sindecam-2

A ocorrência de sindecam-2 é abundante em células mesenquimais, não sendo expresso em células epiteliais (Marynen *et al.*, 1989). Como o sindecam-1, participa no processo de interação célula-matriz extracelular. Recentemente, demonstrou-se que os proteoglicanos de HS da família dos sindecans participam de várias reações celulares dependentes de proteínas quinase C (PKC) (Porcionatto *et al.*, 1994) e que sindecam-2 e sindecam-3 são fosforilados *in vitro*, em seu domínio citoplasmático pela PKC (Filla *et al.*, 2004).

Sindecam-2 está envolvido na regulação da adesão celular. Comparando com o sindecam-1 e -4, o papel do sindecam-2 na migração celular tem sido pouco investigado. Porém, vários trabalhos indicam que o sindecam-2 pode regular positivamente a migração celular, desde que o sindecam-2 esteja altamente expresso em células, em condições migratórias. Em células P29, derivadas de carcinoma de pulmão, sindecam-2 tem um importante papel na interação com fibronectina e regula a formação de fibras de actina em cooperação com a integrina $\alpha 5\beta$; isso indica que o sindecam-2 pode funcionar como um receptor de superfície celular em células tumorigênicas altamente migratórias. Além disso, o sindecam-2 tem um papel crítico na adesão de células de carcinoma de cólon sobre a matriz extracelular e , mais importante,

essa interação é crucial para a proliferação e atividade tumorigênica nessas células (Park *et al.*, 2002).

Sindecam-1

O Proteoglicano sindecam-1 é um dos membros da família dos sindecans de mamíferos, sendo altamente expresso em células epiteliais e, podendo apresentar cadeias de condroitim sulfato e heparam sulfato (Rapraeger *et al.*, 1985), contribui para a adesão celular e a morfogênese epitelial. O sindecam-1 participa da via de sinalização mediada pela oncoproteína Wnt-1, relacionada com o desenvolvimento de tumores glandulares mamários em camundongos (Kiviniemi *et al.*, 2004; Edwards *et al.*, 2008).

Embora o sindecam-1 esteja diminuído em diversos tipos de tumores como os tumores epiteliais sendo sua perda um evento genético que contribui para a progressão tumoral (Numa *et al.*, 2002), em tumores pancreáticos (Conejo *et al.*, 2000), gástrico (Ru *et al.*, 2006) e de mama (Barbareschi *et al.*, 2003) sua superexpressão está relacionada com a progressão tumoral, promovendo metástase, logo um pior prognóstico da doença. Tal dualidade se deve ao fato da tumorigênese ser dependente de tecido e/ou estágio tumoral (Beauvais *et al.*, 2004).

Recentemente, foi demonstrada a diminuição na expressão de sindecam-1 em carcinoma colorretal (Peretti *et al.*, 2008). O "*shedding*" ou a secreção do proteoglicano sindecam-1 da superfície celular pode facilitar processos de proliferação celular, angiogênese e metástase tumorais (Reiland *et al.*, 2004; Mahtouk *et al.*, 2007).

Especificamente, o proteoglicano de heparan sulfato, sindecam-1, que se encontra na superfície de todas as células epiteliais de mamíferos e possui relação com o desenvolvimento de tumor e parece depender da enzima heparanase para sua degradação (Reiland *et al.*, 2004).

Foi também demonstrado que altos níveis de sindecam-1, em amostras de soro de pacientes com mieloma, correlacionam-se com um pior prognóstico da doença. Em estudos utilizando modelo animal, foi observado que a secreção do sindecam-1 estimula potencialmente o crescimento do mieloma e de metástase tumoral (Sanderson *et al.*, 2008).

A Figura 10 mostra os sindecans presentes em mamíferos.

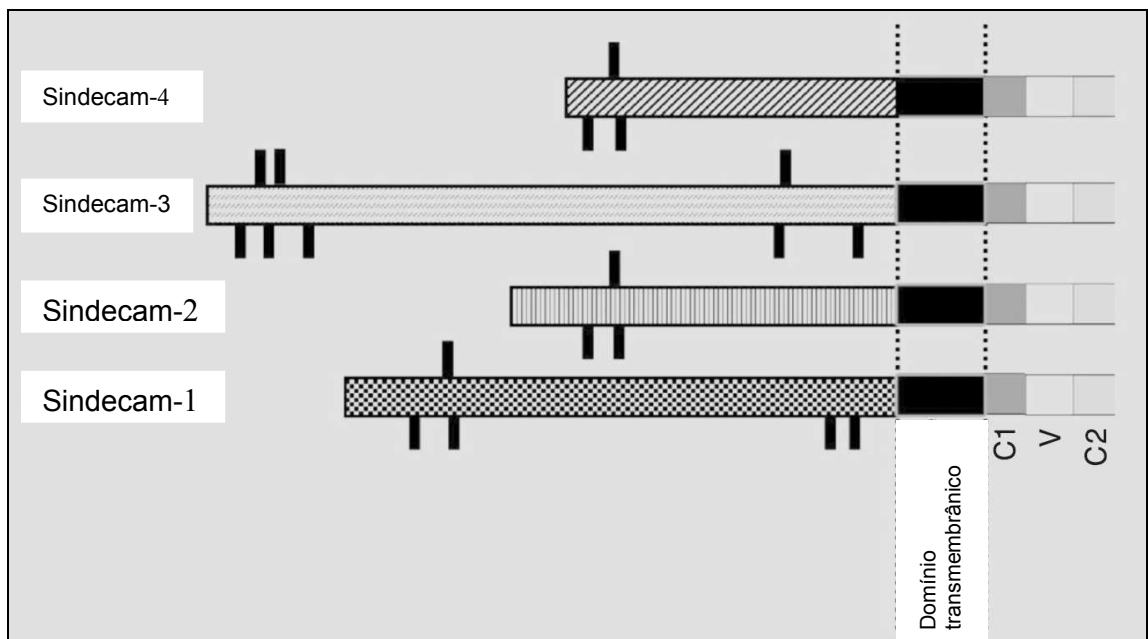


Figura 10. Representação esquemática dos sindecans presentes em mamíferos. As proteínas estão alinhadas nos domínios transmembrana e peptídeos sinal, com os domínios contendo “gaps” nos ectodomínios. Os domínios de ligação aos GAGs estão indicados como linhas pretas. Os sindecans contêm os domínios transmembrana conservados com pequenas caudas citoplasmáticas que possuem uma região variável (V) e duas regiões conservadas (Reiland *et al.*, 2004).

Portanto, o nível de expressão de heparanase em células tumorais afeta diretamente o desenvolvimento do tumor e metástase, por regular indiretamente

a localização e secreção do sindecam-1, que sabidamente controla os eventos de proliferação celular, angiogênese e metástase, como descrito anteriormente (Al-Quran *et al.*, 2007).

1.3. Biossíntese dos Glicosaminoglicanos

A biossíntese dos glicosaminoglicanos inicia-se no retículo endoplasmático rugoso (RER), pela formação do esqueleto protéico. A seqüência do próprio esqueleto proteico é que determina qual a cadeia a ser inserida (CS/DS ou HS/He) (Esko *et al.*, 1996).

A xilose é o primeiro açúcar a ser adicionado nesse esqueleto, pela ação da xilosiltransferase, empregando o precursor UDP-xilose, o qual é adicionado ao grupo hidroxila (OH) da L-serina (Ser). Posteriormente, um resíduo de D-galactose é adicionado à região em formação pela ação da enzima galactosiltransferase I, utilizando como transportadores UDP-β-D-galactose ainda no RER (Okajima 1999). A proteína segue então para o complexo de Golgi, onde a região de ligação é completada, pela adição do segundo resíduo de D-galactose e de ácido D-glucurônico, por ação da galactosiltransferase II e da glucuronosiltransferase (Pinhal *et al.*, 2001), formando assim a região de ligação composta pelo tetrassacarídeo (GlcUA β 1→3Gal β 1→3Gal β 1→4Xil β 1→3Ser) (Fritz *et al.*, 1999).

No heparam sulfato, a enzima N-acetil-glucosaminil transferase I transfere um resíduo de D-glucosamina N-acetilada (GlcNAc) para o terminal não redutor da cadeia de glicosaminoglicano nascente. Em seguida ocorre o alongamento da cadeia de glicosaminoglicano (Lindahl *et al.*, 1994; Crawford *et al.*, 2001;

Pinhal *et al.*, 2001; Suarez *et al.*, 2007) pela ação da enzima HS/Hep polimerase (HS Pol), que aparentemente apresenta atividade tanto de glucuronosiltransferase II, como de N-acetil-glucosaminil transferase II (Lind *et al.*, 1993). Essa enzima adiciona alternadamente unidades de GlcA e GlcNAc, a partir dos respectivos nucleotídeos açúcares, ao terminal não redutor da cadeia recém formada; é modificado por uma série de reações consecutivas que são iniciadas pela N-desacetilação e N-sulfatação dos resíduos de GlcNAc (Kusche *et al.*, 1990; Lind *et al.*, 1993) (Figura 11).

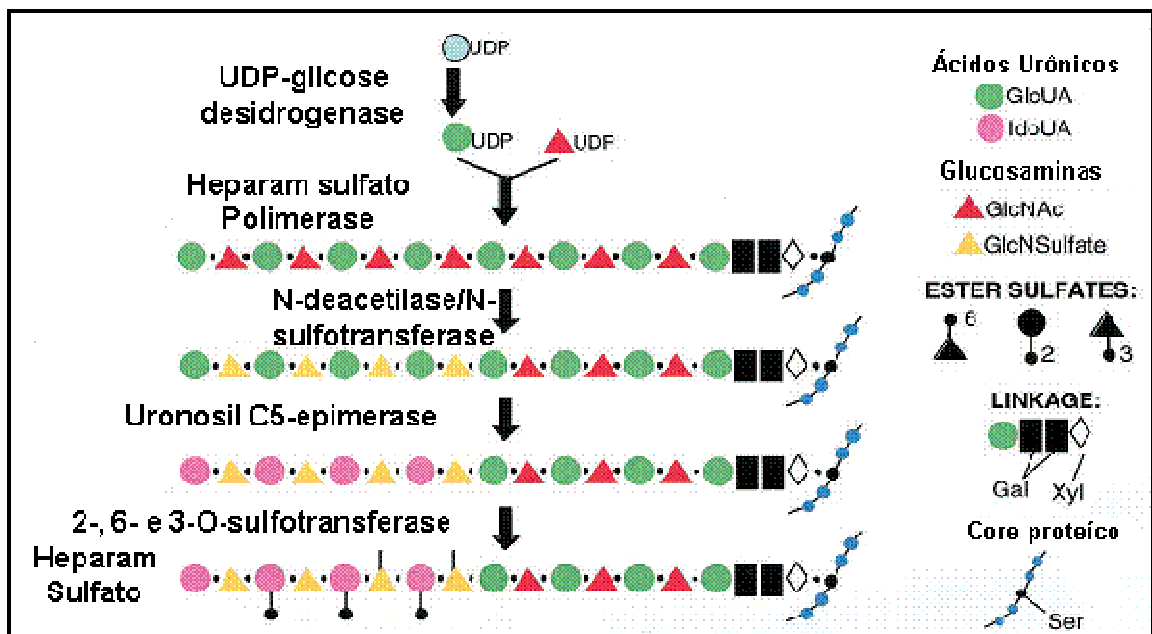


Figura 11. Esquema da biossíntese do heparam sulfato. As enzimas de biossíntese agem sequencialmente, sendo que o produto de cada reação é o substrato da próxima. O tamanho da cadeia de HS é arbitrário (Adaptada de Bernifield *et al.*, 1999).

A enzima glucosaminil-N-desacetilase-N-sulfotransferase (NDST), modifica apenas algumas regiões da cadeia, deixando outras sem modificações subsequentes, como a epimerização do D-glucurônico para ácido L-idurônico.

Assim que as reações de modificação são iniciadas pela NDST, ocorre uma série de O-sulfatações subsequentes realizada por sulfotransferases

específicas, as quais utilizam 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS) como doador de sulfato (Lindahl *et al.*, 1994). A enzima iduronosil-2-O-sulfotransferase (2OST) introduz grupamento sulfato em resíduos de ácido L-idurônico; já a enzima glucosaminil 6-O-sulfotransferase atua nos resíduos de D-glucosamina adjacentes às unidades de L-idurônico recém sulfatadas, adicionando sulfato na hidroxila do carbono 6 (Crawford *et al.*, 2001) (Figura 12).

1.4. Estrutura e função do heparam sulfato

O heparam sulfato foi isolado em 1948 por Jorpes e Gardell (Jorpes *et al.*, 1948) como sendo uma heparina com baixa atividade anticoagulante; é constituído por unidades alternadas de α -D-glucosamina e ácido β -D-glucurônico, unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) (Figura13). Apresenta, ainda, unidades de ácido α -L-idurônico ligadas à α -D-glucosamina por ligação glicosídica α (1 \rightarrow 4). A glucosamina pode estar N-acetilada ou N-sulfatada e/ou O-sulfatada na posição C6. A D-glucosamina, no heparam sulfato, mostra-se com elevado grau de N-acetilação sendo que o restante encontra-se na forma N-sulfatada (Dietrich *et al.*, 1974; Dietrich *et al.*, 1998; Porcionatto *et al.*, 1998).

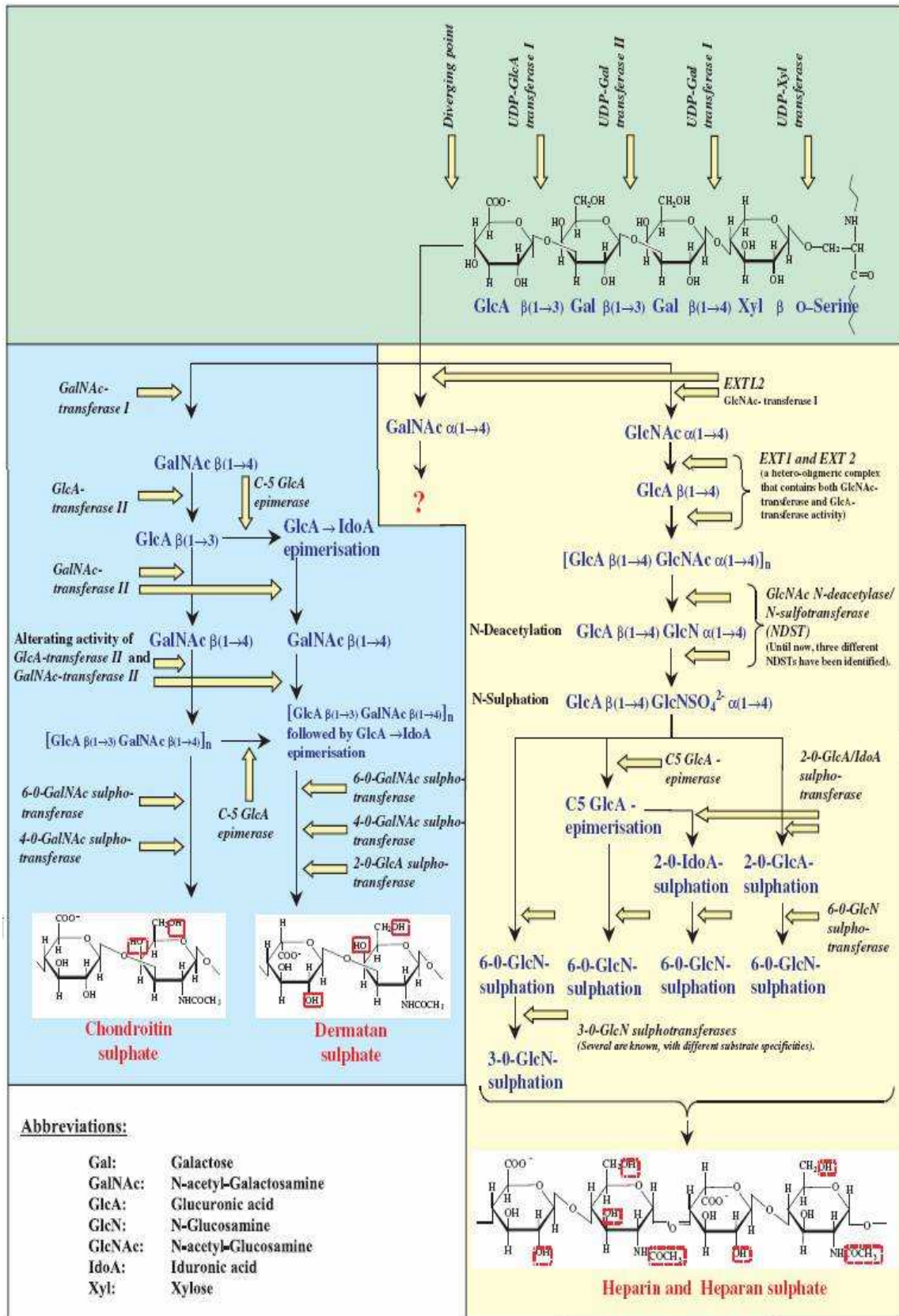


Figura 12. Diferentes passos na síntese das cadeias de glicosaminoglicanos de CS, DS, HS e heparina na região de ligação GlcA-Gal-Gal-Xyl.

A análise do HS de diferentes origens demonstrou que sua estrutura é extremamente conservada. Degradados pelas enzimas heparitinasas I e II, soladas de *Flavobacterium heparinum* (Nader *et al.*, 1990), os heparam sulfatos já estudados, variando, porém as proporções relativas de cada dissacarídeo, de acordo com o tecido e espécie analisado (Dietrich *et al.*, 1983).

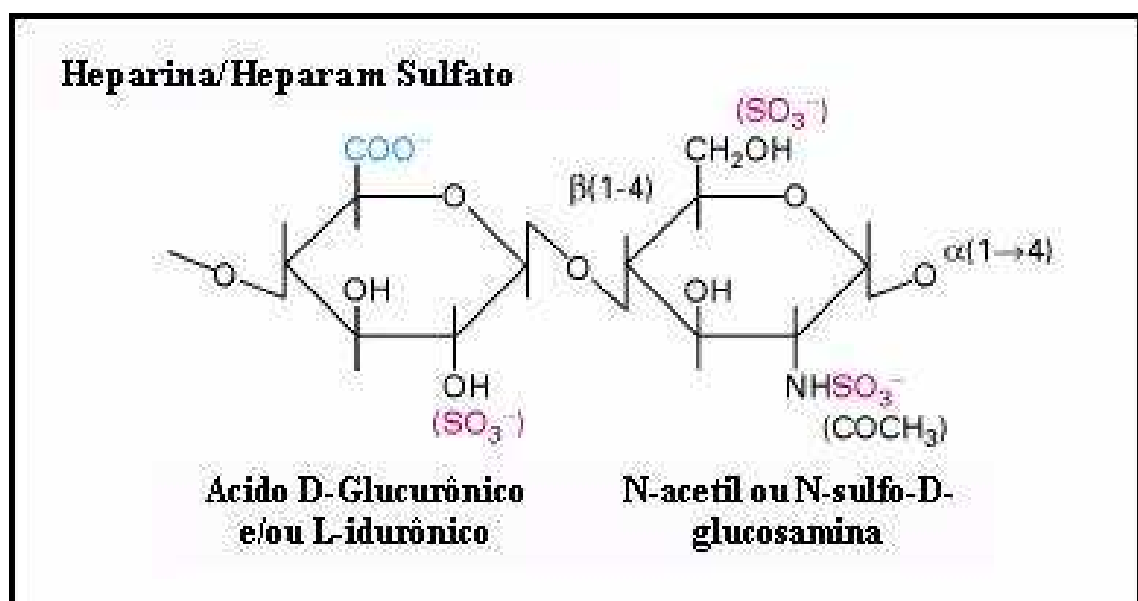


Figura 13. Dissacarídeo de Heparam sulfato.

As estruturas dissacarídicas foram analisadas em oito heparam sulfatos de diferentes origens (Dietrich *et al.*, 1998). A sequência dissacarídica completa do heparam sulfato de pâncreas bovino e sequência parcial dos outros sete heparam sulfatos analisados estão representados na Figura 14.

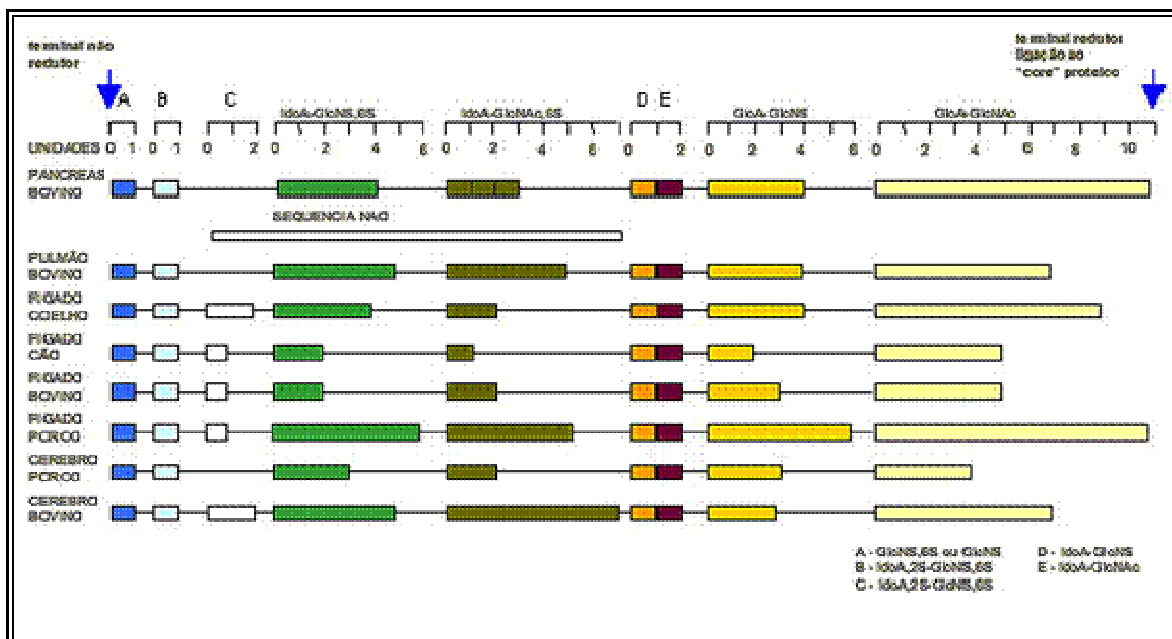


Figura 14. Estrutura de heparam sulfatos de diferentes origens. GlcA - ácido glucurônico; IdoA - ácido idurônico; Ido,2S - ácido idurônico 2-sulfato; GlcNAc - glucosamina N-acetilada; GlcNAc,6S - glucosamina N-acetilada,6-sulfato; GlcNS - glucosamina N-sulfato; GlcNS,6S - glucosamina 2,6-dissulfato.

Todos os heparam sulfatos contêm características estruturais comuns, compostos por duas regiões. A primeira região contém um domínio N-acetilado, no terminal redutor (que está ligado ao esqueleto protéico), seguido de um domínio N-sulfatado, ambos contendo ácido β -D-glucurônico. A outra região é mais sulfatada, formada por dissacarídeos contendo ácido α -L-idurônico. Separando essas duas regiões, há um tetrassacarídeo peculiar composto de dissacarídeos N-acetilado e N-sulfatado, ambos contendo ácido L-idurônico. Foi também observado que o terminal não redutor de todos os heparam sulfatos analisados, é constituído por um monossacarídeo (D-glucosamina, N-sulfatada e/ou 2,6 dissulfatada).

Dependendo do tipo celular, ocorrem variações no grau de sulfatação, acetilação e na proporção dessas unidades. Isso indica que o HS pode atuar na

superfície celular como uma estrutura especializada de reconhecimento e sinalização celular (Dietrich *et al.*, 1977a; Dietrich *et al.*, 1983).

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 (Dietrich *et al.*, 1977b; Porcionatto *et al.*, 1994; Porcionatto *et al.*, 1998). Os HS estão localizados na membrana plasmática e na matriz extracelular (Kraemer 1971) promovendo regulação de interações entre as células e o meio, sendo tais interações importantes para o crescimento, desenvolvimento e manutenção das funções celulares.

Heparam sulfato é capaz de se ligar a várias proteínas da matriz extracelular como fibronectina (Yamada 1983) e colágenos (Tipo I, III e V) (Delacoux *et al.*, 1998). Interage também com várias outras proteínas como lipoproteína lipase, co-fator II da heparina e uma série de fatores de crescimento, como EGF, FGF e VEGF (Faham *et al.*, 1998; Iozzo *et al.*, 2001). O HS, ainda, liga-se e regula a atividade de muitas moléculas efetoras capazes de iniciar vias de sinalização críticas para iniciar o crescimento e progressão do câncer (Vlodavsky *et al.*, 2001).

1.5. Degradação dos Proteoglicanos

Normalmente os proteoglicanos são endocitados, sofrendo ação de proteases em endossomos primários e nos lisossomos ação das exo- e endoglicosidases. Por ação de exoglicosidases, as cadeias de heparam sulfato

são quebradas a partir da extremidade não redutora e as endoglicosidases quebram as ligações glicosídicas intracadeia, possuindo cada enzima sua especificidade.

Dependendo do tipo celular, os proteoglicanos são removidos da membrana plasmática diretamente por endocitose ou por uma clivagem proteolítica parcial que cliva o esqueleto proteico entre o domínio hidrofóbico e a região de ligação ao polissacarídeo. O ataque proteolítico, que consiste na primeira etapa da degradação desses compostos, pode ocorrer ainda na superfície celular ou durante a endocitose e transporte ao lisossomo. A seguir, os proteoglicanos são endocitados e sofrem uma série de etapas de degradação envolvendo diferentes compartimentos celulares, sendo finalmente degradados aos seus monossacarídeos constituintes e sulfatos nos lisossomos, pela ação de enzimas específicas (exoglicosidases e sulfatases). Para os proteoglicanos ancorados, a etapa inicial envolve clivagem da âncora de GPI. A etapa final de degradação do glicosaminoglicano ocorre no lisossomo (Yanagishita *et al.*, 1984).

A Figura 15 mostra um esquema do processo de catabolismo de proteoglicanos de heparam sulfato, sob a forma de sindecam e glipicam.

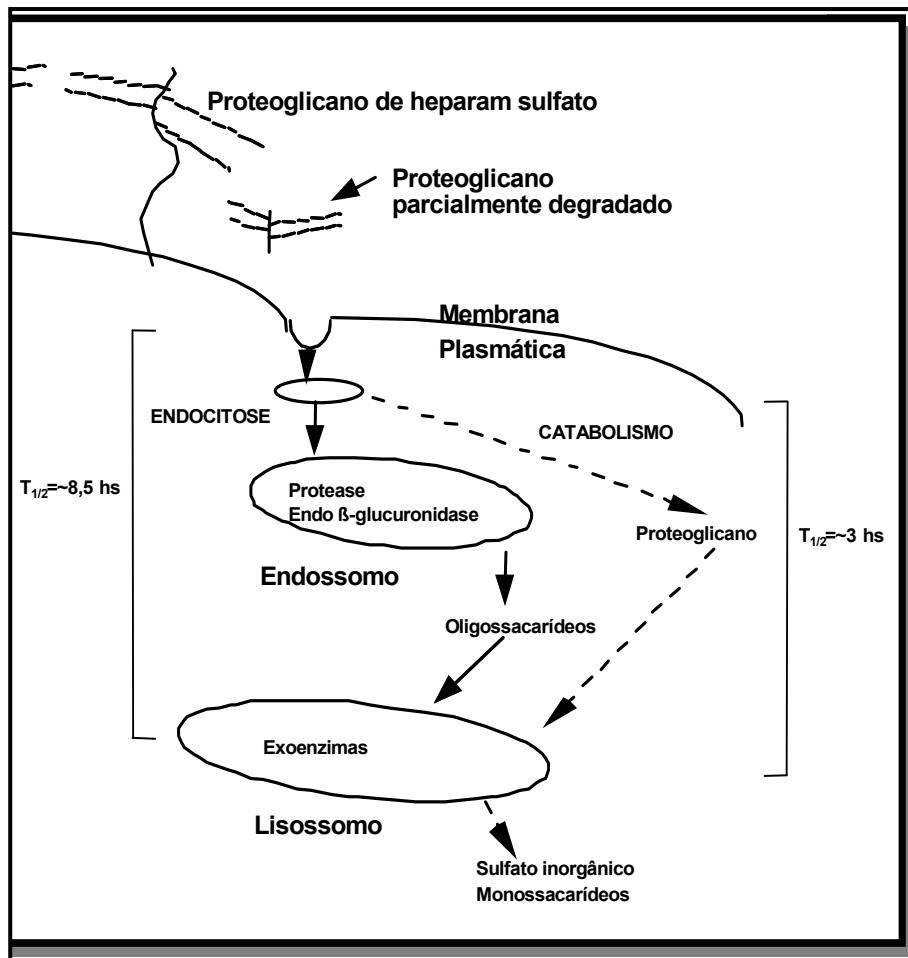


Figura 15. Catabolismo dos proteoglicanos de heparam sulfato. A Figura acima ilustra de forma esquemática o processo de catabolismo do proteoglicano de heparam sulfato, sob a forma de sindecam e glipicam. O sindecam é degradado lentamente (em aproximadamente 8,5 horas), envolvendo várias etapas (setas contínuas). Já o glipicam é degradado em uma via mais rápida (setas tracejadas) que envolve endocitose e migração para o lisossomo, levando um tempo de aproximadamente 3 horas. Figura adaptada (Yanagishita *et al.*, 1992).

Uma das principais enzimas endógenas responsáveis pela degradação dos proteoglicanos de heparam sulfato é a heparanase, enzima que está intimamente associada a processos de transformações.

1.5.1. Heparanase

A heparanase é uma endo-β-glucuronidase que hidrolisa ligações glicosídicas intrassacarídicas entre a hexosamina (glucosamina-N-acetilada) e o

ácido glucurônico do heparam sulfato constituinte dos proteoglicanos de matriz extracelular e superfície celular (Vlodavsky *et al.*, 2002; Nobuhisa *et al.*, 2005; McKenzie, 2007; Peretti *et al.*, 2008). Os fragmentos de heparam sulfato resultantes dessa quebra possuem em torno de 5000 a 10000 kDa e apresentam intensa atividade biológica (Dong *et al.*, 2000).

O gene da heparanase-1 (HPA1) é formado por 40 kb (40.000 pares de bases), composto por 12 exons e 11 introns, está localizado no cromossomo humano 4q21,3 e é expresso como RNA mensageiro (RNAm) nas formas de 5000 e 1700 pares de base (Baker *et al.*, 1999; Campbell *et al.*, 2000), gerados por "*splicing*" alternativo (Hulett *et al.*, 1999). Ambas as formas contém um ORF "*open reading frame*" constituído de 1629pb que codifica um polipeptídeo de aproximadamente 65 kDa com 543 aminoácidos (Figura16) (Hulett *et al.*, 1999; Toyoshima *et al.*, 1999).

A heparanase foi inicialmente descrita na placenta humana (Klein *et al.*, 1976). Essa enzima sofre uma quebra proteolítica, durante seu processamento pós-tradução, que pode ocorrer em dois sítios possíveis, entre os resíduos de ácido glutâmico¹⁰⁹-serina¹¹⁰ e glutamina¹⁵⁷-lisina¹⁵⁸, gerando três polipeptídeos: um N-terminal de 8 kDa, um C-terminal de 50 kDa e um polipeptídeo de aproximadamente 65 kDa (Hulett *et al.*, 1999; Shafat *et al.*, 2006). O peptídeo de 8 kDa resultante da clivagem proteolítica que ocorre durante o processamento pós-transcricional é importante para a formação do heterodímero com a porção 50 kDa para que a heparanase se apresenta totalmente ativa, tal evidência ainda não é totalmente comprovada (Vlodavsky *et al.*, 2002). Entretanto, existem seis sítios possíveis de N-glicosilação, os quais

se encontram essencialmente agrupados na região dos primeiros 80 resíduos de aminoácidos da região de 50 kDa. É importante ser observado que a remoção da N-glicosilação da heparanase não reduz sua atividade enzimática (Dong *et al.*, 2000).

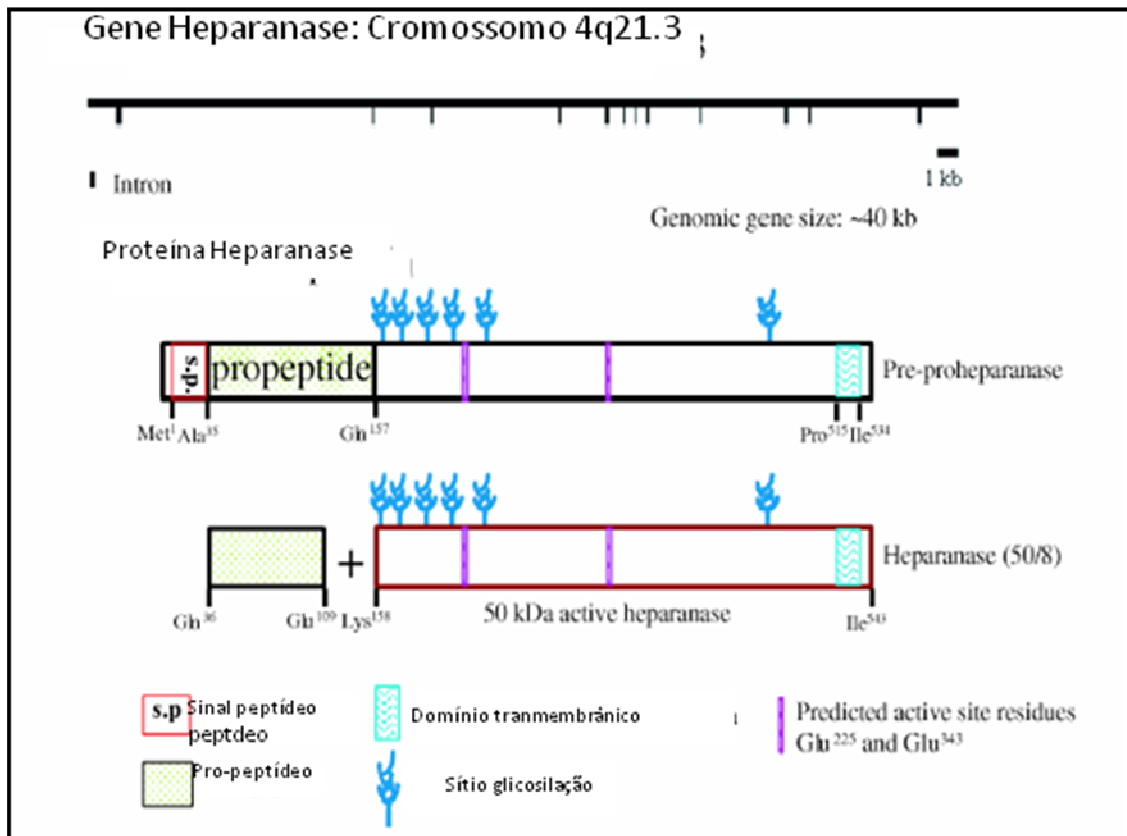


Figura 16. Representação esquemática do gene completo da heparanase Cromossomo 4q21,3. A primeira linha do esquema representa o gene da heparanase de aproximadamente 40 Kb. Em seguida, temos a representação da forma da pré-enzima, contendo o peptídeo sinal na porção amino terminal, o pró-peptídeo de 8 kDa e o segmento ativo da enzima de 50 kDa com seus respectivos sítios de glicosilação e finalmente a representação da heparanase após o processamento pós-tradução (Vlodavsky *et al.*, 1999).

A proteína heparanase contém uma sequência de peptídeo sinal N-terminal (Met¹ – Ala³⁵) e uma possível região transmembrânica entre os aminoácidos Pro⁵¹⁵ – Ile⁵³⁴ (Vlodavsky *et al.*, 1999). Entretanto, outros autores não verificaram a presença de uma região transmembrânica característica na proteína heparanase (Toyoshima *et al.*, 1999).

Existe a descrição de que a formação de um heterodímero entre os polipeptídeos de 8 kDa e 50 kDa são essenciais para a atividade enzimática da heparanase (Vlodavsky *et al.*, 2002) (Figura 17). Estudos demonstram que a atividade enzimática da endoglicosidase heparanase ocorre entre pH 5,0 e 6,5. Em pH 7,4 a heparanase funciona como molécula de adesão, independente de sua atividade enzimática (Goldshmidt *et al.*, 2003; Vlodavsky *et al.*, 2003). Anticorpos específicos anti-heparanase-1, localizam a enzima predominante em vesículas endossomos e lisossomos ácidas. O compartimento lisossomal contém grande variedade de enzimas proteolíticas que devem facilitar a conversão da heparanase-1 latente para a forma ativa (Zetser *et al.*, 2004).

Ainda, a sequência de aminoácidos da heparanase possuem seis sítios putativos de N-glicosilação, estando cinco deles presentes no fragmento da heparanase madura de 50 kDa (Simizu *et al.*, 2004b).

A forma latente da heparanase (pro-heparanase) está esquematicamente representado na Figura 17 como uma fusão das subunidades 8 e 50 kDa. Uma digestão proteolítica induz mudança na conformação que abre o sítio ativo e permite a clivagem do heparam sulfato. O epítipo mínimo do heparam sulfato requerido para a digestão da heparanase está indicado. A direção da rota (*) de inibição da ação da heparanase ainda está sendo investigada (Shriver *et al.*, 2002; Shafat *et al.*, 2006; McKenzie, 2007).

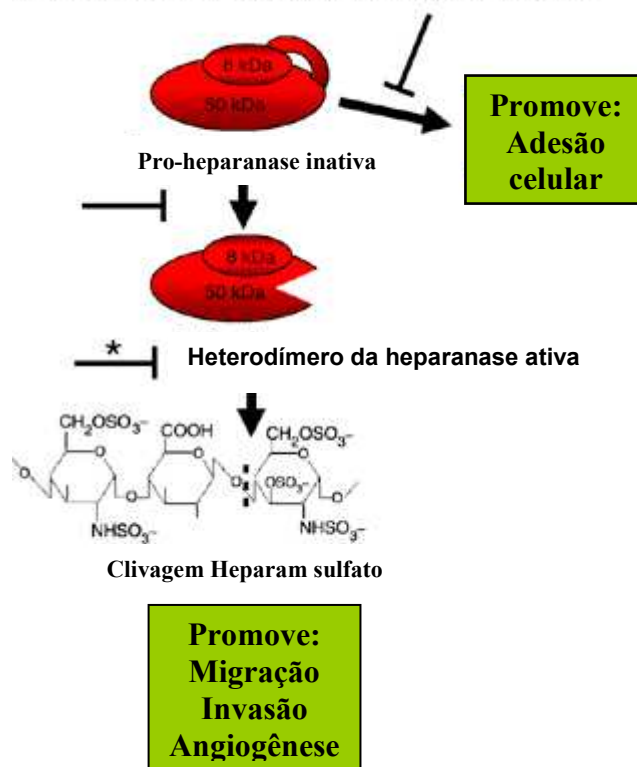


Figura 17. Mecanismo de ativação e ação da heparanase (McKenzie, 2007).

A pró-heparanase apresenta função de adesão celular, enquanto a proteína cataliticamente ativa ao gerar oligossacarídeos de HS promove invasão, migração celular e angiogênese (Figura 17).

A heparanase-1 está relacionada com processos inflamatórios como mostra a Figura 18. A interação da forma latente da heparanase com integrinas aumenta a adesão de leucócitos.

Durante a inflamação, a pró-heparanase interage com sindecam e sofre ação da catepsina-L, promovendo ativação da heparanase-1. A heparanase-1 ativa interage com integrina e induz a degradação do heparan sulfato (HS) que libera oligossacarídeos ativos que se ligam a VEGFR (receptores de VEGF) induzindo assim a angiogênese. Tais oligossacarídeos de HS podem também

interagir com FGFR (receptor de FGF), e promover a ativação da proliferação celular e reparo tecidual. Dissacarídeos sulfatados gerados também inibem o fator de necrose do tumor (TNF) produzido por macrófagos e atuam como regulador negativo da inflamação.

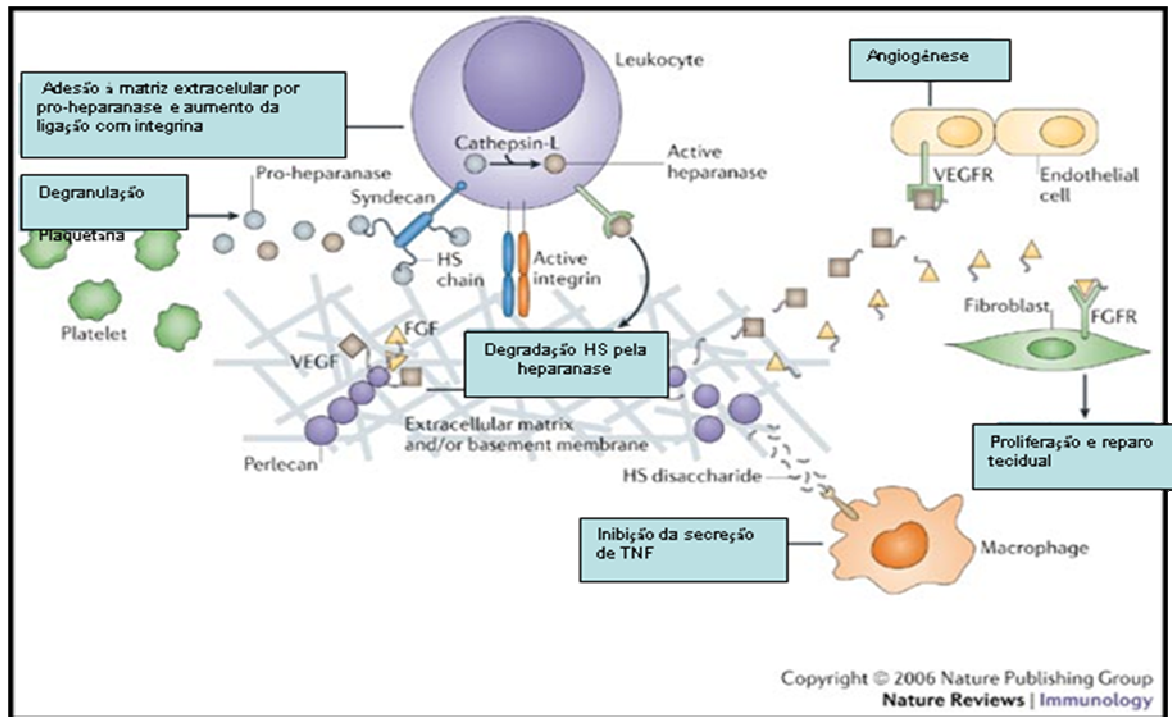


Figura 18. Heparanase ocorre como uma enzima inativa, a pró-heparanase, que pode ser convertida para uma enzima ativa, sofrendo ação de proteases como catepsina-L. Pró-heparanase participa da adesão de leucócitos na matrix extracelular e membrana basal por participar da interação de componentes da matrix extracelular e membrana basal (Nasser *et al.*, 2007).

Recentemente, foi descrita uma isoforma da heparanase humana (HPA1), que perde o exon 5, não possuindo, portanto, 174 bp e comparando-se com o cDNA da heparanase-1 “selvagem” (Nasser *et al.*, 2007). 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 heparan sulfato e possui uma localização difusa e não granular como característico da HPA1 (Levy-Adam *et al.*, 2005).

1.5.2. Heparanase-2

Recentemente foi reportado a clonagem de um segundo cDNA que codifica para uma nova heparanase, designada heparanase-2 humana ou HPA2, codificada pelo cromossomo 10q23-24 (McKenzie *et al.*, 2000; Peretti *et al.*, 2008). Foi observado que existem três isoformas da HPA2 com 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 voltado para o citoplasma (McKenzie *et al.*, 2000).

As expressões da HPA1 e da HPA2 mostraram diferentes padrões de distribuição do RNAm. Em tecidos normais, a expressão da HPA1 está restrita às células hematopoiéticas e placenta. Em contraste, existe baixa expressão da HPA2 nesses tecidos, e alta expressão no cérebro, glândula mamária, próstata, intestino e bexiga (McKenzie *et al.*, 2000).

Desse modo, pode-se sugerir que tais proteínas HPA1 e HPA2 podem responder a diferentes funções nos diversos tecidos.

Trabalhos recentes de nosso grupo demonstraram correlação entre maior expressão da HPA2 em carcinomas colorretais (Peretti *et al.*, 2008). Ainda, foi demonstrado um aumento expressivo da expressão de ambas isoformas da heparanase, HPA1 e HPA2, na fração mononuclear de pacientes com câncer de mama. Tais resultados, corroboram o aumento da expressão de ambas as isoformas (HPA1 e HPA2) em linfócitos de pacientes com câncer de mama, correlacionando

com a presença de metástases tumorais, presença do tumor primário e tipo de tratamento (Theodoro *et al.*, 2007).

A Tabela IV, resume os aspectos de ambas heparanases.

TABELA IV
COMPARAÇÃO ENTRE AS HEPARANASES 1 E 2.

| Propriedades | Heparanase 1 | Heparanase 2 |
|---|---|--|
| Substrato | Heparam sulfato | Desconhecido |
| Distribuição celular | Intracelular, granular e pode estar ligado a membrana; o mecanismo de liberação não é conhecido. | Intracelular, ligado a membrana |
| Ativação | Sintetizado como uma proenzima. A proteína ativa é heterodímera, ou seja necessita de duas subunidades (8 e 50 kDa) para ser ativa. | Desconhecido |
| Tecidos que expressam heparanase (fisiológico) | Plaquetas, linfócitos T (ativados), macrófagos, monócitos, neutrófilos, células endoteliais, células musculares lisas, neurônios, baço, nódulos linfáticos, timo, medula óssea, placenta. | Cérebro, próstata, intestino, testículo e útero. |
| Tumores que expressam heparanase | Próstata, pulmão, mama, pâncreas, fígado, ovário, cólon, linhagens de células tumorais metastáticas. | Pâncreas, intestino, ovário |
| Papel fisiológico | Reparo tecidual, recirculação do linfócito, defesa imunológica, proliferação celular. | Desconhecido |
| Papel fisiopatológico | Doenças autoimunes e inflamatórias, crescimento tumoral e metástase. | Crescimento tumoral |

1.5.3. Distribuição e função da heparanase

O mecanismo pelo qual a HPA1 está envolvida com o câncer envolve a formação dos oligossacarídeos com atividade biológica resultantes da degradação das cadeias de heparam sulfato que estão envolvidos com a intensificação da proliferação celular, angiogênese e diferenciação celular (Gingis-Velitski *et al.*, 2004) (Figura 19). Como já discutido, os níveis elevados de expressão da heparanase-1 em células de mamíferos, parecem estar relacionados com o desenvolvimento de tumores e metástases (Hulett *et al.*, 1999; Vlodaysky *et al.*, 2003).

É importante observa-se que nenhuma seqüência de cDNA, além da seqüência da heparanase-1, demonstrou ter atividade enzimática, indicando que as células de mamíferos expressam primariamente uma única enzima heparanase, a heparanase-1 (Bernard *et al.*, 2001). Portanto, todas as isoformas da HPA2 não apresentam atividade enzimática (Vlodaysky *et al.*, 1999; Shinyo *et al.*, 2003).

Resultados de imunohistoquímica descritos na literatura descrevem a presença da heparanase na superfície celular e no citoplasma em adenocarcinoma de cólon humano e esofágico (Friedmann *et al.*, 2000; Peretti *et al.*, 2008).

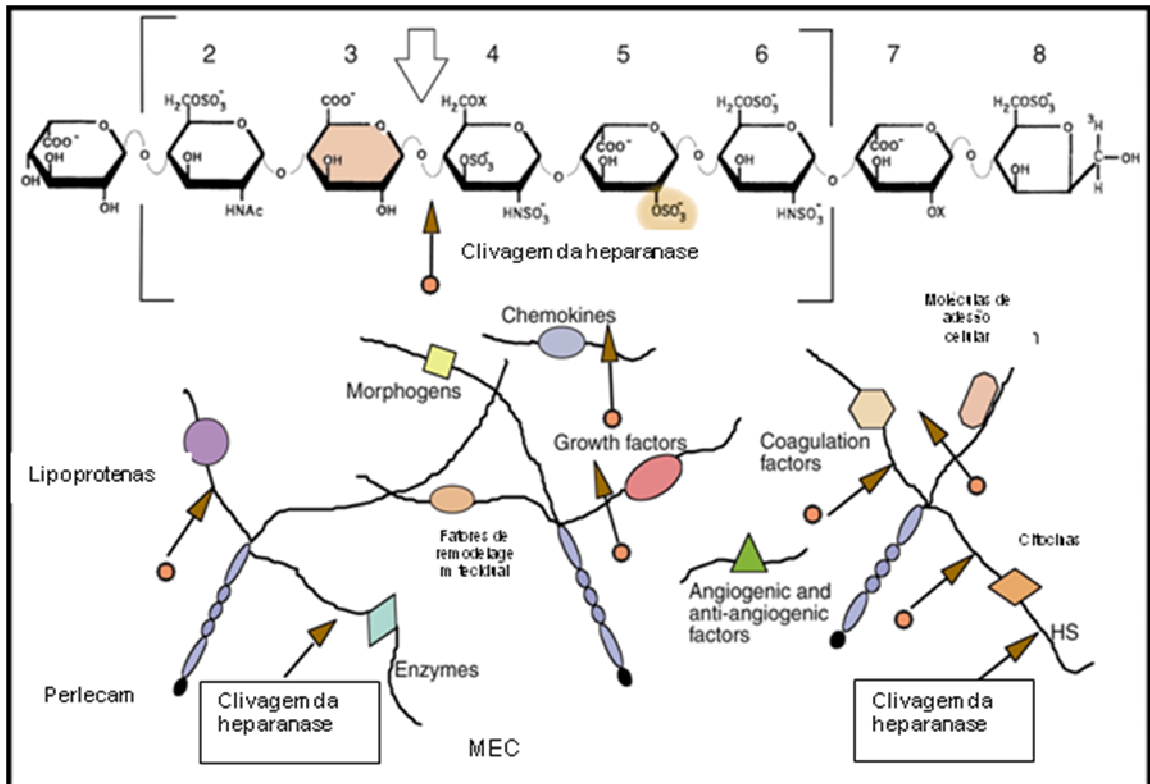


Figura 19. Mecanismo de ação da heparanase-1: As setas indicam o sítio de clivagem da heparanase-1 sobre as cadeias de heparam sulfato dos PGHS da matriz extracelular, liberando oligossacarídeos que seqüestram moléculas tornando-as biologicamente ativas como fatores angiogênicos, fatores de crescimento, moléculas de adesão, citocinas e lipoproteínas, tornando-as biologicamente ativas (Vlodavsky *et al.*, 1999).

1.6. Matriz extracelular e Metástases Tumorais

A matriz extracelular também está envolvida na progressão tumoral, participando do processo invasão de células tumorais e a metástase por degradação das proteínas da matriz extracelular (Liotta *et al.*, 1991). Existem várias famílias de enzimas capazes de degradar a matriz extracelular, incluindo metaloproteases (MMPs), serinoproteases, heparanase e catepsinas (Pryczynicz *et al.*, 2007; Czyzewska *et al.*, 2008). O aumento na regulação e alteração na localização da catepsina B tem sido positivamente correlacionado com muitos tipos de tumor, incluindo os de bexiga, cérebro, mama, cólon, pulmão, próstata e estômago (Ren *et al.*, 1996; Friedmann *et al.*, 2000;

Maxhimer *et al.*, 2002). A interação de catepsina B com a heparina ou heparam sulfato pode potencializar a capacidade endopeptidásica da catepsina B, aumentando em cinco vezes a meia vida da enzima em pH alcalino (Almeida *et al.*, 2001; Tersariol *et al.*, 2002).

Os componentes da MEC são degradados por enzimas proteolíticas extracelulares que são secretadas pelas células locais (Johnsen *et al.*, 1998). As metaloproteases de matriz, como colágeno, laminina e fibronectina, pertence a uma família de endopeptidases dependentes de zinco. O aumento na expressão das MMPs está associado com a invasão tumoral e metástase de tumores malignos de diferentes origens (Basset *et al.*, 1997).

Foi demonstrado que a heparanase promove a formação de fragmentos de heparam sulfato que são capazes de se ligarem com fatores de crescimento como FGF-2 presente na membrana plasmática (Iozzo *et al.*, 2001; Goldshmidt *et al.*, 2002).

As interações entre as células tumorais e o seu micro e macro ambientes criam um contexto que promove o crescimento tumoral e o protegem do ataque imunológico. A associação funcional das células tumorais com seu meio resulta na formação de um novo tecido que muda conforme o progresso de malignidade tumoral (Cox *et al.*, 2001).

Durante a transição do carcinoma invasivo "*in situ*", as células tumorais penetram na membrana basal e atravessam o estroma, ganhando acesso aos vasos sanguíneos e linfáticos e assim disseminando-se (Shafat *et al.*, 2008).

Metástase, e não os tumores primários é responsável pela maioria das mortes nos casos de câncer. O estudo de como a metástase se desenvolve e suas etapas é um importante alvo para prevenir essas mortes.

Há três passos bem caracterizados de alterações da matriz extracelular que estão envolvidos na cascata metastática pós-disseminação linfática/sanguínea.

- 1) Adesão da célula tumoral, via receptores específicos da superfície celular, que geralmente interagem com componentes da MEC. Esses receptores podem reconhecer glicoproteínas, colágenos ou proteoglicanos presentes na MEC (Liotta, 1984).
- 2) Degradação da MEC por enzimas secretadas pelas células tumorais: metaloproteases, colagenases, plasmina, catepsinas, glicosidases e heparanase. Estas enzimas estão associadas com a invasão, pois levam à desorganização e à fragmentação dos componentes do estroma e da membrana basal (Yurchenco *et al.*, 1990; Liotta *et al.*, 1991).
- 3) Locomoção da célula tumoral na região da MEC degradada pelas enzimas (Liotta, 1986b; Liotta, 1986a; Liotta *et al.*, 1986).

Duas propriedades adicionais das células cancerosas afetam suas interações. Primeiro, as células malignas aumentam a secreção de enzimas que agem, degradando a matriz extracelular, como metaloproteases, heparanase e catepsinas, facilitando a invasão de tais células a tecidos adjacentes normais, como mencionado anteriormente. Segundo, as células cancerosas secretam fatores de crescimento que promovem a angiogênese. A

formação desses novos vasos sanguíneos é importante, não somente no suporte do crescimento do tumor, mas também para a metástase. Os novos capilares com crescimento ativo, formados em resposta ao estímulo angiogênico, são facilmente penetrados por células tumorais, proporcionando uma oportunidade para que as células cancerosas entrem no sistema circulatório e iniciem o processo metastático (Sasaki *et al.*, 2004; Shafat *et al.*, 2008; Vlodavsky *et al.*, 2008) (Figura 20).

No cenário de tumor maligno, pode ser visto que a combinação do aumento do nível da expressão do RNAm da heparanase, acoplado com sinais do meio celular, pode desencadear transdução de sinal para a proliferação e metástase tumoral (Shafat *et al.*, 2006).

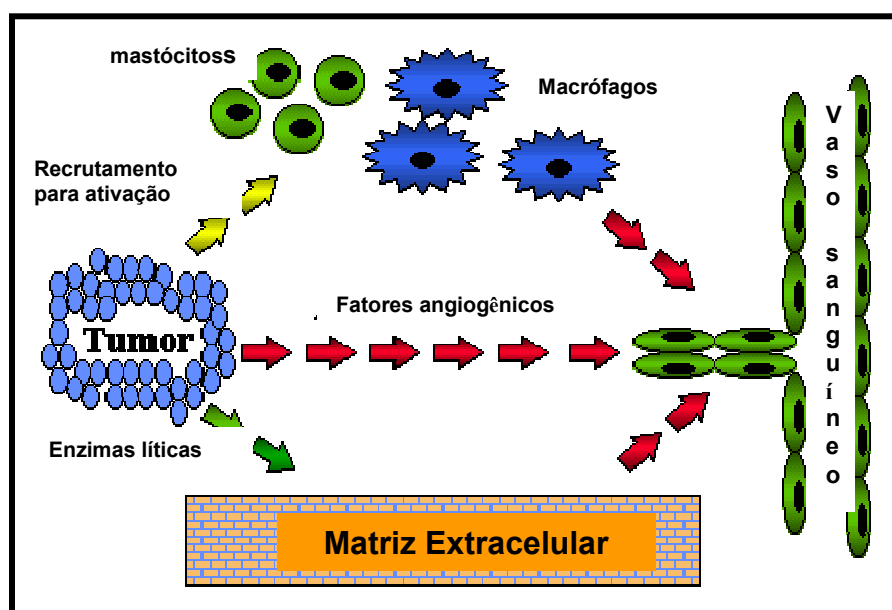


Figura 20. Interações entre células tumorais e matriz extracelular. As células tumorais secretam proteases, fatores angiogênicos e ativam mastócitos para que haja a liberação de citocinas essenciais para a ativação de células endoteliais.

Vários tipos celulares, como fibroblastos, células endoteliais e tumorais, tem demonstrado internalizar a forma latente de 65 kDa da heparanase-1, via ligação com proteoglicano de HS de superfície celular ou receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDLR), além de receptores manose 6-fosfato (Vreys *et al.*, 2005). Esse mecanismo de captação da HPA1 representa uma nova hipótese de células tumorais apresentarem aumento no espaço extracelular (Figura 21).

Células tumorais que superexpressam receptores do tipo P2Y1, podem ser ativadas por nucleotídeos, como adenosina trifosfato (Figura 21). Tais receptores, P2Y1 ativados, acoplados à Proteína G, ativam uma cascata de sinalização via proteína quinase C que movimenta a secreção de heparanase-1 de endossomos/lisossomos intracelulares para o meio extracelular (Shafat *et al.*, 2006). Ainda, tal via de sinalização também ativa a transcrição da HPA1 em células tumorais mais intensamente quando comparado às células não neoplásicas (Figura 21).

Conjuntamente, esses dados relatam as diferenças entre células tumorais e não neoplásicas e explicam fisiologicamente uma das razões do aumento da secreção HPA1 em tumores.

Os mecanismos de regulação da expressão de heparanase são ainda desconhecidos. Alguns trabalhos demonstram que a expressão da heparanase é regulada por pH (Gilat *et al.*, 1995), estrógeno (Elkin *et al.*, 2003) e citocinas (Vlodavsky *et al.*, 2002). Fatores epigenéticos como a metilação, podem estar envolvidos na superexpressão da heparanase (Shteper *et al.*, 2003).

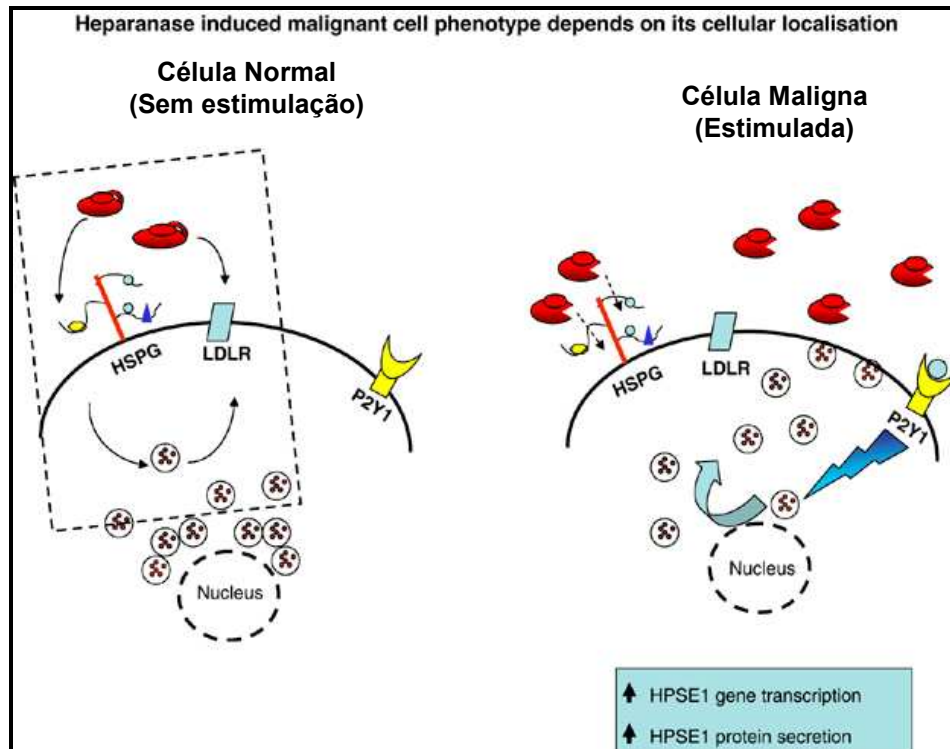


Figura 21. Internalização da heparanase-1. A enzima latente HPA1 (65 kDa) pode ser internalizada por ligação na membrana por co-receptores como HSPG e LDLR (Shafat *et al.*, 2006; McKenzie, 2007).

1.7. Heparanase como alvo para o desenvolvimento de drogas anticâncer

Alterações na sequência e nos níveis de expressão do gene da heparanase, assim como a estrutura da proteína e sua função, podem ser utilizadas como "marcadores moleculares" para detectar câncer nos estágios iniciais, determinar prognóstico, monitorar a progressão da doença ou indicar a resposta terapêutica, por ver essa enzima um papel importante na invasão tumoral e no desenvolvimento do tumor (Hulett *et al.*, 1999; Vlodyavsky *et al.*, 2002; Nobuhisa *et al.*, 2005). Portanto, mais estudos poderão auxiliar no entendimento da evolução do câncer, bem como na terapêutica, e

desenvolvimento de novas drogas antitumorais (Edovitsky *et al.*, 2004; Simizu *et al.*, 2004a).

Recentemente, foi evidenciado que a heparanase pode ser quantificada em amostras de plasma, mas não em amostras de soro, devido à ativação plaquetária e conseqüente liberação de grânulos densos que contém heparanase, prejudicando assim as quantificações (Shafat *et al.*, 2007).

Níveis de heparanase estão significativamente aumentados em plasma de pacientes com câncer; os resultados indicam que os níveis de heparanase podem ser usados para diagnóstico e monitorar a resposta de pacientes submetidos a tratamento anticâncer (Shafat *et al.*, 2007). Essas observações e o efeito anti-canceroso do silenciamento do gene da heparanase e a inibição da moléculas das heparanase sugerem que a enzima é um promessa de alvo para o desenvolvimento de drogas anti-câncer (Goldshmidt *et al.*, 2002; Vlodaysky *et al.*, 2008).

1.8. Neoplasia

Neoplasia (significa crescimento novo) ou tumor é qualquer proliferação anormal de células que pode ser benigna ou maligna. Câncer, termo utilizado em referência aos tumores malignos, contém células capazes de invadir os tecidos vizinhos, penetrar e sobreviver na corrente sanguínea ou linfática e originar tumores secundários.

Câncer é o resultado da perda da integridade dos mecanismos reguladores que governam o comportamento normal das células. A proliferação

e diferenciação celulares tornam-se descontroladas, sendo importante compreensão dessa doença, nos níveis moleculares e celular, para o desenvolvimento de novas tecnologias de diagnóstico precoce e terapias.

Alguns genes supressores tumorais regulam diretamente a função dos proto-oncogenes (são os chamados *gatekeepers*, ou genes protetores). Outros atuam de forma mais indireta, mantendo a integridade do genoma (são os *caretakers*, ou genes de manutenção). A ativação de um gene anti-apoptótico tem o mesmo efeito que a inibição de um gene apoptótico. A ativação dos oncogenes ou dos genes anti-apoptóticos é dominante e requer apenas um alelo mutante, enquanto a ação dos genes supressores de tumor é recessiva, como mostra na Figura 22.

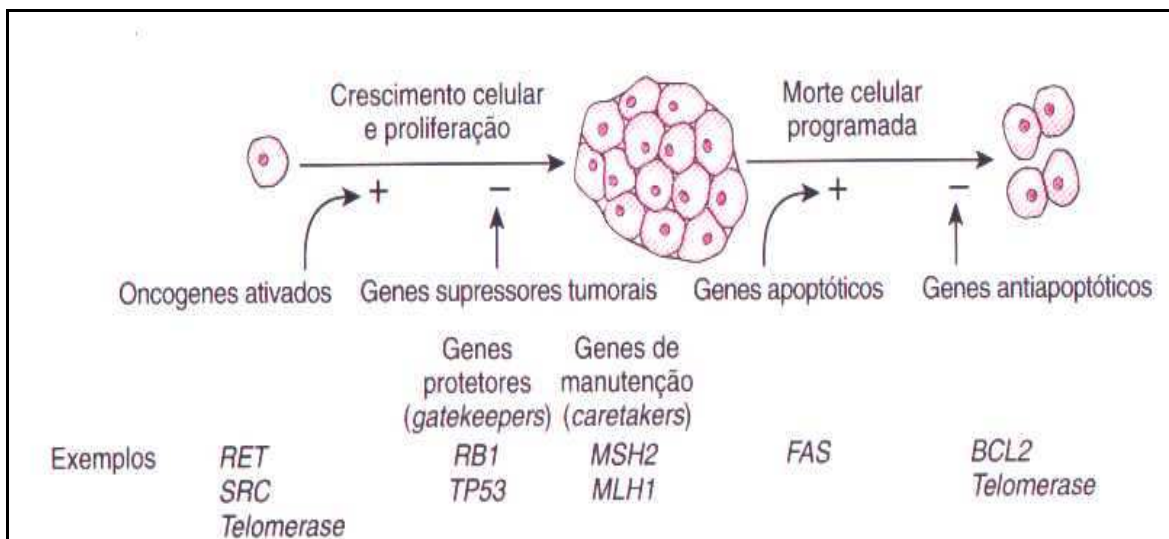


Figura 22. Mecanismos de oncogênese pela ativação de proto-oncogene, mutação ou perda de genes supressores tumorais, ativação de genes anti-apoptóticos ou perda de genes pró-apoptóticos. O efeito dos genes que acentuam um processo é indicado pelo sinal +, enquanto o efeito dos genes que suprimem um processo está indicado pelo sinal -.

O desenvolvimento do câncer é reconhecido como um processo de múltiplos passos, envolvendo mutações e seleções que geram células com capacidade progressivamente aumentada para a proliferação, sobrevivência,

invasão e metástase. A maior causa de câncer é a mutação, alteração no DNA celular, por meio de agentes carcinogênicos que podem ser de natureza química, física ou biológica (Rocken, 2008).

As células neoplásicas possuem vantagem proliferativa em relação ao tecido normal, por desenvolver mudanças genéticas e epigenéticas que contribuem para menor sensibilidade aos fenômenos de apoptose e a diversos fatores de crescimento endógenos e exógenos, proporcionando a progressão do tumor e metastatização.

A remodelação tecidual, gerada pela invasão tecidual, é acompanhada pela liberação de fatores de crescimento presentes na matriz extracelular e que, uma vez liberados, induzem respostas fisiológicas e/ou patológicas, como a reação inflamatória. Dos processos envolvidos na reação inflamatória, a resposta angiogênica pode promover o crescimento tumoral (Liotta *et al.*, 1986).

A organização defeituosa da membrana basal em tumores malignos pode ser decorrente da diminuição na síntese, ou desorganização de seus componentes ou aumento da síntese de proteases que promovem o remodelamento da matriz extracelular (Bissell *et al.*, 2005).

As alterações célula-célula e célula-matriz, das células neoplásicas, apresentam-se alteradas quando comparadas com células normais (Bissell *et al.*, 2005).

O câncer, se diagnosticado em fases iniciais do processo de crescimento da neoplasia, restringe-se ao local onde a alteração começou e diminui a oportunidade de invasão de estruturas e risco de metástases. As metástases

são também tratadas com possibilidade de cura necessitando, habitualmente, a associação de tratamento cirúrgico, quimioterápico e radioterápico.

Os tumores malignos podem ser classificados como carcinomas, sarcomas, leucemias ou linfomas. Os carcinomas, que correspondem a aproximadamente 90% das neoplasias em humanos, são derivados de células epiteliais; os sarcomas, mais raros, são tumores sólidos de tecido conjuntivo e fibroso; leucemias e linfomas, que representam cerca de 8% dos casos de câncer humano, originam-se de células precursoras de células sanguíneas e do sistema imune, respectivamente.

Progressão da Neoplasia Gastrointestinal

As células epiteliais do trato gastrintestinal formam epitélios especializados, com células tipicamente polarizadas. A face luminal, constituída por células especializadas em absorção, é recoberta por uma camada de proteínas (mucinas, entre outras glicoproteínas) secretadas pelas células epiteliais que formam a camada de muco. A polarização das células normais é mantida pela distribuição compartimentada de vesículas secretórias e membranas, sendo que as mucinas e outras glicoproteínas, originadas pelos enterócitos, são levadas para o pólo apical das células e excretadas com as fezes.

Durante a progressão da neoplasia, observa-se a perda de polarização das células epiteliais, associada à alteração funcional das junções intercelulares, proporcionando outra via secretória para as moléculas que seriam eliminadas para o lume intestinal. Evidências indicam que as junções aderentes estão

freqüentemente alteradas em células neoplásicas, podendo este ser um dos elementos iniciais para a perda de polarização da célula epitelial (Bozzetti, 1978).

As junções aderentes são especializações de membranas enriquecidas em proteínas da família das caderinas, moléculas de adesão celular dependentes de cálcio. Quando as caderinas formam as junções aderentes, moléculas de β -catenina migram do citoplasma para a região submembranar, fundamental para a organização do citoesqueleto da célula epitelial, evitando, dessa maneira, translocação da β -catenina livre no citoplasma para o núcleo. Quando isto ocorre, a β -catenina age como transativador de fator de transcrição (Tcf/LEF), induzindo transcrição de diferentes genes que controla a proliferação celular e a invasão tecidual (Debruyne *et al.*, 1999).

E-caderina, β -catenina e o produto do gene APC estão envolvidos no desenvolvimento e das neoplasias do trato gastrintestinal por meio de vias de sinalização. E-caderina e APC funcionam como produtos de genes supressores de neoplasia e β -catenina funcionam como produto de um oncogene. A proliferação celular descontrolada é uma das primeiras alterações celulares observadas com funcionamento inapropriado dessa via e esse crescimento celular parece estar associado à expressão alterada de ciclinas, especialmente as ciclinas D (Bright-Thomas *et al.*, 2003).

As células epiteliais que apresentam alterações na via da E-caderina, além da mudança na resposta proliferativa, expressam maior quantidade de colagenases.

Estudos recentes revelaram que a heparanase tem multifunção no efeito modulatório na progressão do câncer de esôfago, estômago e câncer de colon,

tendo sido relatada a importância da heparanase para o prognóstico de câncer gastrointestinal (Wang *et al.*, 2005) (Figura 23).

Com a degradação da membrana basal, ocorre a liberação de oligossacarídeos capazes de ativar fatores angiogênicos e de crescimento, induzindo a migração da célula tumoral, crescimento e angiogênese, são necessários para célula tumoral realizar metástase distante (Mikami *et al.*, 2001; Naomoto *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005), como esquematizado na Figura 23.

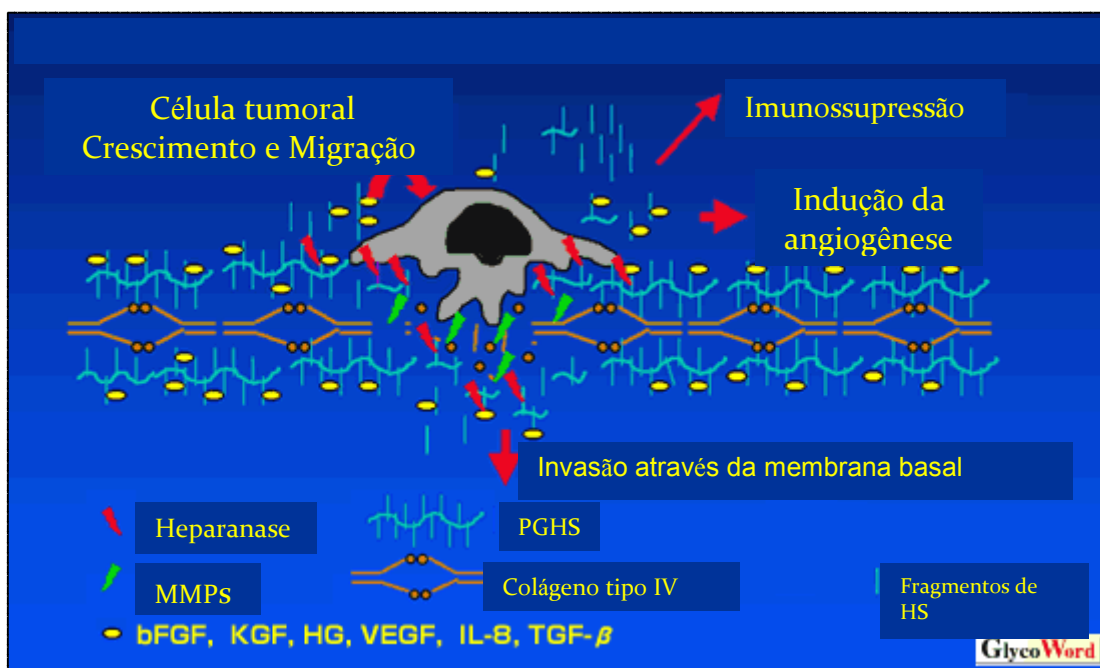


Figura 23. Degradação do heparan sulfato da membrana basal por ação da heparanase.

1.9. Câncer gastrointestinal e a ação da heparanase

1.9.1. Câncer colorretal

O câncer colorretal é a segunda forma mais comum de câncer visceral (depois do pulmão) nos Estados Unidos. Com cerca de 150.000 novos casos sendo diagnosticado a cada ano e aproximadamente 60.000 mortes causadas pelo câncer colorretal, essa doença é responsável por cerca 15% de todas as mortes relacionadas com câncer nos Estados Unidos.

A incidência de câncer colorretal mostra acentuada variação em todo mundo. Assim sendo, nos países de baixa incidência, as lesões costumam localizar-se mais frequentemente no ceco e cólon ascendente, enquanto que nas áreas de alta incidência concentram-se com maior frequência no reto e cólon sigmóide. É interessante assinalar que, nos Estados Unidos e outros países desenvolvidos, esse padrão de distribuição está-se modificando lentamente, demonstrando certo aumento na incidência do carcinoma do cólon direito.

Alguns dos fatores dietéticos mais importantes que parecem predispor incidência mais alta de câncer colorretal são (1) baixo conteúdo de fibras vegetais inabsorvíveis, (2) alto conteúdo de carboidratos refinados e (3) alto conteúdo de gordura. Foi mostrado que uma ingestão dietética reduzida de fibras vegetais em geral está associada com aumento compensador no consumo de açúcares refinados. O conteúdo reduzido de fibras resulta em menor massa fecal, maior tempo de trânsito no intestino e uma flora bacteriana alterada do conteúdo intestinal. Os produtos degradados dos alimentos ricos em

carboidratos estão presentes, portanto, em contrações mais altas na pequena quantidade de fezes.

Cerca de 60 a 70% dos carcinomas colorretais estão localizados no reto, retossigmóide ou cólon sigmóide.

O intestino delgado se une ao intestino grosso, com cerca de 1,5 m de comprimento e até 7 cm de diâmetro. A primeira parte do intestino grosso é chamada de cólon, é onde se dá à absorção da água e nutrientes e onde se acumulam os alimentos que não são digeridos. Esses rejeitos (as fezes) passam do cólon para o reto (os últimos 20 cm do intestino grosso) e dali para fora do corpo através do ânus.

O cólon se divide em quatro regiões ascendente, transversa, descendente e sigmóide. Sabe-se que a maioria dos cânceres colorretais começa como um pólipo, um crescimento anormal de células. Pólipos chamados de adenomas podem se tornar cancerosos; por isso, a remoção preventiva dos pólipos pode evitar a doença (Bradley *et al.*, 1997). Mais de 95% dos cânceres colorretais são adenocarcinomas, tumores das células que revestem internamente o cólon e o reto. Os demais são bem raros.

O câncer colorretal possui uma via genética de progressão histológica do adenoma, descrita como uma série de mutações nos genes APC, *K-ras*, SMAD4/SMAD2/DCC e p53 (Fearon *et al.*, 1990).

Aproximadamente 50% dos casos desse tipo de câncer apresentam mutações no gene *K-ras*, consideradas eventos relativamente precoces e correlacionadas histologicamente na conversão de adenomas para neoplasias avançadas. A família de proteínas *Ras* faz parte das vias de sinalização de

grande número de moléculas envolvidas em transdução de sinais intercelulares (Stemmermann *et al.*, 1994; Mikami *et al.*, 2006).

Os pólipos com displasia de alto grau habitualmente apresentam mutações do gene *p53* e marcam a transição adenoma-carcinoma. A proteína *p53* relaciona-se a diversas vias de transdução de sinal, que auxiliam a estabilização do genoma após dano ao DNA, cessando o ciclo celular, ativando a proteína P21 e inibindo PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) que por sua vez inibe diretamente a fase G1 do ciclo celular e a replicação do DNA, até que o reparo seja efetuado e a apoptose seja induzida (Rodrigues *et al.*, 1990).

Foi demonstrado que a HPA1 é um bom marcador para pacientes com prognóstico ruim com câncer de cólon ou gastrointestinal e pode ser alvo para terapias anti-tumor (Nobuhisa *et al.*, 2005).

A HPA2 também mostrou ser um marcador para o carcinoma colorretal (Nobuhisa *et al.*, 2005; Peretti *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos, as estimativas são de cerca de 147 mil novos casos de câncer colorretal por ano, com cerca de 55 mil mortes. No Brasil, as estimativas são pouco mais de 11 mil casos entre homens e perto de 14 mil entre mulheres. A taxa de mortalidade do câncer colorretal vem caindo nos últimos anos, graças á detecção precoce e aperfeiçoamento do tratamento.

1.9.2. Câncer de esôfago

Nos Estados Unidos os carcinomas do esôfago representam cerca de 10% de todos os cânceres do trato gastrintestinal, porém causam um número

desproporcional de mortes por câncer, permanecem assintomáticos durante grande parte de seu desenvolvimento e, assim sendo, sua descoberta costuma ser por demais tardia para permitir a cura. Nos Estados Unidos a maioria ocorre em adultos com mais de 50 anos de idade; as crianças são afetadas raramente.

Admite-se que o câncer de células escamosas do esôfago possui origem multifatorial, com alguns fatores sendo altamente significativos, o carcinoma de células escamosas do esôfago começa como lesões *in situ* inaparentes. Quando se tornam evidentes, cerca de 50% desses tumores estão localizados no terço médio, 30% no terço inferior e 20% no terço superior do esôfago. As lesões evidentes em fase inicial são descobertas em geral acidentalmente e aparecem como pequenos espessamentos cinza-esbranquiçados semelhantes a placas ou como elevações da mucosa. Esses estendem-se com o passar do tempo ao longo do eixo longitudinal do esôfago e, no transcorrer de meses a anos, acabam circundando a luz. A partir desse ponto, podem envolver três padrões morfológicos. O mais comum (60%) é aquele da lesão polipóide com formato de fungo que faz protrusão para dentro da luz. O segundo padrão macroscópico (25%) é uma ulceração cancerosa necrótica que escava profundamente para dentro das estruturas circundantes e pode corroer para dentro da árvore respiratória e da aorta ou permear o mediastino e o pericárdio. A terceira variante morfológica é uma forma infiltrativa que tende a disseminar-se dentro da parede do esôfago, causando espessamento, rigidez e estreitamento da luz com ulceração da mucosa.

A maioria dos carcinomas de células escamosas é moderadamente bem diferenciada. Independente do grau de sua diferenciação, a maioria dos tumores

é bastante volumosa ao ser diagnosticada e já invadiu a parede. A rica rede linfática na submucosa promove extensa disseminação circunferencial e longitudinal, sendo que os grumos de células tumorais intraluminais podem ser observados com frequência a vários centímetros da massa principal. A extensão local para dentro das estruturas mediastinais adjacentes ocorre precoce e frequentemente nessa doença e limita profundamente a probabilidade de uma ressecção curativa. Os tumores localizados no terço superior do esôfago metastatizam para os vasos linfáticos cervicais; aqueles do terço médio para o gânglio mediastinais, paratraqueais e traqueobrônquios; e os do terço inferior disseminam-se, mas frequentemente para os grupos gástricos e celíaco de gânglio.

O carcinoma esofágico produz disfagia e obstrução paulatina e tardia. Os pacientes ajustam-se subconscientemente à sua maior dificuldade de deglutir alterando progressivamente sua dieta de alimentos sólidos para líquidos. Uma grave redução ponderal e a debilitação resultam tanto da nutrição alterada quanto dos efeitos do próprio tumor. Hemorragia e sepse podem acompanhar as alterações ulcerativas. Ocasionalmente, o primeiro sintoma alarmante é a aspiração de alimentos que penetram na árvore respiratória através de uma fístula traqueoesofágica cancerosa. Convém assinalar que a formação dessa fístula é causada quase sempre por carcinoma do esôfago. O carcinoma broncogênico só raramente invade o esôfago e, conseqüentemente, só raramente produz trajetos fistulosos. O crescimento insidioso e invasivo dessas neoplasias produz habitualmente grandes lesões ao fazer o diagnóstico, tornando a dissecação difícil ou até impossível. Em geral a ressecção é possível

em menos de metade dos casos. Até mesmo com os métodos padronizados de terapia, tais como ressecção cirúrgica com irradiação, ou supervoltagem, 70% dos pacientes estarão mortos dentro de 1 ano após fazer o diagnóstico e a taxa de sobrevivência de 5 anos é de 5 a 10%.

O esôfago normal de um adulto tem entre 23 e 25 cm de comprimento e entre 2 e 3 cm de diâmetro. A camada que reveste o interior do esôfago é chamada de mucosa e tem duas partes, o epitélio e a lâmina própria. O epitélio é formado por células escamosas. A lâmina própria é uma fina camada de tecido conectivo que fica logo abaixo do epitélio.

Há dois tipos principais de câncer de esôfago, o carcinoma epidermóide escamoso ou espinocelular (CEC) (Leon *et al.*, 1971; Vansant *et al.*, 1971) e o adenocarcinoma. O esôfago é revestido por células escamosas, CEC pode ocorrer em qualquer ponto ao longo do órgão. Em décadas anteriores o CEC representava cerca de 96% dos casos de câncer de esôfago no Brasil e no mundo. Recentemente, o quadro tem se modificado com o aumento do número de adenocarcinoma, chegando a representar cerca de 50% do total em alguns países ocidentais.

Os adenocarcinomas têm origem no tecido glandular e tem crescido em frequência. Antes de o adenocarcinoma se desenvolver, as células glandulares precisam substituir as escamosas, como ocorre no esôfago de Barret que comete na maioria das vezes a parte inferior de esôfago.

A perda da superexpressão da heparanase-1 e diminuição de sindecam-1 em carcinoma de células escamosas esofágica está intimamente associada com a malignidade (Mikami *et al.*, 2001).

No Brasil, o câncer de esôfago está entre os dez mais incidentes segundo dados obtidos dos Registros de base Populacionais (Ministério da Saúde 2005). Espera-se ocorrer cerca de 10.590 casos novos deste tumor por ano, e a estimativa por 100.000 habitantes é de 8,14 para homens e 2,45 para mulheres, observando-se maior frequência na região sul, com previsão de até 22,57 casos novos por 100.000 habitantes (Ministério da Saúde 2005). Esses dados colocam o câncer de esôfago como um dos mais letais e de pior prognóstico.

1.9.3. Câncer de estômago

O estômago é um órgão digestivo glandular e endócrino complexo constituído de três grandes regiões anatômicas. As glândulas do cárdia são secretoras de mucina, enquanto que as do corpo contêm tanto células parietais secretoras de ácido quanto pelas principais secretoras de pepsinogênio. Além do ácido clorídeo, as células parietais produzem também fator intrínseco, que potencial para a absorção da vitamina B12. As glândulas no antro são ricas em células G secretoras de gastrina. A histologia das várias glândulas é apresentada adiante, porém alguns comentários gerais são necessários para maior compreensão da patologia gástrica.

Toda a superfície mucosa, assim como o revestimento das criptas gástricas, é constituída pelas denominadas células de superfície que são altas, colunares e secretoras de mucina. Possuem núcleos basais e inúmeros pequenos grânulos relativamente claros que contêm muco nas regiões supranucleares. Com fixação apropriada os grânulos de mucina podem ser corados com mucicarmim ou com reação PAS. Ao exame ultra-estrutural as

células mucosas de superfície possuem microvilosidades curtas e delicada camada de glicocálix filamentar fino em suas superfícies lisas. Profundamente dentro das criptas gástricas, onde deságuam as várias glândulas, as células epiteliais superficiais são bastante modificadas e recebem a designação de células do colo, consideradas como os progenitores tanto do epotélio superficial quanto das células das glândulas gástricas. As mitoses são extremamente comuns nessas células do colo e toda a superfície mucosa gástrica é substituída completamente a cada 2 e 6 dias.

As glândulas cardíacas no cárdio gástrico são revestidas por células indiferenciáveis das células do colo das glândulas gástricas. Podem existir células argentafins individuais espalhadas entre as células mucosas.

As glândulas gástricas (oxínticas) no corpo ou no fundo do estômago são formadas em suas regiões superiores por células mucosas do colo, abaixo das quais existem células principais. Estas caracterizam-se por seus grandes grânulos pálidos de zimogênio mais proeminente no ápice. As células parietais são reconhecidas prontamente nos preparados de hematoxilina e eosina por sua eosinofilia brilhante. Ao exame ultra-estrutural revelam numerosas mitocrôndrias e canalículos intracelulas proeminentes para dentro dos quais é secretado o ácido gástrico.

As glândulas pilóricas (antrais) são formadas em grande parte por células semelhantes aquelas das regiões do colo das glândulas gástricas. Podem conter grânulos semelhantes aos encontrados nas células principais ou no epitélio superficial. Existem também numerosas células endócrinas produtoras de gastrina.

As células endócrinas, caracterizadas por um citoplasma granular ou rosa-pálido, distribuem-se amplamente na mucosa de todo o trato gastrintestinal. Apesar da existência dessa célula ter sido relatada

O câncer de estômago (ou câncer gástrico) pode se espalhar de várias maneiras, crescendo e invadindo as paredes estomacais e, mais tarde, atingindo órgãos próximos, também pode se espalhar para os gânglios linfáticos e deles para o sistema linfático. Em estágios mais avançados, as células cancerosas podem passar para a corrente sanguínea e produzir metástases em órgãos como fígado, pulmões e ossos. Quando isso ocorre, as possibilidades de cura diminuem.

A maioria dos cânceres de estômago tem origem na mucosa e é chamado de adenocarcinoma, e o termo "câncer de estômago" é praticamente sinônimo desse tipo de câncer. Linfomas gástricos, leiomiossarcomas, tumores estromais gástricos (Gist) e tumores carcinóides também ocorrem no estômago, mas são bem mais raros.

1.9.4. Câncer de Fígado

A maioria dos cânceres no fígado é representada por metástas, o carcinoma primário de células hepáticas constitui provavelmente o tumor maligno visceral mais comum em homens. Duas formas de câncer hepático primário, o hepatoblastoma e o angiossarcoma.

O hepatoblastoma é um tumor habitualmente da primeira infância capaz de produzir metástase, mas que às vezes permite uma ressecção bem sucedida. Existem duas variantes anatômicas: (1) o tipo epitelial, formado por pequenos

hepatócitos embrionários ou fetais compactos e escuros que apresentam apenas vaga semelhança com as células hepáticas maduras; e (2) o tipo misto, formado por células mais ou menos semelhantes misturadas com outras que apresentam semelhança ligeiramente maior com as células hepáticas maduras, entremeadas com focos de diferenciação mesenquimal como, por exemplo. Músculo estriado, cartilagem, osteóide. Se a ressecção não for bem sucedida, ambas as variantes costumam ser fatais dentro de poucos anos.

O angiossarcoma é uma neoplasia altamente agressiva semelhante aquelas que ocorrem em outros locais. Entretanto, é bastante interessante porque, no passado, estava associado com exposição ao cloreto de vinil, ao arsênico ou ao Thorotrast. O período latente entre a exposição ao hipotético carcinógeno e o aparecimento da neoplasia oscilou em até várias décadas. Essas neoplasias altamente agressivas metastatizam amplamente e, em geral, matam dentro de 1 ano.

Existem basicamente dois tipos de carcinoma primário do fígado: um é o carcinoma hepatocelular (CHC) ou carcinoma de células hepáticas; o outro, formado por epitélio dos ductos biliares, é designado de colangiocarcinoma. Muito raramente, uma neoplasia parece compartilhar as características de ambas as linhas, o hepatocolangiocarcinoma. CHC, lamentavelmente às vezes ainda denominado de hepatoma, é responsável por mais de 90% de todos os cânceres hepáticos primários. Praticamente todos os demais são colangiocarcinoma; o padrão misto é muito raro. Houve um renascimento do interesse no CHC, por várias razões: (1) as extraordinárias diferenças em sua distribuição mundial; (2) a existência de novas perspectivas nas possíveis

influências causais; e (3) a possibilidade das intervenções agora disponíveis poderem reduzir a incidência dessa forma de câncer.

Estudos realizados com carcinoma hepatocelular, sendo o principal tipo de câncer primário do fígado, foram detectadas a presença de expressão da heparanase-1, foi também correlatado com a tendência de progressão do tumor, metastástase pós-operatório e recorrência do tumor. Sendo assim pode ser válido um exame para a expressão da HPA-1 para uma predição clínica da metastástase e recorrência do carcinoma hepatocelular. Entretanto, a expressão da heparanase não teve correlação com o tamanho do tumor (Liu *et al.*, 2005).

2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo são:

- 1) Quantificar a expressão da enzima heparanase-1 (isoformas HPA1 50kDa e 65 kDa), e isoformas da heparanase-2 (HPA2), em plasma de pacientes com carcinoma gastrointestinal, comparando-se com a expressão em indivíduos não acometidos por neoplasia (controle).
- 2) Correlacionar os níveis de expressão da pro-heparanase-1 (65 kDa) e heparanase-1 enzimaticamente ativa (50 kDa).
- 3) Correlacionar os índices de expressão de HPA1 e HPA2 com variáveis clínicas e anátomo-patológicas de indivíduos com carcinoma gastrointestinal.
- 4) Comparar a expressão de HPA1 e HPA2 plasmática.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes e materiais

Os reagentes utilizados em todos os experimentos foram para análise de acordo com as normas técnicas. A seguir, alguns dos reagentes específicos mais utilizados neste trabalho:

- Acrilamida, (GE Healthcare, Uppsala, Suécia);
- Albumina sérica bovina (BSA) (Fração V) – Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA);
- Álcool Metílico, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Álcool Etilico, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Anticorpo Policlonal anti-heparanase humano produzido em cavalo – HPA1 (H-80), produto sc-25825 a empresa Santa Cruz Biotechnology Inc., (Califórnia, EUA);
- Anticorpo Policlonal anti-heparanase humano produzido em cabra – HPA2 (C-17), produto sc-14900 a empresa Santa Cruz Biotechnology Inc., (Califórnia, EUA);
- Anticorpo secundário IgG anti-Coelho produzido em cabra e conjugado com biotina (Jackson ImmunoResearch Laboratory, PA, EUA);
- Anticorpo secundário IgG anti-Cabra produzido em cavalo conjugado com biotina (Jackson ImmunoResearch Laboratory, PA, EUA);
- Bisacrilamida, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA);
- Cloreto de Sódio, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Glicina, Merck (Darmstadt, Alemanha);

- Ficoll (Ficoll Hypaque; Organon Teknica[®], Durham, NC, EUA);
- 3,3' diaminobenzamida (DAB) – Sigma Diagnostics[®], (St. Louis, MO, EUA);
- Leite desnatado em pó - Molico[®] Nestlé (São Paulo, Brasil);
- Membrana de nitrocelulose (0,45 micron), Bio-Rad Laboratories Ltd. (Hercules, EUA);
- Níquel, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- N-Butanol, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Padrão de massa molecular para eletroforese em gel de poliacrilamida pré-corado Page Ruler[™] Prestained protein Ladder - Fermentas (Burlington, Canadá);
- Peróxido de Hidrogênio, Merck (Darmstadt, Alemanha);
- Placas mutipoços com 96 poços da Falcon (New Jersey, EUA);
- Placas de poliestireno de 60 x 10 mm (P60) da Falcon (New Jersey, EUA);
- Ponceau S, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA);
- β-mercaptoetanol, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA);
- N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA);
- Reagente Comassie brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, Califórnia, EUA);
- Estreptavidina horseradish conjugada com peroxidase, (GE Healthcare, Uppsala, Suécia);
- SDS "Sodium Lauryl Sulphate" – BDH – Biochemicals, Poole, England);
- Tween 20 (Polioxietilenosorbitam), Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA);

- Tubos de 15 e 50 mL, Falcon, Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, EUA);
- SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems®, CA, EUA);
- *Super Script II*, "kit" de RT-PCR (Invitrogen®, CA, EUA);

Todos os demais reagentes e materiais empregados foram de melhor qualidade comercial disponível.

3.2. Tampões e soluções

- PBS "phosphate buffer saline": 0,1 M: NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 15,22 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM e KCl 2,7 mM em pH 7,4;
- Tampão de corrida "Running Buffer" Tris/HCl 25 mM, contendo glicina 192 mM, SDS 1% (v/v), pH 8,5;
- TBS-T: 0,5 M Tris; 1,36 M NaCl; 0,01% Tween 20 (v/v), em pH 7,5;
- Ponceau S (0,2% (p/v) em TCA 3% (v/v);
- Solução de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,75;
- Solução de NaCl 0,15 M;
- Tampão de ensaio: Tris-HCl 0,05 M, pH 7,75 associada a 1% de BSA.

3.3. Equipamentos

Além dos equipamentos de uso rotineiro em laboratório, citamos em especial os que mais foram usados nos experimentos:

- Agitadores: Vortex-Genie 2 modelo G250, Scientific Industries (Bohemia, NY, EUA); Stovall Roller, Life Sciences Inc. (Greensboro, NC, EUA); e Corning Stirring Plate (Corning, NY, EUA);
- Autoclaves vertical e horizontal da FABBE (São Paulo, SP, Brasil);
- Fontes de corrente contínua reguláveis, adquiridas da LKB Producter (Bromma, Suécia) e desenvolvidas pela Técnica Permatron Ltda. (São Paulo, SP, Brasil);
- Sistema de eletroforese vertical Mini-Protean II, Bio-Rad Laboratories Ltd. (Hercules, EUA);
- Sistema de eletrotransferência de proteínas tipo úmido, Bio-Rad Laboratories Ltd. (Hercules, EUA);
- Leitor de ELISA modelo ELX 800 (Universal Microplate Reader) da Biotek instruments. Inc. (Highland Park, WI, EUA);
- Plataforma tecnológica ABI PRISM 7000 SDS;
- Purificador de água Milli-Q™ ZD2- 115 84 da Millipore Corporation (Bedford, MA, EUA);
- Ultracentrifuga modelo CP70G da Hitachi (Tóquio, Japão).
- Gene Quant RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech®).

4. MÉTODOS

4.1. Casuística

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo PROCESSO NÚMERO: 0660-05, CEP FMABC (Faculdade de Medicina do ABC) 025/2008, CEP IAMSP (Hospital Servidor Público Municipal de São Paulo) 021/2008. Esse estudo foi realizado de acordo com os padrões éticos aceitos pela Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial, adotado em 1964 e emendado em 1996.

Trata-se de um estudo transversal onde foram analisados 42 pacientes com carcinoma gastrointestinal, submetidos (40%) ou não (60%) à ressecção do tumor, entre setembro de 2007 e maio de 2008, sendo trinta e um (74%) homens e doze (26%) mulheres. A média de idade da amostra em estudo foi 67 anos (mínima 48 e máxima 82 anos). As amostras de plasma dos pacientes com neoplasia foram obtidas do Laboratório de Patologia Cirúrgica Ferdinando Costa, São Paulo, SP, Brasil, antes e após o procedimento cirúrgico.

O grupo controle compreendeu 42 doadores saudáveis que constituem voluntários doadores de sangue obtidos em colaboração com a Colsan (Associação Beneficente de Coleta de Sangue, Hospital São Paulo). Foram colhidos aproximadamente 10.0 ml de sangue total por de venopunção periférica, as amostras sangüíneas foram distribuídas entre tubos com anticoagulante EDTA, no laboratório, os tubos foram centrifugados a 3.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente para separação do plasma, estocados a - 20°C antes de ser usado.

As informações clínicas e dados anatomopatológicos de cada paciente foram obtidas por consultas e análise dos prontuários hospitalares ou por entrevistas com os doentes ou familiares nos retornos ambulatoriais.

Foram considerados critérios de inclusão: presença de carcinoma do reto, colorretal, esôfago, estômago, hepatocarcinoma, confirmados pelo estudo histopatológico da lesão extirpada com intenção curativa. O termo curativo foi utilizado para designar ausência de doença residual neoplásica macroscópica ao final da cirurgia, constatada pelo estadiamento pré-operatório e pela avaliação intra-operatória do cirurgião, além da presença de margens cirúrgicas livres no laudo do exame anatomopatológico da peça cirúrgica extirpada, e obtenção de margem cirúrgica adequada, ausência de carcinomatose no inventário da cavidade abdominal realizado durante a extirpação da lesão neoplásica, ausência de doença extra-hepática inextirpável e ausência de comorbidades que prejudicassem a avaliação da sobrevivência.

Todos os pacientes tiveram seu diagnóstico histológico de carcinoma gastrointestinal confirmado pela revisão das lâminas coradas pelo método e hematoxilina-eosina (HE) confirmados por patologista.

4.2. Método de Bradford

O Método de Bradford é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de "Coomassie brilliant blue" BG-250 (Bradford, 1976).

Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 especialmente com aminoácidos que possuem cadeias laterais com caráter básico ou aromático. No pH 1,3 que ocorreu a reação, a interação entre proteínas e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (Compton e Jones, 1985). Cumpre ser observado que tal metodologia é mais sensível para proteínas de baixa massa molecular como exemplo 3 kDa.

O método de Bradford é mais rápido e sensível comparativamente a outros métodos de dosagem de proteínas como o método de Lowry. O método de Bradford tem sido utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios fisiológicos como plasma, soro, líquido, saliva e urina.

O método apresenta, entretanto algumas desvantagens, tais como a variação da absorvidade para diferentes proteínas, devido à baixa solubilidade ou baixo peso molecular das mesmas, e fornecimento de resultados nem sempre reprodutíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250 (Compton e Jones, 1985).

Para tentar tornar mais uniforme a absorvidade específica de diferentes proteínas, algumas alternativas são sugeridas como aumentar a concentração do corante, aumentar a solubilização das proteínas utilizando detergente, hidróxido de sódio ou fenol. Ainda, no caso de amostras com proteínas de baixo peso molecular, não é recomendado usar tal metodologia.

As amostras de plasma dos pacientes e de indivíduos saudáveis foram diluídas na proporção de 1:100 em água Milli-Q autoclavada, antes de fazer a dosagem de proteínas totais.

A concentração protéica das amostras foi estimada através do método colorimétrico descrito por Bradford (1976), utilizando-se o reagente de Bradford da *BioRad*.

Na placa de ELISA de 96 poços foram adicionados várias concentrações de BSA (Soro albumina bovina) conhecidas variando entre 0,25µg – 2,0µg, em duplicatas para obtenção da curva padrão. Aplicou-se 5µl das amostras de plasma diluídas em 15µl de água Milli-Q autoclavada, seguida da adição de 200µl do corante Coomassie Blue. Em seguida, foi realizado a leitura da placa em Leitor de ELISA, no comprimento de onda a 595 nm. Utilizando a curva padrão de BSA, foi realizado a quantificação de proteínas totais de cada amostra baseado na equação da reta obtida da curva padrão.

4.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

As proteínas plasmáticas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel de corrida (10%) foi preparado de acordo com protocolo que utilizou as soluções: 30% acrilamida (p/v), 0,8% bis-acrilamida (p/v); 10% SDS (p/v); 0,1% TEMED

(v/v); persulfato de amônio (100 mg/mL, p/v) e tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. O gel de empacotamento (4%), foi preparado com as soluções descritas acima, com exceção do tampão, que nesse caso foi utilizado o Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. Aliquotas de 2ug ou 5ug de proteínas plasmáticas totais, obtidas de amostras de plasmas diluídos 1:100 foram preparadas em tampão de amostra Tris-HCl 75,3 mM; 2% SDS (p/v), 5% glicerol (v/v), uréia 400 mM, pH 6,8 e 0,01% azul de bromofenol (v/v) na presença de 3% do agente redutor β -mercaptoetanol (v/v) e aquecidas a 100°C por 5 minutos para aplicação no gel.

A eletroforese foi realizada na presença de tampão de corrida Tris-HCl 25 mM, contendo glicina 192 mM, 1% SDS (v/v), por aproximadamente duas horas.

Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) na presença de tampão Tris-HCl 24 mM, contendo glicina 192 mM e metanol 20% (v/v) e pH 9,2 utilizando o sistema de transferência (*Bio-Rad*). A transferência foi realizada por aproximadamente duas horas, a 4°C.

A eficiência da transferência foi verificada pela coloração das proteínas com 0,2% Ponceau S (p/v) em 3% TCA (v/v).

Cumprir ser observado que para as análises da heparanase-1 foi utilizado 2ug de proteínas plasmáticas, enquanto 5ug foram utilizadas para as análises da heparanase-2. Esses dados são resultantes de várias tentativas de diluições para detecção de ambas isoformas de heparanases no plasma de pacientes e indivíduos saudáveis que foram realizados em nossos estudos (dados não mostrados).

4.4. Técnica de *Western Blot*

A membrana de nitrocelulose foi incubada com uma solução de bloqueio (1% de leite Molico desnatado) em TBS-T (Tris 0,5 M; 0,01% NaCl 1,36 M; em pH 7,5) contendo 0,01% Tween 20 (v/v), sob agitação branda por duas horas..A seguir, foram realizadas cinco lavagens sucessivas de cinco minutos cada utilizando TBS-T contendo 0,01% Tween 20 (v/v), e mais 3 lavagens com TBS-T apenas.

A membrana foi inicialmente submetida à incubação com o anticorpo primário anti-Heparanase-1 H-80 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), na proporção de 1:500 em solução TBS-T 0,01% Tween 20 (v/v), e contendo 0,1% de BSA, e durante 18 horas, a 4°C, sob agitação branda. A membrana foi submetida a cinco lavagens de cinco minutos com TBS-T 0,01% Tween 20 (v/v). Em seguida, foi submetida à incubação com o anticorpo secundário IgG anti-Coelho produzido em cabra conjugado com biotina (Jackson ImmunoResearch Laboratory, PA, USA), na proporção de 1:500 em solução TBS-T 0,01% Tween 20 (v/v) e 0,1% de BSA. Tal incubação foi durante duas horas à temperatura ambiente e em seguida, a membrana foi lavada exaustivamente (dez vezes), de dez minutos cada lavagem, para remoção de ligações inespecíficas. A seguir, foi realizado incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) na proporção 1:500 em solução TBS-T 0,01% Tween 20 (v/v). A revelação do complexo anticorpo biotina-estreptavidina, visualizadas após revelação da reação com o substrato 3,3'- diaminobenzidina (DAB). A Figura 24 mostra o complexo da seqüência de anticorpos para a identificação da HPA-1.

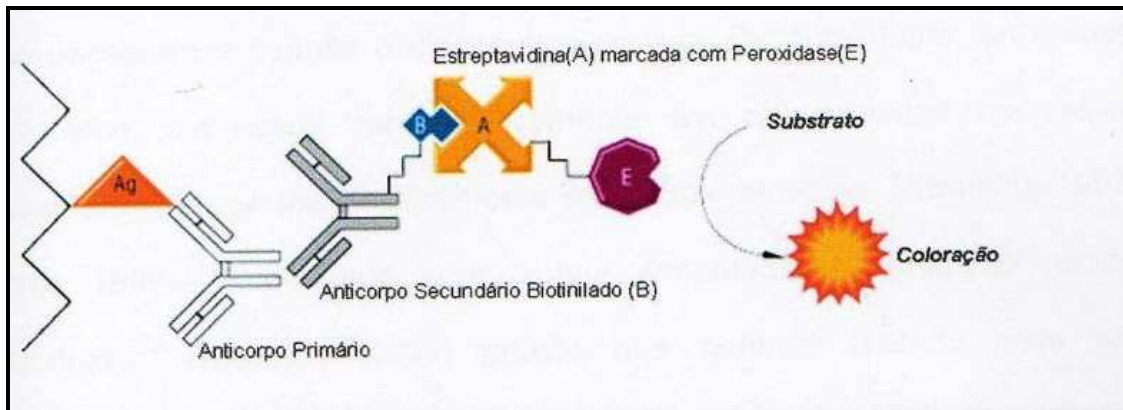


Figura 24. Esquema representativo das etapas do método imunoenzimático de imunomarcação. A seqüência utiliza-se o anticorpo primário seguido do anticorpo secundário biotilado, se liga a estreptavidina conjugada com peroxidase, usando-se a diaminobenzina (DAB) como cromógeno, expressando a cor marrom (técnica de estreptavidina – biotina marcada: “*labeled streptavidin-biotin*”, para que ocorra a revelação.

Para revelar a membrana com DAB, a membrana foi submetida a cinco lavagens de dez minutos com TBS-T, 0,01% Tween 20 (v/v) e mantida no escuro por duas horas em uma solução de 3,3'- diaminobenzidina (sendo 0,5 mg/ml em PBS contendo 0,2% de NiCl₂). A revelação ocorreu, após incubação da membrana com a mesma solução de DAB, acrescida de H₂O₂ (1µl de solução de H₂O₂ 30 volumes, para 500µl da solução de DAB). A reação foi interrompida lavando-se a membrana com água destilada.

A transferência, incubação e revelação das proteínas plasmáticas ocorreram da mesma maneira como citado anteriormente, entretanto, a incubação foi realizada com anticorpo primário anti-Heparanase-2 C-17 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), e incubada com anticorpo secundário IgG anti-cabra produzido em cavalo conjugado com biotina (Jackson ImmunoResearch Laboratory, PA, USA).

4.5. Quantificação da reação de *Western Blot*

A quantificação das bandas observadas nas técnicas de *Western blot* foi realizada através da análise por densitometria usando a análise de gelplot macros no programa *Scion Image Software, Version 4.03 (Scion Corporation, MD, USA)* que mede a densidade integrada de cada banda. Os dados densitométricos de cada banda foram comparados a um controle interno, no caso utilizamos uma amostra de indivíduo saudável (não acometido por neoplasia). A análise dos dados foi realizado pelo programa estatístico SPSS® versão 13.0 (SPSS® Inc; Illinois, USA).

4.6. Coleta de sangue periférico e separação da fração mononuclear

Foram coletados 20 ml de sangue periférico dos pacientes com carcinoma gastrointestinal e de indivíduos não acometidos por neoplasias. Após a coleta do sangue periférico foi realizado o hemograma completo para a avaliação do número global de leucócitos dos pacientes e também avaliação clínica das mesmas. A fração mononuclear do sangue periférico foi separada com gradiente de Ficoll (Ficoll Hypaque; Organon Teknica®, Durham, NC, USA). Em seguida, os linfócitos foram contados em Câmara de Neubauer e a concentração dos mesmos foi ajustada para 1×10^6 linfócitos/ml.

4.7. Extração de RNA total das células da fração mononuclear

A extração do RNA total foi realizada em tubos contendo células do sangue periférico (aproximadamente 10^6 células), obtidas a partir da fração mononuclear como descrito anteriormente. Em seguida, a solução de TRIZOL[®] (Life Technologies), foi adicionada em cada preparação e a extração do RNA total seguiu o protocolo descrito pelo fabricante.

4.8. Teste de Integridade do RNA

A integridade do RNA extraído da fração mononuclear foi testada para a confirmação de que não houve degradação do mesmo. O teste de integridade do RNA foi realizado a partir de uma alíquota de 3 μ l de RNA total, 9 μ l de solução de azul de bromofenol e 3 μ l de água MilliQ autoclavada. A mistura foi aplicada em uma cuba eletroforética em gel de agarose 0,8% tampão TAE 1X, o qual foi preparado a partir do TAE 50 X (242 g de Tris Base + 57,1 g de ácido acético + 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0). Após a corrida eletroforética, o gel foi submetido à luz UV para a observação do RNA. A pureza e a integridade do RNA ribossômico foram determinadas pela presença das bandas 28S e 18S. Amostras em que foram observadas mais de duas bandas devido à contaminação por DNA ou amostras que foram detectadas degradação do RNA, não foram consideradas para análises futuras previstas em nossos estudos. A dosagem do RNA total foi realizada utilizando aparelho Gene Quant RNA/DNA Calculator (Amersham Pharmacia Biotech[®]).

4.9. Obtenção do cDNA a partir do RNA total

A obtenção do cDNA foi realizada utilizando-se o “kit” de RT-PCR da marca Invitrogen® (*Super Script II*). Foi adicionado 5 µg de RNA total, 1 µl do “*primer*” ou oligonucleotídeo iniciador oligo dT (10 µM), 1µl dos dNTPs, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (10 µM), 1,5 mM de Mg₂Cl em um eppendorf (volume final da reação 0,5 ml). Primeiramente o molde de RNA juntamente com 2µl do “*primer*” Oligo dT (10 mM) foram submetidos por 10 minutos a 70°C (anelamento do primer). Em seguida, foi adicionado uma mistura de 4 µl de 5X do tampão da enzima transcriptase reversa, 2 µl de DTT 0,1M (dietiltreitol) e 1 µl de dNTPs 10 mM (nucleotídeos trifosfatados); foram submetidos por 10 minutos a 25°C e 2 minutos a 42°C. Por último, foi acrescentado 1 µl da enzima *Super Scrip II* (transcriptase reversa) submetendo esta mistura por 50 minutos a 42°C, (obtenção do cDNA) e 10 minutos a 70°C (inativação da transcriptase reversa). As reações foram mantidas no freezer a – 20°C até uso posterior nas reações de PCR.

4.10. 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 isoforma HPA1 e para

HPA2 foi utilizado oligonucleotídeos iniciadores (Primer sense: 5' CGC CTGTTA GAC ACA CTC TCT GA 3') e reverso (Primer antisense: 5' GTC ACC ACA CCT TCA AGC CAA 3') em uma concentração de 1,0 µM. 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 é 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:

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

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

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

4.11. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram organizados e tabulados em planilhas com 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; Ilinois, USA).

Os valores obtidos pelo estudo de cada variável contínua de distribuição paramétrica foram organizados e descritos através da média e do desvio padrão, para as não paramétricas a mediana e amplitude interquartis. Para as categorizadas foram utilizadas freqüências absolutas e relativas.

Na 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 feita pelo teste de *Mann-Whitney* e entre três ou mais populações foi aplicado o teste de *Kruskall-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.

Na análise multivariada, foram utilizados os testes de razão de chances e regressões linear e logística. 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.

5. Resultados e Discussão

As características clínicas e anátomo-patológicas dos pacientes utilizados em nossos estudos estão descritas nos Anexos I a IV. É importante ser destacado que inicialmente foi realizada análises da expressão das isoformas de heparanases no plasma de quarenta e três pacientes, bem como indivíduos controle. Porém, pela grande diversidade de tipos de tumores gastrointestinais, pelo fato de algumas das amostras representarem duplicatas do mesmo paciente, isto é, amostras que foram coletadas em diferentes períodos da doença, decidiu-se resumir as análises estatísticas apenas aos pacientes com carcinomas gastrointestinais e em amostras coletadas anteriormente à cirurgia. Portanto, as amostras de plasma coletadas após cirurgia não foram consideradas nas análises estatísticas mostradas a seguir.

A Tabela V representa algumas das características dos pacientes e doadores que participaram de nossos estudos.

Tabela V. Dados descritivos dos pacientes e doadores (controle).

| | Controle | Paciente |
|------------------------------|-----------------|-----------------|
| Número de Indivíduos | 21 | 21 |
| Gênero (%) | | |
| Masculino | 77 | 60 |
| Feminino | 23 | 40 |
| Média de Idade (anos) | 60 | 67 |

Pode-se observar que existe uma prevalência em nossos estudos de indivíduos do sexo masculino em relação ao sexo feminino, tanto no grupo de pacientes como de indivíduos saudáveis (grupo controle).

O grupo de indivíduos saudáveis utilizado como controle em nossos estudos, apresentam média de idade de 60 anos (mínimo de 57 e máximo de 65

anos). Entretanto, o grupo de pacientes com carcinoma gastrointestinal apresenta uma média de idade maior, 67 anos (mínimo de 48 e máximo de 82 anos). Considerando, portanto, que existe uma diferença na média de idade entre o grupo controle e o grupo de pacientes, sendo esta uma variável a ser considerada posteriormente nas análises estatísticas

5.1. Análise das isoformas de heparanase-1 (HPA1)

A Figura 25 mostra o resultado obtido da reação de *Western Blot* utilizando plasma de um dos pacientes com carcinoma gastrointestinal e plasma de um dos indivíduos saudáveis, revelado com anticorpo policlonal anti-heparanase, HPA1 H-80. Tal anticorpo é específico para a região N-terminal (seqüência de aminoácidos entre as posições 101 e 180 da enzima heparanase-1).

Na reação foram utilizados 2 µg de proteína total de amostra de plasma humano de paciente e indivíduo saudável (controle), evidenciando reação mais intensa no plasma de paciente com carcinoma gastrointestinal, comparando-se com a reação do mesmo anticorpo no plasma de indivíduo não acometido por neoplasia (controle).

Podem ser identificadas na Figura 25 duas isoformas da heparanase-1 de aproximadamente 50 kDa e 65 kDa que foram reveladas com o anticorpo HPA1 H-80, tanto no plasma de paciente com tumor gastrointestinal e indivíduo saudável. Os mesmos resultados foram observados para os 21 pacientes com diferentes tipos de carcinomas gastrointestinais e 43 indivíduos não acometidos por neoplasia (grupo controle).

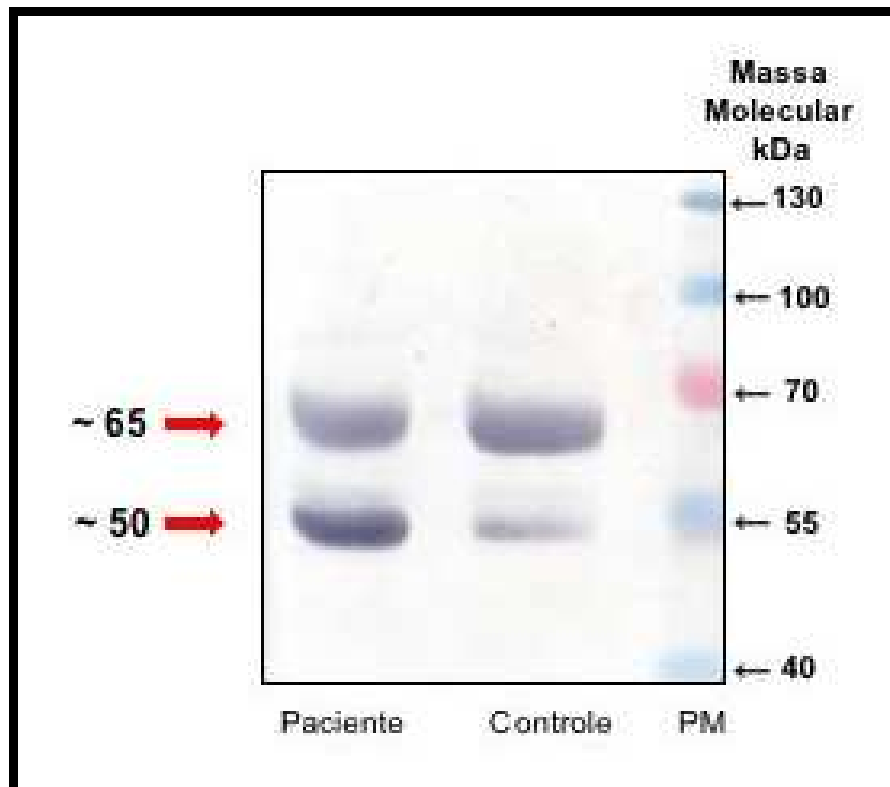


Figura 25. Western Blot de plasma humano de paciente com carcinoma gastrointestinal e indivíduo saudável. Após eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad), incubadas com anticorpo anti-HPA1 H-80 (Santa Cruz) e reveladas com peroxidase como descrito detalhadamente na metodologia. **Paciente**, 2 μ g plasma paciente APP; **Controle**, 2 μ g plasma indivíduo saudável; **PM**, padrão de massa molecular de proteínas (Fermentas).

Observa-se, claramente, um aumento expressivo da banda de 50 kDa da HPA1 no plasma do paciente comparando-se com a mesma banda no plasma do indivíduo não acometido por neoplasia (Figura 25).

É importante ser lembrado que a banda de 50 kDa da heparanase-1 corresponde à forma ativa da HPA1, evidenciando, portanto, que tal enzima encontra-se mais ativa no plasma de pacientes com câncer quando comparado ao plasma de indivíduos saudáveis.

Avaliando a expressão da isoforma HPA1 50 kDa, foi verificado que em todas as amostras de plasma de pacientes com carcinomas coletadas antes do procedimento cirúrgico ocorreu um aumento significativo na expressão de tal isoforma, quando comparado com a expressão de tal isoforma no plasma de indivíduos não acometidos por neoplasia, como podemos observar pelo *Plote de Scatter* representado na Figura 26A. Ainda, foram verificados os valores individuais da expressão de HPA1 50 kDa obtidos por densitometria na Tabela anexa (Figura 26B).

A análise dos dados revelou diferença estatística significativa ($P < 0,0001$ – teste “U” de Mann-Whitney) na expressão de HPA1 50 kDa, entre o grupo controle e pacientes com carcinomas gastrointestinais. A expressão da HPA1 50 kDa apresentou expressão de $24,35 \pm 2,34$ pixels por 2 μg proteína plasmática no grupo controle e no grupo dos pacientes $51,75 \pm 4,33$ pixels por 2 μg proteína plasmática. Portanto, a isoforma de 50 kDa da HPA1 mostrou-se significativamente mais expressa, (aproximadamente duas vezes) em pacientes com tumor gastrointestinal, quando comparada com o plasma de indivíduos sadios.

A

B

| HPA1 50 kDa | |
|---------------------|-------|
| Pacientes Controles | |
| 68,05 | 18,43 |
| 30,17 | 17,36 |

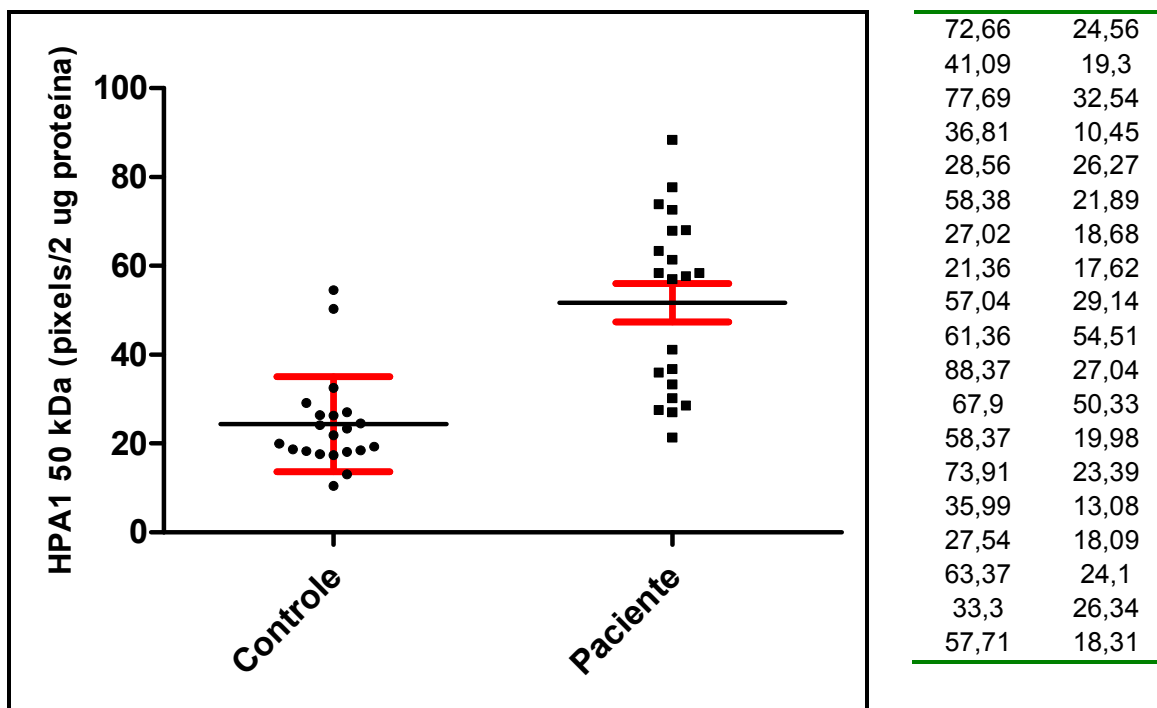


Figura 26. Expressão da heparanase-1 isoforma 50 kDa. A, os resultados mostram a expressão da HPA1 50 kDa em forma de Plote de *Scatter*. As barras indicam os valores da média \pm erro-padrão entre o grupo de pacientes portadores de câncer e o grupo controle de indivíduos saudáveis, evidenciando uma diferença de expressão significativa ($P < 0,0001$ – teste “U” de Mann-Whitney); **B,** a Tabela representa os valores individuais da expressão de HPA1 50 kDa em (pixels por 2 μ g proteína plasmática), que representam os valores obtidos por densitometria.

A Figura 27 evidencia a banda de 65 kDa revelada com o anticorpo anti-HPA1 H-80, que mostra também diferença estatisticamente significativa de expressão entre indivíduos sadios e pacientes com tumor gastrointestinal ($P = 0.002$ – teste “t” de Student). No grupo controle a HPA1 65 kDa apresentou média de expressão de $33,94 \pm 3,35$ pixels por 2 μ g proteína plasmática e no grupo dos pacientes $46,96 \pm 3,39$ pixels por 2 μ g proteína plasmática.

Foi quantificado, por densitometria, a banda de 65 kDa da HPA1 em todas as reações de *Western Blot* realizadas nas amostras de plasma de pacientes e indivíduos saudáveis. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 27A e B.

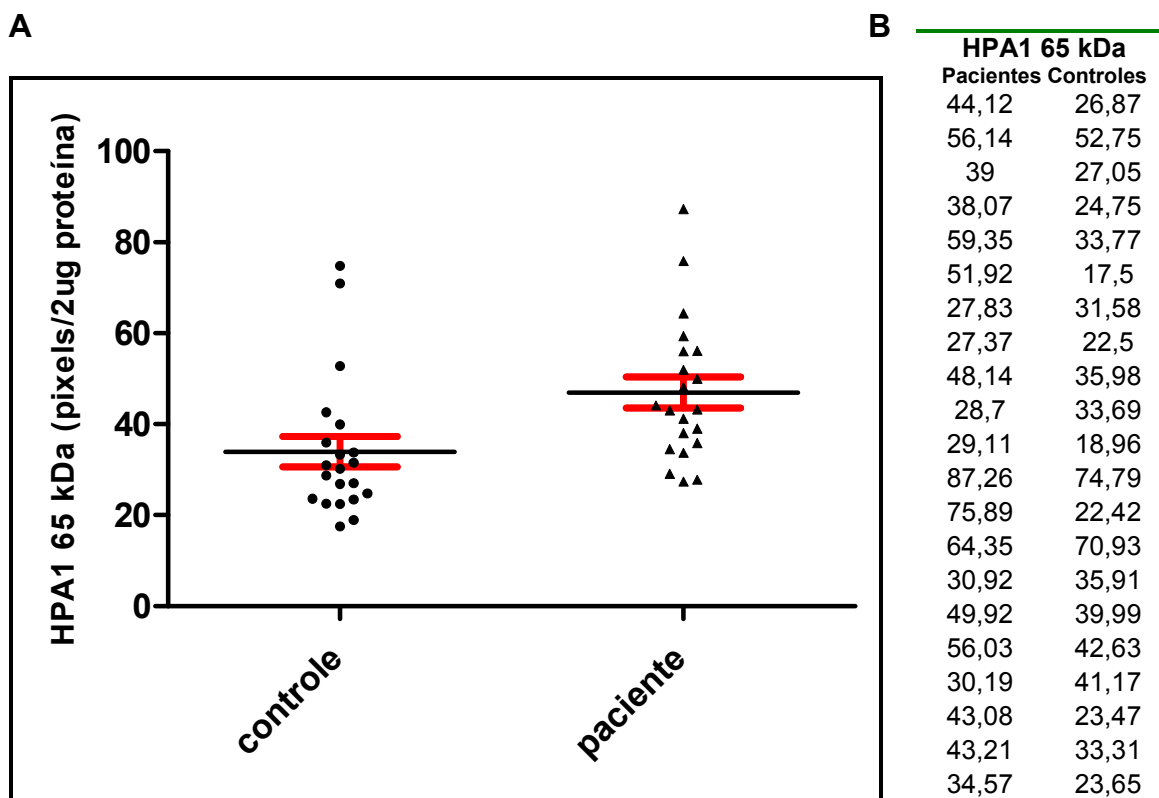


Figura 27. Expressão da heparanase-1 isoforma 65 kDa. **A**, os resultados mostram a expressão da HPA1 65 kDa em forma de Plote de *Scatter*. As barras indicam os valores da média \pm desvio-padrão entre o grupo de pacientes portadores de câncer e o grupo controle de indivíduos saudáveis, evidenciando uma diferença de expressão significativa ($P = 0,002$ – teste “t” de Student); **B**, a Tabela representa os valores individuais da expressão de HPA1 65 kDa em (pixels / 2 μ g proteína plasmática), que representam os valores obtidos por densitometria. .

Como mostrado na Introdução, dados da literatura mostram que a isoforma de 65 kDa da HPA1 corresponde à forma de pré-enzima inativa, que sofre processamento proteolítico e gera a forma ativa de 50 kDa.

Nossos resultados demonstraram que no plasma de pacientes com diferentes tipos de tumores gastrointestinais ocorre aumento significativo de ambas as isoformas da HPA1 (50 kDa e 65 kDa).

Portanto, seguindo os dados da literatura e a hipótese de processamento pós-tradução, seria esperado que se uma das isoformas aumentasse, por exemplo, a isoforma de 50 kDa, a expressão da outra diminuiria, por exemplo a isoforma de 65 kDa. Porém, não foi o que ocorreu. Sugere-se, então que outros

processamentos pós-tradução e um *turn-over* diferente de ambas isoformas possa explicar o aumento dela, isto é, o aumento da expressão de 65 kDa da HPA1 pode ser significativamente maior em pacientes com neoplasias, gerando um aumento da forma ativa de 50 kDa, por processamento pós-tradução, porém, nem toda pré-enzima sofre processamento proteolítico e por essa razão verifica-se também aumento da forma inativa de 65 kDa. Essa hipótese sugere que a velocidade de síntese da HPA1 65 kDa seja maior que a velocidade de processamento proteolítico para gerar a forma de 50 kDa.

Uma outra hipóteses que explicaria o aumento de ambas as isoformas seria o processamento por diferentes RNA mensageiros. Nesse caso, o processamento ocorreria durante a transcrição e não pós-tradução, o que explicaria perfeitamente o aumento da expressão de ambas as isoformas nos pacientes acometidos por neoplasias.

Na literatura foram identificadas bioquimicamente quatro isoformas de heparanase, utilizando-se técnicas de cromatografia de troca iônica e filtração em gela para purificação de proteínas a partir de extrato de células CHO (células de ovário de Hamster). As quatro isoformas são capazes de degradar heparan sulfato/heparina em pH que varia entre 3,5 – 6,5, sugerindo que tais enzimas ajam em endossomos/lisossomos. Três das enzimas com atividade de heparanases degradam glicosaminoglicanos livres, bem como proteoglicanos, e liberam oligossacarídeos de massas moleculares que variam entre 6 e 9 kDa (Barne, *et al.*, 1998).

Nasser e colaboradores (2005) identificaram uma isoforma de heparanase em espécies de ratos cegos do gênero *Spalax*, que possui

homologia de 85% com a enzima heparanase humana. Tal isoforma apresenta um “splicing” no exon 7, determinado a deleção de 16 aminoácidos o que resulta na perda de atividade enzimática e defeito no processamento e tráfego de tal enzima (Nasser *et al.*, 2005).

Em células COS-7 (humana) foi detectado por RT-PCR um transcrito de 1,5 kb, comparativamente menor ao transcrito de 1,7 kb inicialmente reportado para a heparanase humana. Essa variante da heparanase, expressa em células COS-7, apresenta deleção de parte do exon 5. Tal variante de heparanase em células COS-7 não perde seus sítios de glicosilação e co-imunoprecipita com calnexina, evidenciando localização no retículo endoplasmático (Sato *et al.*, 2008).

Finalmente, uma outra variante de heparanase foi identificada no anfíbio aquático africano, *Xaenopus laevis*. O cDNA da heparanase codifica 531 aminoácidos, enquanto a proteína variante de *Xaenopus laevis* perde 58 aminoácidos por conseqüente deleção do exon 4. Comparando-se a heparanase nativa e a forma variante, foi observado que ambas as enzimas localizam-se no complexo de Golgi e retículo endoplasmático; porém, a variante heparanase com perda do exon 4 não é capaz de ser secretada, permanecendo associada à membrana, perde três sítios de glicosilação e aumenta a adesão de células de glioma (Bertolesi *et al.*, 2008). Foi verificado ainda que ambas heparanases estão relacionadas com processos de desenvolvimento embrionário, envolvendo vias diferentes de sinalização (Bertolesi *et al.*, 2008).

5.2. Análise das isoformas de heparanase-2

A Figura 28 apresenta a imagem obtida por *Western Blot*, utilizando 5 µg de proteína total de plasma humano de paciente com câncer e indivíduo saudável, revelado com anticorpo anti-heparanase-2, HPA2 C-17, evidenciando a marcação mais intensa no plasma do paciente com carcinoma gastrointestinal, comparado ao plasma de paciente não acometido por neoplasia (controle).

Existem três isoformas da HPA2 de 480, 534 e 592 aminoácidos, respectivamente HPA2a, HPA2b, HPA2c. As análises dessas proteínas evidenciam que todas essas isoformas são proteínas intracelulares, associadas à membrana, contendo a porção C-terminal voltada para o citoplasma e não possuem atividade enzimática. O anticorpo policlonal HPA2 C-17 é capaz de identificar as três isoformas da heparanase-2.

Foi verificado um aumento expressivo das três principais bandas da HPA2 no plasma do paciente com carcinoma gastrointestinal, quando comparado com o plasma do indivíduo saudável (Figura 28), evidenciando as isoformas de tal proteína, já descritas na literatura.

O mesmo resultado se repetiu no plasma dos 21 pacientes e 43 indivíduos não acometidos por neoplasia, demonstrando que a HPA2 encontra-se aumentada no plasma de pacientes com carcinomas gastrointestinais.

Pode-se também identificar a revelação bem menos intensa de bandas com massas moleculares acima de 70 kDa. Como tal revelação se mostrou menos intensa, comparativamente às três bandas descritas na literatura, não houve interesse em quantificá-las. Tais bandas podem corresponder a isoformas ou reação inespecífica do anticorpo anti-HPA2 C-17.

A quantificação das três bandas da HPA2 em cada ensaio de *Western Blot* foi realizada por densitometria, como descrito na metodologia e o resultado encontra-se na Figura 29.

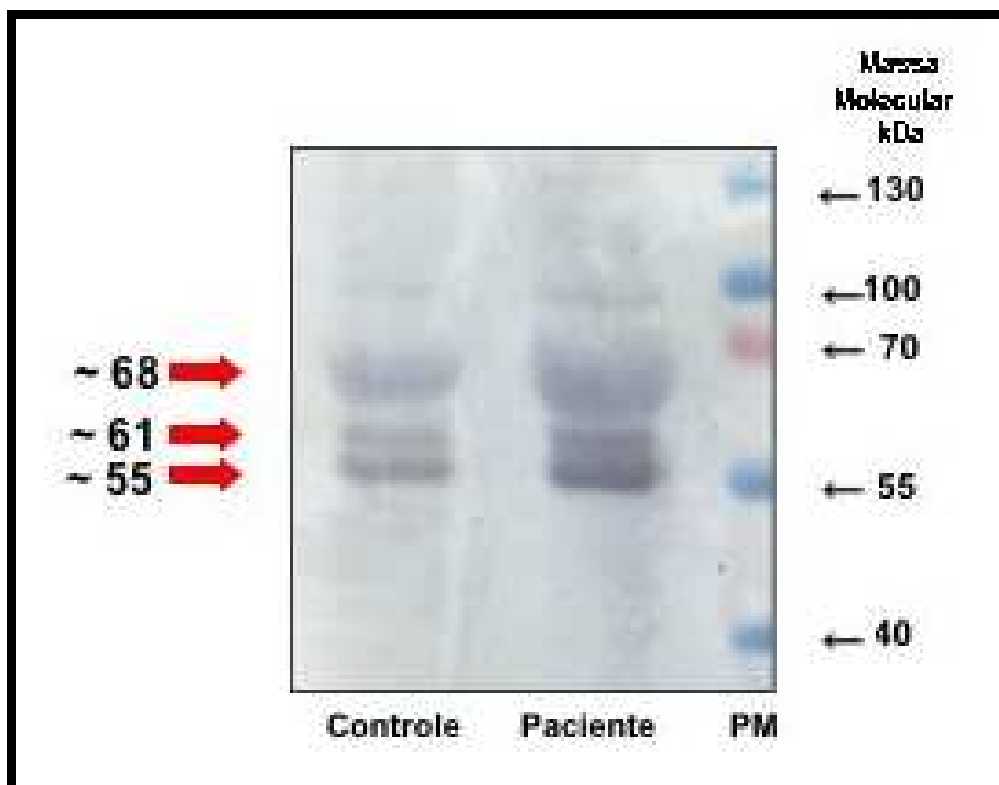


Figura 28. *Western Blot* de plasma humano de paciente com carcinoma gastrointestinal e indivíduo saudável. Após eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad), incubadas com anticorpo anti-HPA2 C-17 (Santa Cruz) e reveladas com peroxidase como descrito detalhadamente na metodologia. **Controle**, 5 μ g plasma paciente APP; **Paciente**, 5 μ g plasma indivíduo saudável; **PM**, padrão de massa molecular de proteínas.

A análise da quantificação das isoformas de HPA2 no plasma evidenciou diferença estatística significativa ($P < 0,0001$ – teste “*t*” de Student) entre indivíduos sadios (controle) e pacientes com diferentes tipos de carcinomas gastrointestinais (Figura 29A e B). No grupo controle a média de expressão das isoformas de HPA2 foi de $133,8 \pm 11,70$ pixels por 5 μ g proteína plasmática e no

grupo dos pacientes com carcinoma $199,9 \pm 12,75$ pixels por 5 μg proteína plasmática.

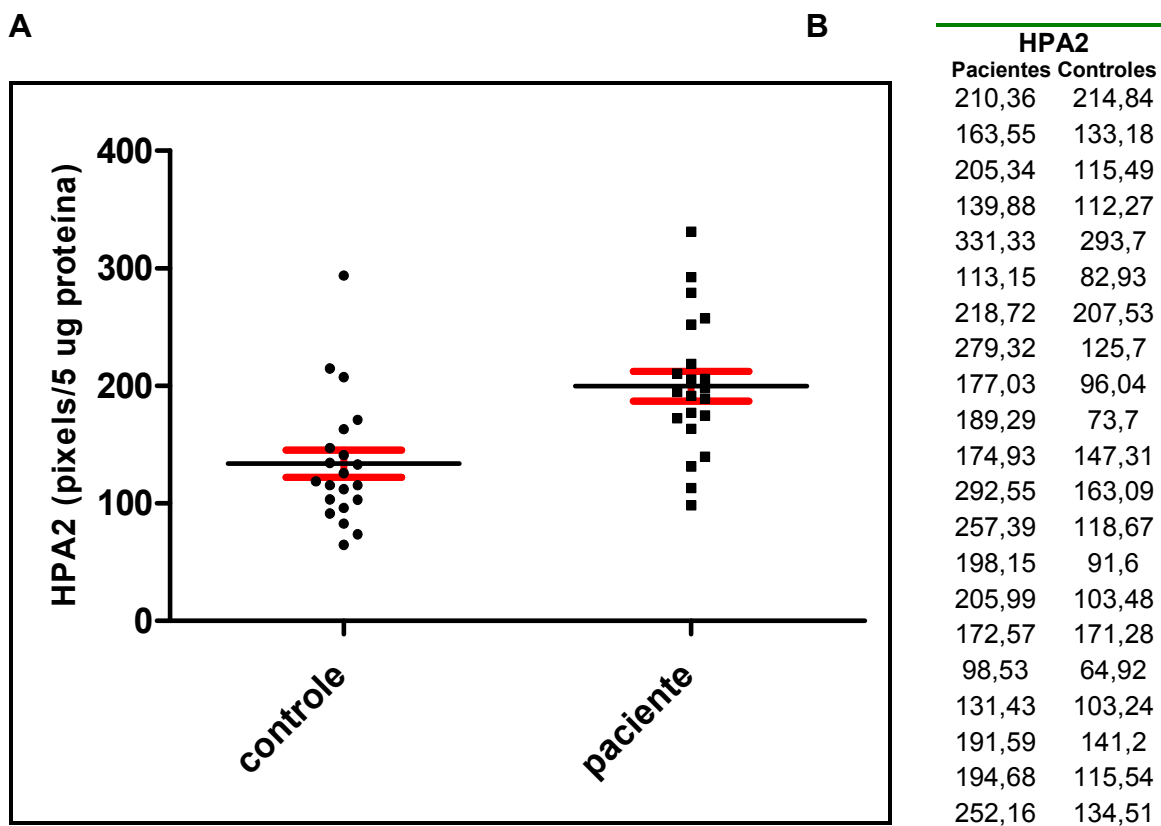


Figura 29. Expressão da heparanase-2. **A**, os resultados mostram a expressão da HPA2 em forma de Plote de *Scatter*. As barras indicam os valores da média \pm desvio-padrão entre o grupo de pacientes portadores de câncer e o grupo controle de indivíduos saudáveis, evidenciando uma diferença de expressão significativa ($P < 0,0001$ – teste “t” de Student); **B**, a Tabela representa os valores individuais da expressão de HPA2 em (pixels por 5 μg proteína plasmática), que representam os valores obtidos por densitometria.

A Tabela VI resume os resultados de expressão das heparanases (HPA1 e HPA2), obtidos por quantificação nos ensaios de *Western Blot*.

Na análise univariada, a correlação entre o aumento da expressão das heparanases com a média de idade representou um viés de nosso estudo, visto que os pacientes com carcinoma possuem idade mais avançada e também apresentam maior expressão de todas as isoformas de heparanases (HPA1 50 kDa: $R = 0,658$ e $P < 0,0001$; HPA1 65 kDa: $R = 0,380$ e $P = 0,002$ e HPA2: $R = 0,345$ e $P = 0,005$ – correlação de Pearson).

Tabela VI. Análise quantitativa de HPA1 e HPA2

| Isoformas da heparanase | Grupo | Amostras | Média | Desvio-Padrão | P |
|--------------------------------|----------|----------|-------|---------------|----------|
| Heparanase-1 50 kDa | Paciente | 21 | 51,75 | 4,33 | <0,0001* |
| | Controle | 21 | 24,35 | 2,34 | |
| Heparanase-1 65 kDa | Paciente | 21 | 46,96 | 3,39 | 0,002** |
| | Controle | 21 | 33,94 | 3,35 | |
| Heparanase-2 | Paciente | 21 | 199,9 | 12,8 | <0,005** |
| | Controle | 21 | 133,8 | 11,7 | |

Amostras: números de amostras analisadas

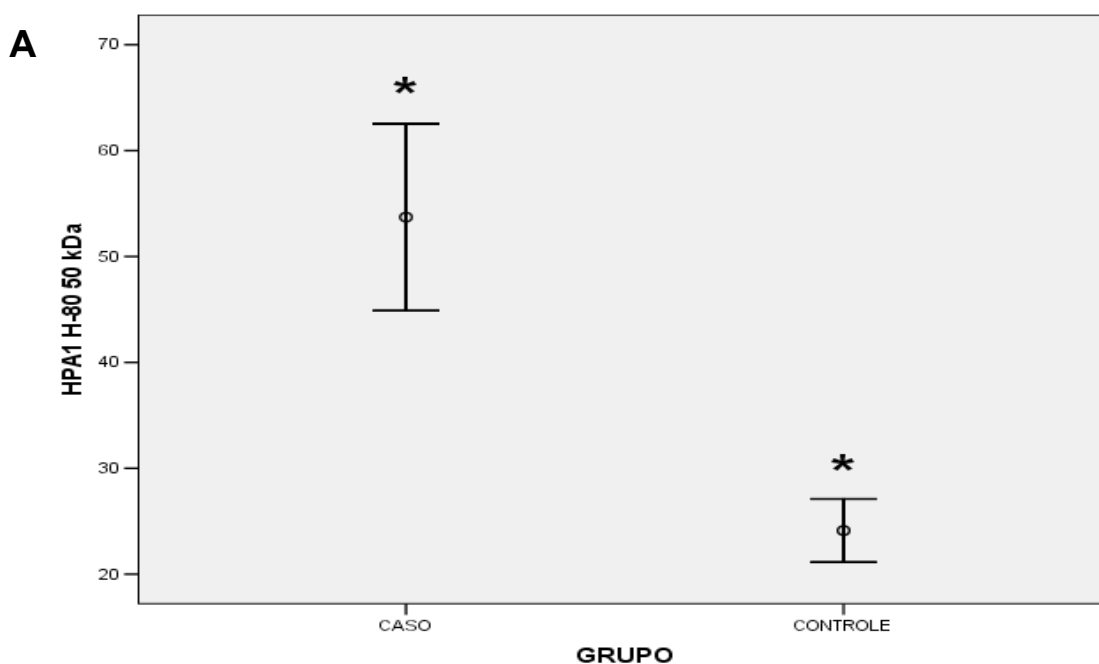
P: significância

* teste "U" de Mann-Whitney

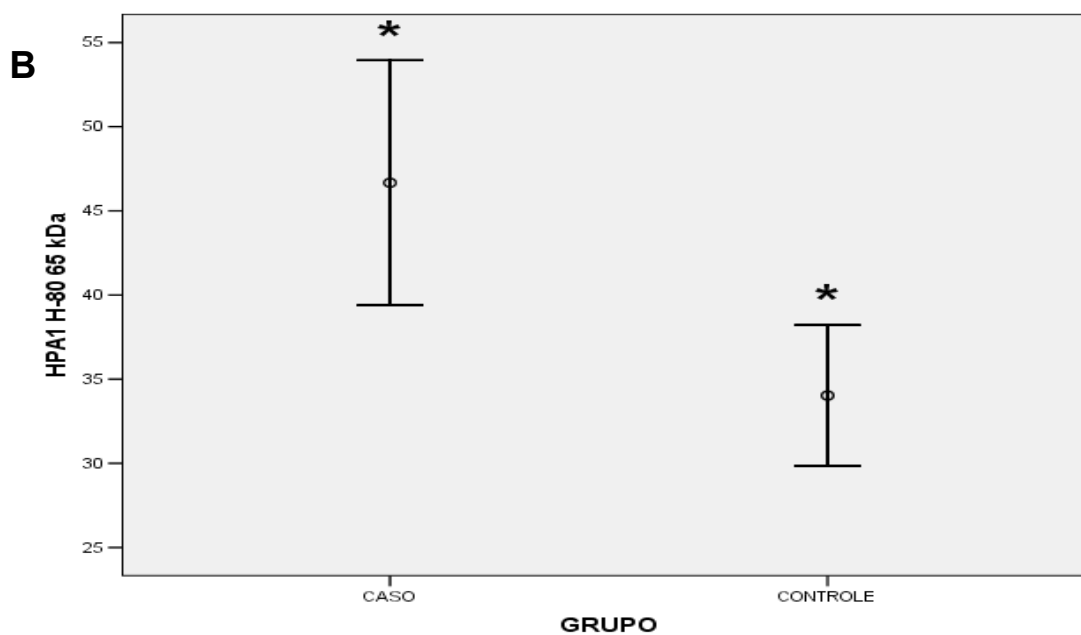
** teste "t" de Student

A análise estatística multivariada demonstrou claramente, por regressão logística, que a variável idade não é variável independente de aumento da expressão de nenhuma das isoformas de heparanases (regresso logística: HPA1 50 kDa: $P < 0,0001$; HPA1 65 kDa: $P = 0,002$ e HPA2: $P < 0,0001$), sem que a variável idade interfira nesse fenômeno (HPA1 50 kDa: $P = 0,270$; HPA1 65 kDa: $P = 0,218$ e HPA2: $P = 0,717$).

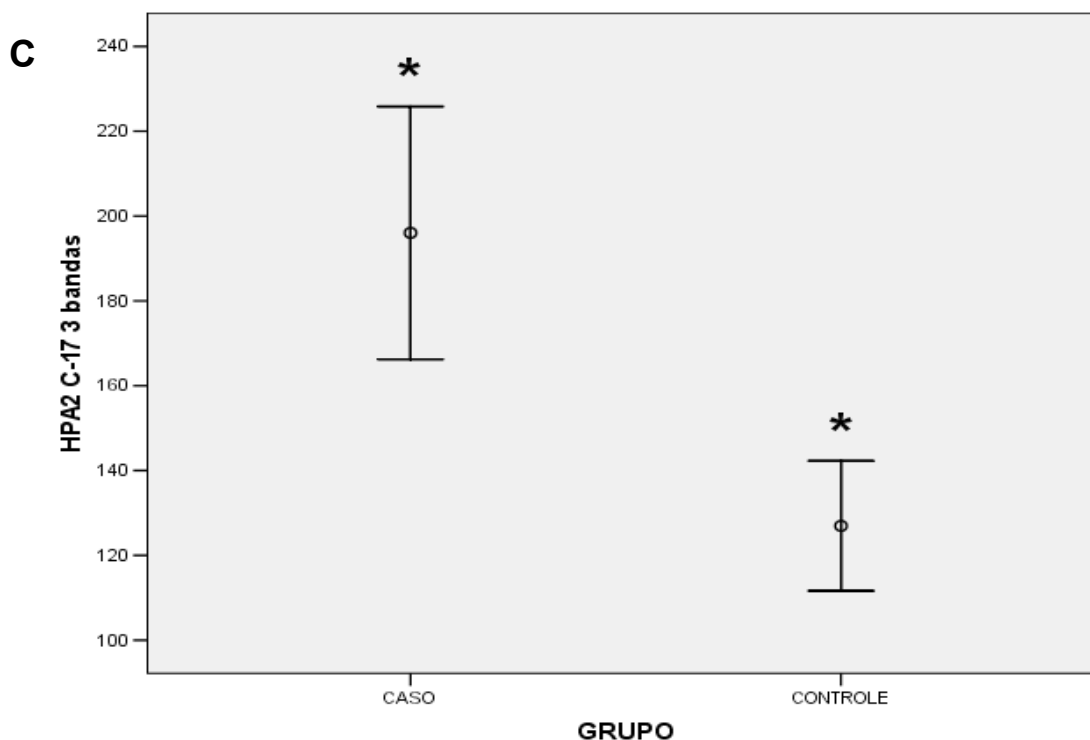
Os gráficos representados a seguir, na Figura 30, evidenciam claramente as diferenças significativas de expressão das heparanases no plasma de indivíduos saudáveis e acometidos por neoplasias, mostrando as médias e desvios padrão, evidenciando as diferenças significativas da expressão independente da variável idade.



*diferença estatisticamente significativa $P < 0,0001$ (teste "U" de Mann-Whitney).



*diferença estatisticamente significante $P = 0,002$ (teste "t" de Student).



*diferença estatisticamente significativa $P < 0,0001$ ((teste "t" de Student).

Figura 30. Expressão das isoformas de heparanase. (A) Expressão da HPA1 50 kDa (pixels por 2 µg proteína; *diferença estatisticamente significativa $P < 0,0001$ – regressão logística); (B) expressão da HPA1 65 kDa (pixels por 2 µg proteína; *diferença estatisticamente significativa $P = 0,002$ – regressão logística); (C) expressão da HPA2 C-17 (pixels por 5 µg proteína; *diferença estatisticamente significativa $P < 0,0001$ – regressão logística). CASO, pacientes com tumores gastrointestinais; CONTROLE, indivíduos saudáveis.

Ainda, análises estatísticas revelaram que não existe diferença significativa entre a expressão das isoformas HPA1 50 kDa, HPA1 65 kDa e HPA2 com grau de diferenciação tumoral, metástases, sobrevivência do paciente, invasão vascular, invasão linfática e infiltração perineural.

Foi realizado RT-PCR quantitativo para uma análise mais precisa da expressão das isoformas de heparanase-1 e heparanase-2 na fração mononuclear do sangue periférico de pacientes com carcinoma gastrointestinal.

Foi utilizada a fração mononuclear a partir do sangue periférico coletado de sete pacientes com carcinoma gastrointestinal e três indivíduos não

acometidos por neoplasias para verificar a expressão das HPA1 e HPA2 utilizando reações de RT-PCR em tempo real.

Os Anexos V e VI representam os resultados obtidos das reações de amplificação em tempo real para quantificação das HPA1 e HPA2.

A Figura 31 mostra a expressão de aproximadamente seis vezes aumentada da HPA1 na fração mononuclear de pacientes com carcinomas gastrointestinais comparando-se com indivíduos saudáveis. Os pacientes que apresentam carcinomas gastrointestinais apresentam uma média relativa de expressão da HPA1 de 5,7, enquanto indivíduos saudáveis apresentam valor médio de expressão relativa de 0,32.

A expressão da HPA2 também encontra-se três vezes aumentada na fração mononuclear de pacientes com carcinomas gastrointestinais comparativamente ao grupo controle (Figura 32).

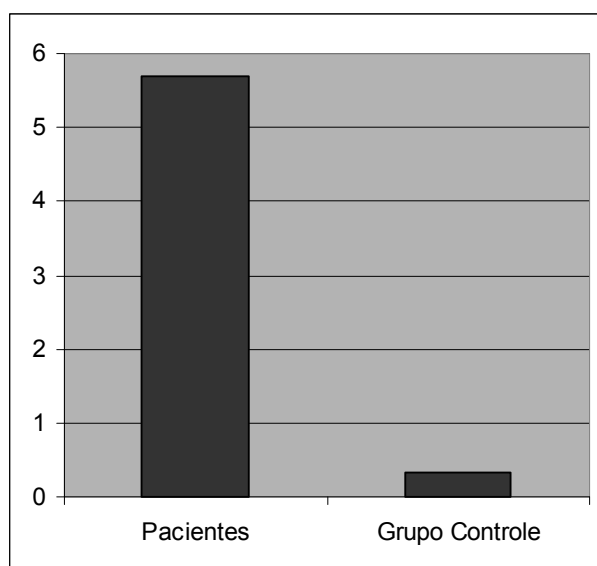


Figura 31A. Expressão em Tempo Real da HPA1. Os ensaios foram realizados utilizando RNA obtido da fração mononuclear de pacientes com carcinomas gastrointestinais (sete) e indivíduos não acometidos por neoplasia (três), como indica a metodologia. Os valores relativos foram calculados como descrito na metodologia. Média da expressão relativa de HPA1 de pacientes com câncer gastrointestinal em relação ao grupo controle;

O valor médio de expressão relativa da HPA2 na fração mononuclear de pacientes com carcinomas gastrointestinais é de 3,3 e de indivíduos não acometidos por neoplasias 0,91.

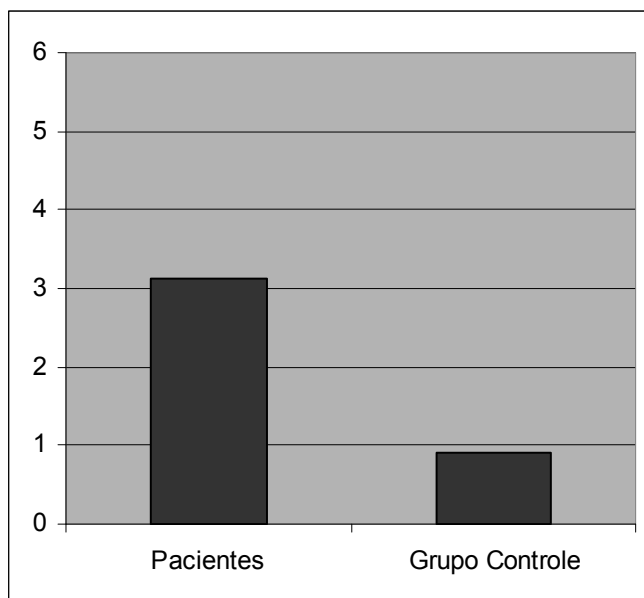


Figura 31B. Expressão em Tempo Real da HPA2. Os ensaios foram realizados utilizando RNA obtido da fração mononuclear de pacientes com carcinomas gastrointestinais (sete) e indivíduos não acometidos por neoplasia (três), como indica a metodologia. Os valores relativos foram calculados como descrito anteriormente. Média da expressão relativa de HPA2 de pacientes com câncer gastrointestinal em relação ao grupo controle.

Nas análises quantitativas realizadas por tempo real, mostrada na Figura 31, pode-se observar que existe variação significativa entre a expressão dos pacientes com carcinomas gastrointestinais e o grupo controle, tanto para HPA1, quanto para HPA2.

Os resultados preliminares obtidos por análises da expressão das HPA1 e HPA2 na fração mononuclear por tempo real corroboram os dados obtidos nas análises de *Western Blot* obtidas do plasma de pacientes com carcinoma gastrointestinal.

O desenvolvimento de novas alternativas para o diagnóstico e/ou prognóstico do câncer requer uma maior compreensão dos mecanismos

moleculares que descubram alvos eficientes. Sabidamente tais alvos participam de processos essenciais para o sucesso do clone celular metastático como a angiogênese e a ação de vários fatores de crescimento epiteliais, que são responsáveis por alterações da matriz extracelular, promover a invasão do tumor e perda dos mecanismos de regulação normal da proliferação celular. Portanto, a investigação de tais marcadores tumorais que participem do desenvolvimento do câncer e remodelamento da matriz extracelular é de suma importância, sendo a heparanase um dos candidatos com tais características moleculares.

Ainda, é importante ser observado que foi utilizado nesse trabalho um procedimento não invasivo para o diagnóstico de tal alteração, visto que foi verificado as expressões das enzimas por análises do plasma dos pacientes e essa é uma vantagem bastante significativa na investigação de novos marcadores de diagnóstico do câncer.

Análises realizadas por tempo real utilizando-se da fração mononuclear confirmaram os dados obtidos nos ensaios de *Western blot*.

Portanto, em nossos estudos apresentamos duas alternativas de investigação de alterações observadas no plasma e fração mononuclear de pacientes com carcinomas gastrointestinais que revelam potenciais futuros de aplicações para diagnóstico de carcinomas gastrointestinais, principalmente por se apresentarem como testes não invasivos e de fácil utilização como rotina.

6. CONCLUSÕES

1. As isoformas da heparanase-1 (HPA1 50 kDa e HPA1 65 kDa) encontram-se significativamente aumentadas no plasma de pacientes com carcinoma gastrointestinal, comparando-se com indivíduos não acometidos por neoplasia.
2. As isoformas da heparanase-2 (HPA2) também encontram-se significativamente aumentadas no plasma de pacientes com carcinoma gastrointestinal, comparando-se com indivíduos não acometidos por neoplasia
3. Os resultados sugerem que possam existir isoformas da heparanase-1.
4. Não foi observado correlação entre expressão da heparanase no plasma dos pacientes e parâmetros clínicos como metástases, sobrevivência do paciente, invasão vascular ou linfática, grau de diferenciação do carcinoma gastrointestinal ou infiltração pleural.
5. Os resultados obtidos por análises do plasma de pacientes, realizadas por *Western Blot*, utilizando anticorpos específicos anti-HPA1 e anti-HPA2, corroboraram os ensaios preliminares obtidos por RT-PCR quantitativo.

Referências Bibliográfica

- Al-Quran, S. Z.L. YangJ. M. MagillR. C. BraylanV. K. Douglas-Nikitin (2007). "Assessment of bone marrow plasma cell infiltrates in multiple myeloma: the added value of CD138 immunohistochemistry." Hum Pathol **38**(12): 1779-87.
- Almeida, P. C.I. L. NantesJ. R. ChagasC. C. RizziA. Faljoni-AlarioE. CarmonaL. JulianoH. B. NaderI. L. Tersariol (2001). "Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation." J Biol Chem **276**(2): 944-51.
- Aota, S.T. NagaiK. OldenS. K. AkiyamaK. M. Yamada (1991). "Fibronectin and integrins in cell adhesion and migration." Biochem Soc Trans **19**(4): 830-5.
- Armstrong, P. B. and M. T. Armstrong (2000). "Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role for fibronectin." Biochim Biophys Acta **1470**(2): O9-20.
- Avraham, S.R. L. StevensC. F. NicodemusM. C. GartnerK. F. AustenJ. H. Weis (1989). "Molecular cloning of a cDNA that encodes the peptide core of a mouse mast cell secretory granule proteoglycan and comparison with the analogous rat and human cDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3763-7.
- Baker, E.J. CrawfordG. R. SutherlandC. FreemanC. R. ParishM. D. Hulett (1999). "Human HPA endoglycosidase heparanase. Map position 4q21.3." Chromosome Res **7**(4): 319.
- Bame, K. J.A. HassallC. SandersonI. VenkatesanC. Sun (1998). "Partial purification of heparanase activities in Chinese hamster ovary cells: evidence for multiple intracellular heparanases." Biochem J **336** (Pt 1): 191-200.
- Barbareschi, M.P. MaisonneuveD. AldoviniM. G. CangilL. PecciariniF. Angelo MauriS. VeroneseO. CaffoA. LucentiP. D. PalmaE. GalligioniC. Doglioni (2003). "High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis." Cancer **98**(3): 474-83.
- Basset, P.A. OkadaM. P. ChenardR. KannanI. StollP. AnglardJ. P. BellocqM. C. Rio (1997). "Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications." Matrix Biol **15**(8-9): 535-41.
- Bauer, E. P.J. E. LeDouxK. Nader (2001). "Fear conditioning and LTP in the lateral amygdala are sensitive to the same stimulus contingencies." Nat Neurosci **4**(7): 687-8.

- Beauvais, D. M.B. J. BurbachA. C. Rapraeger (2004). "The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells." J Cell Biol **167**(1): 171-81.
- Bernard, D.B. MehulC. DelattreL. SimonettiA. Thomas-CollignonR. Schmidt (2001). "Purification and characterization of the endoglycosidase heparanase 1 from human plantar stratum corneum: a key enzyme in epidermal physiology?" J Invest Dermatol **117**(5): 1266-73.
- Bernfield, M.M. GotteP. W. ParkO. ReizesM. L. FitzgeraldJ. LincecumM. Zako (1999). "Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans." Annu Rev Biochem **68**: 729-77.
- Berto, A. G.L. O. SampaioC. R. FrancoR. M. Cesar, Jr.Y. M. Michelacci (2003). "A comparative analysis of structure and spatial distribution of decorin in human leiomyoma and normal myometrium." Biochim Biophys Acta **1619**(1): 98-112.
- Bertolesi, G. E.G. MichaielS. McFarlane (2008). "Two heparanase splicing variants with distinct properties are necessary in early Xenopus development." J Biol Chem **283**(23): 16004-16.
- Bissell, M. J.P. A. KennyD. C. Radisky (2005). "Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **70**: 343-56.
- Bozzetti, F. (1978). "Parenteral hyperalimentation in patients with gastrointestinal cancer." Tumori **64**(4): 407-18.
- Bradley, B. A. and B. M. Evers (1997). "Molecular advances in the etiology and treatment of colorectal cancer." Surg Oncol **6**(3): 143-56.
- Bright-Thomas, R. M. and R. Hargest (2003). "APC, beta-Catenin and hTCF-4; an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer." Eur J Surg Oncol **29**(2): 107-17.
- Busby, T. F.W. S. ArgravesS. A. Brewl. PechikG. L. GillilandK. C. Ingham (1995). "Heparin binding by fibronectin module III-13 involves six discontinuous basic residues brought together to form a cationic cradle." J Biol Chem **270**(31): 18558-62.
- Campbell, R. J. and M. Pignatelli (2002). "Molecular histology in the study of solid tumours." Mol Pathol **55**(2): 80-2.
- Carey, D. J.D. M. EvansR. C. StahlV. K. AsundiK. J. ConnerP. GarbesG. Cizmeci-Smith (1992). "Molecular cloning and characterization of N-syndecan, a novel transmembrane heparan sulfate proteoglycan." J Cell Biol **117**(1): 191-201.

- Castillo, C. J.P. Colburn V. Buonassisi (1987). "Characterization and N-terminal sequence of a heparan sulphate proteoglycan synthesized by endothelial cells in culture." Biochem J **247**(3): 687-93.
- Colburn, P. and V. Buonassisi (1982). "Anti-clotting activity of endothelial cell cultures and heparan sulfate proteoglycans." Biochem Biophys Res Commun **104**(1): 220-7.
- Colognato, H. and P. D. Yurchenco (2000). "Form and function: the laminin family of heterotrimers." Dev Dyn **218**(2): 213-34.
- Conejo, J. R.J. Kleeff A. Koliopanos K. Matsuda Z. W. Zhu H. Goecke N. Bicheng A. Zimmermann M. Korc H. Friess M. W. Buchler (2000). "Syndecan-1 expression is up-regulated in pancreatic but not in other gastrointestinal cancers." Int J Cancer **88**(1): 12-20.
- Couchman, G. M.R. Bentley M. S. Tsao K. Raszmann J. A. McLachlan D. K. Walmer (1997). "p53lyn and p56lyn: a new signaling pathway in human endometrium and endometrial adenocarcinomas." J Soc Gynecol Investig **4**(2): 103-9.
- Couchman, J. R.D. R. Abrahamson K. J. McCarthy (1993). "Basement membrane proteoglycans and development." Kidney Int **43**(1): 79-84.
- Cox, G. and K. J. O'Byrne (2001). "Matrix metalloproteinases and cancer." Anticancer Res **21**(6B): 4207-19.
- Crawford, B. E.S. K. Olson J. D. Esko M. A. Pinhal (2001). "Cloning, Golgi localization, and enzyme activity of the full-length heparin/heparan sulfate-glucuronic acid C5-epimerase." J Biol Chem **276**(24): 21538-43.
- Czyzewska, J.K. Guzinska-Ustymowicz A. Kemonar. Bandurski (2008). "The expression of matrix metalloproteinase 9 and cathepsin B in gastric carcinoma is associated with lymph node metastasis, but not with postoperative survival." Folia Histochem Cytobiol **46**(1): 57-64.
- Dahl, L.J. J. Hopwood U. B. Laurent K. Lilja A. Tengblad (1983). "The concentration of hyaluronate in amniotic fluid." Biochem Med **30**(3): 280-3.
- De Klerk, D. P.D. V. Lee H. J. Human (1984). "Glycosaminoglycans of human prostatic cancer." J Urol **131**(5): 1008-12.
- Debruyne, P.S. Vermeulen M. Mareel (1999). "The role of the E-cadherin/catenin complex in gastrointestinal cancer." Acta Gastroenterol Belg **62**(4): 393-402.
- Delacoux, F.A. Fichard C. Geourjon R. Garrone F. Ruggiero (1998). "Molecular features of the collagen V heparin binding site." J Biol Chem **273**(24): 15069-76.

- Dietrich, C. P. (1984). "A model for cell-cell recognition and control of cell growth mediated by sulfated glycosaminoglycans." Braz J Med Biol Res **17**(1): 5-15.
- Dietrich, C. P. and H. A. Armelin (1978). "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**(3): 794-801.
- Dietrich, C. P.J. R. MartinsL. O. SampaioH. B. Nader (1993). "Anomalous structure of urinary chondroitin sulfate from cancer patients. A potential new marker for diagnosis of neoplasias." Lab Invest **68**(4): 439-45.
- Dietrich, C. P.N. M. McDuffieL. O. Sampaio (1977a). "Identification of acidic mucopolysaccharides by agarose gel electrophoresis." J Chromatogr **130**: 299-304.
- Dietrich, C. P. and H. B. Nader (1974). "Fractionation and properties of four heparitin sulfates from beef lung tissue. Isolation and partial characterization of a homogeneous species of heparitin sulfate." Biochim Biophys Acta **343**(1): 34-44.
- Dietrich, C. P.H. B. NaderA. H. Straus (1983). "Structural differences of heparan sulfates according to the tissue and species of origin." Biochem Biophys Res Commun **111**(3): 865-71.
- Dietrich, C. P.L. O. SampaioH. Montes de OcaH. B. Nader (1980). "Role of sulfated mucopolysaccharides in cell recognition and neoplastic transformation." An Acad Bras Cienc **52**(1): 179-86.
- Dietrich, C. P.L. O. SampaioO. M. ToledoC. M. Cassaro (1977b). "Cell recognition and adhesiveness: a possible biological role for the sulfated mucopolysaccharides." Biochem Biophys Res Commun **75**(2): 329-36.
- Dietrich, C. P.I. L. TersarioL. TomaC. T. MoraesM. A. PorcionattoF. W. OliveiraH. B. Nader (1998). "Structure of heparan sulfate: identification of variable and constant oligosaccharide domains in eight heparan sulfates of different origins." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **44**(3): 417-29.
- Dong, J.A. K. KukulaM. ToyoshimaM. Nakajima (2000). "Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene." Gene **253**(2): 171-8.
- Edovitsky, E.M. ElkinE. ZchariaT. PeretzI. Vlodaysky (2004). "Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis." J Natl Cancer Inst **96**(16): 1219-30.
- Edwards, I. J.H. SunY. Hul. M. BerquinJ. T. O'FlahertyJ. M. ClineL. L. RudelY. Q. Chen (2008). "In vivo and in vitro regulation of syndecan 1 in prostate cells by n-3 polyunsaturated fatty acids." J Biol Chem **283**(26): 18441-9.

- Elkin, M.I. Cohen E. Zcharia A. Orgel Z. Guatta-Rangini T. Peretz I. Vlodavsky H. K. Kleinman (2003). "Regulation of heparanase gene expression by estrogen in breast cancer." Cancer Res **63**(24): 8821-6.
- Esko, J. D. and L. Zhang (1996). "Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly." Curr Opin Struct Biol **6**(5): 663-70.
- Faham, S.R. J. Linhardt D. C. Rees (1998). "Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions." Curr Opin Struct Biol **8**(5): 578-86.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Filla, M. S.G. David R. N. Weinreb P. L. Kaufman D. M. Peters (2004). "Distribution of syndecans 1-4 within the anterior segment of the human eye: expression of a variant syndecan-3 and matrix-associated syndecan-2." Exp Eye Res **79**(1): 61-74.
- Franco, C. R.H. A. Rocha E. S. Trindade I. A. Santos E. L. Leite S. S. Veiga H. B. Nader C. P. Dietrich (2001). "Heparan sulfate and control of cell division: adhesion and proliferation of mutant CHO-745 cells lacking xylosyl transferase." Braz J Med Biol Res **34**(8): 971-5.
- Freeman, C. and C. R. Parish (1998). "Human platelet heparanase: purification, characterization and catalytic activity." Biochem J **330** (Pt 3): 1341-50.
- Friedmann, Y.I. Vlodavsky H. Aingorn A. Aviv T. Peretz I. Pecker O. Pappo (2000). "Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis." Am J Pathol **157**(4): 1167-75.
- Fritz, P.B. Sperker T. E. Murdter M. Spath P. Schwarzmant H. K. Kroemer M. Eichelbaum K. T. Kivisto (1999). "Quantitative immunohistochemical analysis of the glutathione S-transferase GSTM1: in situ phenotyping in archival material." Xenobiotica **29**(7): 693-702.
- Gibson, P. R.J. R. Fraser J. C. Colman P. A. Jones G. Jennings F. J. Dudley (1993). "Change in serum hyaluronan: a simple index of short-term drug-induced changes in hepatic sinusoidal perfusion." Gastroenterology **105**(2): 470-4.
- Gilat, D.R. Hershkovitz I. Goldkorn L. Cahalon G. Korner I. Vlodavsky O. Lider (1995). "Molecular behavior adapts to context: heparanase functions as an extracellular matrix-degrading enzyme or as a T cell adhesion molecule, depending on the local pH." J Exp Med **181**(5): 1929-34.
- Gingis-Velitski, S.A. Zetser V. Kaplan O. Ben-Zaken E. Cohen F. Levy-Adam Y. Bashenko M. Y. Flugelman I. Vlodavsky N. Ilan (2004). "Heparanase uptake is mediated by cell membrane heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem **279**(42): 44084-92.

- Goldshmidt, O.E. ZchariaR. AbramovitchS. MetzgerH. AingornY. FriedmannV. SchirmmacherE. Mitranil. Vlodavsky (2002). "Cell surface expression and secretion of heparanase markedly promote tumor angiogenesis and metastasis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 10031-6.
- Goldshmidt, O.E. ZchariaM. CohenH. AingornI. CohenL. NadavB. Z. KatzB. GeigerI. Vlodavsky (2003). "Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity." FASEB J **17**(9): 1015-25.
- Hardingham, T. E. and A. J. Fosang (1992). "Proteoglycans: many forms and many functions." FASEB J **6**(3): 861-70.
- Horowitz, A.E. TkachenkoM. Simons (2002). "Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4." J Cell Biol **157**(4): 715-25.
- Huang, C. L. and H. E. Ives (1987). "Growth inhibition by protein kinase C late in mitogenesis." Nature **329**(6142): 849-50.
- Hulett, M. D.C. FreemanB. J. HamdorfR. T. BakerM. J. HarrisC. R. Parish (1999). "Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis." Nat Med **5**(7): 803-9.
- Iozzo, R. V. (1998). "Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function." Annu Rev Biochem **67**: 609-52.
- Iozzo, R. V. and J. D. San Antonio (2001). "Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena." J Clin Invest **108**(3): 349-55.
- Jeanloz, R. W. (1960). "[Chemical structure of the polysaccharides of connective tissue (mucopolysaccharides).]" Bull Soc Chim Biol (Paris) **42**: 1829-31.
- Johnsen, M.L. R. LundJ. RomerK. AlmholtK. Dano (1998). "Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation." Curr Opin Cell Biol **10**(5): 667-71.
- Jorpes, J. E. and S. Gardell (1948). "On heparin monosulfuric acid." J Biol Chem **176**(1): 267-76.
- Kaksonen, M.I. PavlovV. VoikarS. E. LauriA. HienolaR. Riekkim. LaksoT. TairaH. Rauvala (2002). "Syndecan-3-deficient mice exhibit enhanced LTP and impaired hippocampus-dependent memory." Mol Cell Neurosci **21**(1): 158-72.
- Kiviniemi, J.M. Kallajokil. KujalaM. T. MatikainenK. AlanenM. JalkanenM. Salmivirta (2004). "Altered expression of syndecan-1 in prostate cancer." APMIS **112**(2): 89-97.
- Kjellen, L.I. PetterssonP. LillhagerM. L. SteenU. PetterssonP. LehtonenT. KarlssonE. RuoslahtiL. Hellman (1989). "Primary structure of a mouse mastocytoma proteoglycan core protein." Biochem J **263**(1): 105-13.

- Klein, U. and K. Von Figura (1976). "Partial purification and characterization of heparan sulfate specific endoglucuronidase." Biochem Biophys Res Commun **73**(3): 569-76.
- Knudson, C. B. and W. Knudson (2001). "Cartilage proteoglycans." Semin Cell Dev Biol **12**(2): 69-78.
- Kojima, T.N. W. Shworak R. D. Rosenberg (1992). "Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line." J Biol Chem **267**(7): 4870-7.
- Kraemer, P. M. (1971). "Heparan sulfates of cultured cells. II. Acid-soluble and -precipitable species of different cell lines." Biochemistry **10**(8): 1445-51.
- Kusche, M. and U. Lindahl (1990). "Biosynthesis of heparin. O-sulfation of D-glucuronic acid units." J Biol Chem **265**(26): 15403-9.
- Langenbach, K. J. and J. Sottile (1999). "Identification of protein-disulfide isomerase activity in fibronectin." J Biol Chem **274**(11): 7032-8.
- Leon, W.L. H. Strugl. D. Brickman (1971). "Carcinoma of the esophagus. A disaster." Ann Thorac Surg **11**(6): 583-92.
- Levy-Adam, F.G. Abboud-Jarrou M. Guerrini D. Beccatil. Vlodavsky N. Ilan (2005). "Identification and characterization of heparin/heparan sulfate binding domains of the endoglycosidase heparanase." J Biol Chem **280**(21): 20457-66.
- Limper, A. H. and J. Roman (1992). "Fibronectin. A versatile matrix protein with roles in thoracic development, repair and infection." Chest **101**(6): 1663-73.
- Lind, T.U. Lindahl K. Lidholt (1993). "Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. Identification of a 70-kDa protein catalyzing both the D-glucuronosyl- and the N-acetyl-D-glucosaminyltransferase reactions." J Biol Chem **268**(28): 20705-8.
- Lindahl, U.K. Lidholt D. Spillmann L. Kjellen (1994). "More to "heparin" than anticoagulation." Thromb Res **75**(1): 1-32.
- Liotta, L. A. (1984). "Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture." Am J Pathol **117**(3): 339-48.
- Liotta, L. A. (1986a). "Molecular biology of metastases: a review of recent approaches." Eur J Cancer Clin Oncol **22**(3): 345-8.
- Liotta, L. A. (1986b). "Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture." Cancer Res **46**(1): 1-7.

- Liotta, L. A. (1992). "Cancer cell invasion and metastasis." Sci Am **266**(2): 54-9, 62-3.
- Liotta, L. A. and C. N. Rao (1986). "Tumor invasion and metastasis." Monogr Pathol(27): 183-92.
- Liotta, L. A. and W. G. Stetler-Stevenson (1991). "Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation." Cancer Res **51**(18 Suppl): 5054s-5059s.
- Liu, Y. B.S. L. GaoX. P. ChenS. Y. PengH. Q. FangY. L. WuC. H. PengZ. TangB. XuJ. W. WangG. L. DengH. J. LiX. D. FengH. R. Qian (2005). "Expression and significance of heparanase and nm23-H1 in hepatocellular carcinoma." World J Gastroenterol **11**(9): 1378-81.
- Mahtouk, K.D. HoseP. RaynaudM. HundemerM. JourdanE. JourdanV. PantescoM. BaudardJ. De VosM. LarroqueT. MoehlerJ. F. RossiT. RemeH. GoldschmidtB. Klein (2007). "Heparanase influences expression and shedding of syndecan-1, and its expression by the bone marrow environment is a bad prognostic factor in multiple myeloma." Blood **109**(11): 4914-23.
- Martins, J. R.M. E. GadelhaS. M. FonsecaL. O. SampaioL. P. P. A. DeC. P. DietrichH. B. Nader (2000). "Patients with head and neck tumors excrete a chondroitin sulfate with a low degree of sulfation: a new tool for diagnosis and follow-up of cancer therapy." Otolaryngol Head Neck Surg **122**(1): 115-8.
- Marynen, P.J. ZhangJ. J. CassimanH. Van den BergheG. David (1989). "Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. Prediction of an integral membrane domain and evidence for multiple distinct core proteins at the cell surface of human lung fibroblasts." J Biol Chem **264**(12): 7017-24.
- Maxhimer, J. B.R. M. QuirosR. StewartK. DowlatshahiP. GattusoM. FanR. A. PrinzX. Xu (2002). "Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer." Surgery **132**(2): 326-33.
- McKenzie, E.K. TysonA. StampsP. SmithP. TurnerR. BarryM. HircockS. PatelE. BarryC. StubberfieldJ. TerrettM. Page (2000). "Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member." Biochem Biophys Res Commun **276**(3): 1170-7.
- McKenzie, E. A. (2007). "Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation." Br J Pharmacol **151**(1): 1-14.
- Mercurio, A. M. (1995). "Laminin receptors: achieving specificity through cooperation." Trends Cell Biol **5**(11): 419-23.

- Meyer, C.L. Notari S. P. Becerra (2002). "Mapping the type I collagen-binding site on pigment epithelium-derived factor. Implications for its antiangiogenic activity." J Biol Chem **277**(47): 45400-7.
- Michelacci, Y. M.R. Q. Glashan N. Schor (1989). "Urinary excretion of glycosaminoglycans in normal and stone forming subjects." Kidney Int **36**(6): 1022-8.
- Michelacci, Y. M.P. A. Mourao J. Laredo C. P. Dietrich (1979). "Chondroitin sulfates and proteoglycans from normal and arthrosic human cartilage." Connect Tissue Res **7**(1): 29-36.
- Mikami, M.K. Noshoh. Yamamoto T. Takahashi T. Maehata H. Taniguchi Y. Adachi A. Imamura M. Fujita M. Hosokawa F. Itoh K. Imai Y. Shinomura (2006). "Mutational analysis of beta-catenin and the RAS-RAF signalling pathway in early flat-type colorectal tumours." Eur J Cancer **42**(17): 3065-72.
- Mikami, S.K. Ohashi Y. Usui T. Nemoto K. Katsube M. Yanagishita M. Nakajima K. Nakamura M. Koike (2001). "Loss of syndecan-1 and increased expression of heparanase in invasive esophageal carcinomas." Jpn J Cancer Res **92**(10): 1062-73.
- Mosher, D. F.J. Sottile C. Wu J. A. McDonald (1992). "Assembly of extracellular matrix." Curr Opin Cell Biol **4**(5): 810-8.
- Mourao, P. A. and C. P. Dietrich (1973). "Differences in the content of chondroitin sulfate C and chondroitin sulfate A in the epiphysial growth cartilages of human vertebrae and long bones." Biochim Biophys Acta **320**(1): 210-3.
- Mourao, P. A.S. Rozenfeld J. Laredo C. P. Dietrich (1976). "The distribution of chondroitin sulfates in articular and growth cartilages of human bones." Biochim Biophys Acta **428**(1): 19-26.
- Myllyharju, J. and K. I. Kivirikko (2001). "Collagens and collagen-related diseases." Ann Med **33**(1): 7-21.
- Nader, H. B.V. Buonassisi P. Colburn C. P. Dietrich (1989). "Heparin stimulates the synthesis and modifies the sulfation pattern of heparan sulfate proteoglycan from endothelial cells." J Cell Physiol **140**(2): 305-10.
- Nader, H. B. and C. P. Dietrich (1977). "Determination of sulfate after chromatography and toluidine blue complex formation." Anal Biochem **78**(1): 112-8.
- Nader, H. B.C. P. Dietrich V. Buonassisi P. Colburn (1987). "Heparin sequences in the heparan sulfate chains of an endothelial cell proteoglycan." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(11): 3565-9.

- Nader, H. B.T. M. FerreiraJ. F. PaivaM. G. MedeirosS. M. JeronimoV. M. PaivaC. P. Dietrich (1984). "Isolation and structural studies of heparan sulfates and chondroitin sulfates from three species of molluscs." J Biol Chem **259**(3): 1431-5.
- Nader, H. B.M. A. Porcionattol. L. TersariolM. A. PinhalF. W. OliveiraC. T. MoraesC. P. Dietrich (1990). "Purification and substrate specificity of heparitinase I and heparitinase II from *Flavobacterium heparinum*. Analyses of the heparin and heparan sulfate degradation products by ¹³C NMR spectroscopy." J Biol Chem **265**(28): 16807-13.
- Nanci, A. (1999). "Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density." J Struct Biol **126**(3): 256-69.
- Naomoto, Y.M. TakaokaT. OkawaT. NobuhisaM. GunduzN. Tanaka (2005). "The role of heparanase in gastrointestinal cancer (Review)." Oncol Rep **14**(1): 3-8.
- Nasser, N. J.A. AviviM. Shushyl. VlodavskyE. Nevo (2007). "Cloning, expression, and characterization of an alternatively spliced variant of human heparanase." Biochem Biophys Res Commun **354**(1): 33-8.
- Nasser, N. J.E. Nevol. ShafatN. IlanI. VlodavskyA. Avivi (2005). "Adaptive evolution of heparanase in hypoxia-tolerant *Spalax*: gene cloning and identification of a unique splice variant." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15161-6.
- Nobuhisa, T.Y. NaomotoT. OhkawaM. TakaokaR. OnoT. MurataM. GunduzY. ShirakawaT. YamatsujiM. HaisaJ. MatsuokaH. TsujigiwaH. NagatsukaM. NakajimaN. Tanaka (2005). "Heparanase expression correlates with malignant potential in human colon cancer." J Cancer Res Clin Oncol **131**(4): 229-37.
- Numa, F.K. HirabayashiK. KawasakiY. SakaguchiN. SuginoY. SuehiroY. SuminamiH. HirakawaK. UmayaharaS. NawataH. OgataH. Kato (2002). "Syndecan-1 expression in cancer of the uterine cervix: association with lymph node metastasis." Int J Oncol **20**(1): 39-43.
- Oba-Shinjo, S. M.A. G. BertoC. C. PasserottiC. D. BarbosaL. O. Sampaio (2003). "Decorin is one of the proteoglycans expressed in Walker 256 rat mammary carcinoma." Braz J Med Biol Res **36**(8): 1079-89.
- Okajima, K. (1999). "[Role of endothelial cell dysfunction in disseminated intravascular coagulation]." Rinsho Ketsueki **40**(5): 373-7.
- Opal, S. M.C. M. KesslerJ. RoemischS. Knaub (2002). "Antithrombin, heparin, and heparan sulfate." Crit Care Med **30**(5 Suppl): S325-31.

- Park, H.Y. KimY. LimI. HanE. S. Oh (2002). "Syndecan-2 mediates adhesion and proliferation of colon carcinoma cells." J Biol Chem **277**(33): 29730-6.
- Pavao, M. S.P. A. MouraoB. MulloyD. M. Tollefsen (1995). "A unique dermatan sulfate-like glycosaminoglycan from ascidian. Its structure and the effect of its unusual sulfation pattern on anticoagulant activity." J Biol Chem **270**(52): 31027-36.
- Peretti, T.J. WaisbergA. M. MaderL. L. de MatosR. B. da CostaG. M. ConceicaoA. C. LopesH. B. NaderM. A. Pinhal (2008). "Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma." Eur J Gastroenterol Hepatol **20**(8): 756-65.
- Petersen, T. E.H. C. ThogersenK. SkorstengaardK. Vibe-PedersenP. SahlL. Sottrup-JensenS. Magnusson (1983). "Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(1): 137-41.
- Pinhal, M. A.B. SmithS. OlsonJ. AikawaK. KimataJ. D. Esko (2001). "Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 12984-9.
- Poblacion, C. A. and Y. M. Michelacci (1986). "Structural differences of dermatan sulfates from different origins." Carbohydr Res **147**(1): 87-100.
- Poole, A. R. (1986). "Proteoglycans in health and disease: structures and functions." Biochem J **236**(1): 1-14.
- Porcionatto, M. A.C. R. MoreiraC. F. LotfiH. A. ArmelinC. P. DietrichH. B. Nader (1998). "Stimulation of heparan sulfate proteoglycan synthesis and secretion during G1 phase induced by growth factors and PMA." J Cell Biochem **70**(4): 563-72.
- Porcionatto, M. A.H. B. NaderC. P. Dietrich (1999). "Heparan sulfate and cell division." Braz J Med Biol Res **32**(5): 539-44.
- Porcionatto, M. A.C. R. PintoC. P. DietrichH. B. Nader (1994). "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**(9): 2185-90.
- Pryczynicz, A.K. Guzinska-UstymowiczV. Dymicka-PiekarskaJ. CzyzewskaA. Kemona (2007). "Expression of matrix metalloproteinase 9 in pancreatic ductal carcinoma is associated with tumor metastasis formation." Folia Histochem Cytobiol **45**(1): 37-40.
- Rapraeger, A.M. JalkanenE. EndoJ. KodaM. Bernfield (1985). "The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin

- sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans." J Biol Chem **260**(20): 11046-52.
- Raulo, E.M. A. ChernousovD. J. CareyR. NoloH. Rauvala (1994). "Isolation of a neuronal cell surface receptor of heparin binding growth-associated molecule (HB-GAM). Identification as N-syndecan (syndecan-3)." J Biol Chem **269**(17): 12999-3004.
- Reiland, J.R. D. SandersonM. WaguespackS. A. BarkerR. LongD. D. CarsonD. Marchetti (2004). "Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate: functional implications for tumor cell invasion." J Biol Chem **279**(9): 8047-55.
- Reizes, O.S. C. BenoitD. J. Clegg (2008). "The role of syndecans in the regulation of body weight and synaptic plasticity." Int J Biochem Cell Biol **40**(1): 28-45.
- Ren, W. P. and B. F. Sloane (1996). "Cathepsins D and B in breast cancer." Cancer Treat Res **83**: 325-52.
- Rocken, C. (2008). "[Molecular targets for colon cancer : VEGF, EGFR - and what else?]." Pathologe.
- Rodrigues, N. R.A. RowanM. E. SmithI. B. KerrW. F. BodmerJ. V. GannonD. P. Lane (1990). "p53 mutations in colorectal cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7555-9.
- Romberger, D. J. (1997). "Fibronectin." Int J Biochem Cell Biol **29**(7): 939-43.
- Ru, G. Q.Z. S. ZhaoQ. L. TangW. J. Xu (2006). "[mRNA expression of syndecan-1 and heparanase in relation to tumor progression and prognosis of gastric carcinoma]." Zhonghua Wai Ke Za Zhi **44**(15): 1062-4.
- Ruoslahti, E.M. BourdonT. Krusius (1986). "Molecular cloning of proteoglycan core proteins." Ciba Found Symp **124**: 260-71.
- Russell, D. L.S. A. OchsnerM. HsiehS. MuldersJ. S. Richards (2003). "Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary." Endocrinology **144**(3): 1020-31.
- Saku, T. and H. Furthmayr (1989). "Characterization of the major heparan sulfate proteoglycan secreted by bovine aortic endothelial cells in culture. Homology to the large molecular weight molecule of basement membranes." J Biol Chem **264**(6): 3514-23.
- Sampaio, E. and J. L. Dufier (1988). "[An electronic sensory substitute for young blind children]." J Fr Ophtalmol **11**(2): 161-7.

- Sampaio, L. O. and C. P. Dietrich (1981). "Changes of sulfated mucopolysaccharides and mucopolysaccharidases during fetal development." J Biol Chem **256**(17): 9205-10.
- Sampaio, L. O.C. P. DietrichO. G. Filho (1977). "Changes in sulfated mucopolysaccharide composition of mammalian tissues during growth and in cancer tissues." Biochim Biophys Acta **498**(1): 123-31.
- Sanderson, R. D. and Y. Yang (2008). "Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment." Clin Exp Metastasis **25**(2): 149-59.
- Sanes, J. R.E. EngvallR. ButkowskiD. D. Hunter (1990). "Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere." J Cell Biol **111**(4): 1685-99.
- Sasaki, N.N. HigashiT. TakaM. NakajimaT. Irimura (2004). "Cell surface localization of heparanase on macrophages regulates degradation of extracellular matrix heparan sulfate." J Immunol **172**(6): 3830-5.
- Sato, M.K. AmemiyaS. HayakawaH. Munakata (2008). "Subcellular localization of human heparanase and its alternative splice variant in COS-7 cells." Cell Biochem Funct **26**(6): 676-83.
- Saunders, S.M. JalkanenS. O'FarrellM. Bernfield (1989). "Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan." J Cell Biol **108**(4): 1547-56.
- Schonherr, E. and H. J. Hausser (2000). "Extracellular matrix and cytokines: a functional unit." Dev Immunol **7**(2-4): 89-101.
- Shafat, I.A. B. BarakS. PostovskyR. ElhasidN. IlanI. VlodavskyM. W. Arush (2007). "Heparanase levels are elevated in the plasma of pediatric cancer patients and correlate with response to anticancer treatment." Neoplasia **9**(11): 909-16.
- Shafat, I.D. PodeT. PeretzN. IlanI. VlodavskyB. Nisman (2008). "Clinical significance of urine heparanase in bladder cancer progression." Neoplasia **10**(2): 125-30.
- Shafat, I.I. VlodavskyN. Ilan (2006). "Characterization of mechanisms involved in secretion of active heparanase." J Biol Chem **281**(33): 23804-11.
- Shinyo, Y.J. KodamaA. HongoM. YoshinouchiY. Hiramatsu (2003). "Heparanase expression is an independent prognostic factor in patients with invasive cervical cancer." Ann Oncol **14**(10): 1505-10.
- Shriver, Z.D. LiuR. Sasisekharan (2002). "Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions." Trends Cardiovasc Med **12**(2): 71-7.

- Shteper, P. J.E. ZchariaY. AshhabT. PeretzI. VlodayskyD. Ben-Yehuda (2003). "Role of promoter methylation in regulation of the mammalian heparanase gene." Oncogene **22**(49): 7737-49.
- Simizu, S.K. IshidaH. Osada (2004a). "Heparanase as a molecular target of cancer chemotherapy." Cancer Sci **95**(7): 553-8.
- Simizu, S.K. IshidaM. K. WierzbaH. Osada (2004b). "Secretion of heparanase protein is regulated by glycosylation in human tumor cell lines." J Biol Chem **279**(4): 2697-703.
- Soriano, E. S.M. S. CamposY. M. Michelacci (2000). "Effect of epithelial debridement on glycosaminoglycan synthesis by human corneal explants." Clin Chim Acta **295**(1-2): 41-62.
- Stemmermann, G.S. C. HeffelfingerA. NoffsingerY. Z. HuiM. A. MillerC. M. Fenoglio-Preiser (1994). "The molecular biology of esophageal and gastric cancer and their precursors: oncogenes, tumor suppressor genes, and growth factors." Hum Pathol **25**(10): 968-81.
- Suarez, E. R.A. S. NoharaF. D. MataveliL. L. de MatosH. B. NaderM. A. Pinhal (2007). "Glycosaminoglycan synthesis and shedding induced by growth factors are cell and compound specific." Growth Factors **25**(1): 50-9.
- Tersariol, I. L.D. C. PimentaJ. R. ChagasP. C. Almeida (2002). "Proteinase activity regulation by glycosaminoglycans." Braz J Med Biol Res **35**(2): 135-44.
- Theodoro, T. R.L. L. de MatosA. V. Sant AnnaF. L. FonsecaP. SmedoL. C. MartinsH. B. NaderA. Del GiglioM. A. da Silva Pinhal (2007). "Heparanase expression in circulating lymphocytes of breast cancer patients depends on the presence of the primary tumor and/or systemic metastasis." Neoplasia **9**(6): 504-10.
- Tkachenko, E.E. LutgensR. V. StanM. Simons (2004). "Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway." J Cell Sci **117**(Pt 15): 3189-99.
- Toyoshima, M. and M. Nakajima (1999). "Human heparanase. Purification, characterization, cloning, and expression." J Biol Chem **274**(34): 24153-60.
- Vansant, J. R. and R. K. Davis (1971). "Esophageal obstruction secondary to mediastinal metastasis from breast carcinoma." Chest **60**(1): 93-5.
- Vlodaysky, I.M. ElkinG. Abboud-JarrouF. Levi-AdamL. FuksI. ShafatN. Ilan (2008). "Heparanase: one molecule with multiple functions in cancer progression." Connect Tissue Res **49**(3): 207-10.

- Vlodavsky, I.Y. FriedmannM. ElkinH. AingornR. AtzmonR. Ishai-MichaeliM. BitanO. PappoT. PeretzI. MichalL. SpectorI. Pecker (1999). "Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis." Nat Med **5**(7): 793-802.
- Vlodavsky, I.O. GoldshmidtE. ZchariaR. AtzmonZ. Rangini-GuattaM. ElkinT. PeretzY. Friedmann (2002). "Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development." Semin Cancer Biol **12**(2): 121-9.
- Vlodavsky, I.O. GoldshmidtE. ZchariaS. MetzgerT. Chajek-ShaulR. AtzmonZ. Guatta-RanginiY. Friedmann (2001). "Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and normal development." Biochimie **83**(8): 831-9.
- Vlodavsky, I.E. ZchariaO. GoldshmidtR. EshelB. Z. KatzS. MinucciO. KovalchukS. PencoC. PisanoA. NaggiB. Casu (2003). "Involvement of heparanase in tumor progression and normal differentiation." Pathophysiol Haemost Thromb **33 Suppl 1**: 59-61.
- Vreys, V.N. DelandeZ. ZhangC. CoomansA. RoebroekJ. DurrG. David (2005). "Cellular uptake of mammalian heparanase precursor involves low density lipoprotein receptor-related proteins, mannose 6-phosphate receptors, and heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem **280**(39): 33141-8.
- Wang, Z.H. XuL. JiangX. ZhouC. LuX. Zhang (2005). "Positive association of heparanase expression with tumor invasion and lymphatic metastasis in gastric carcinoma." Mod Pathol **18**(2): 205-11.
- Yamada, K. M. (1983). "Cell surface interactions with extracellular materials." Annu Rev Biochem **52**: 761-99.
- Yanagishita, M. and V. C. Hascall (1984). "Proteoglycans synthesized by rat ovarian granulosa cells in culture. Isolation, fractionation, and characterization of proteoglycans associated with the cell layer." J Biol Chem **259**(16): 10260-9.
- Yanagishita, M. and V. C. Hascall (1992). "Cell surface heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem **267**(14): 9451-4.
- Yurchenco, P. D. and Y. S. Cheng (1993). "Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model." J Biol Chem **268**(23): 17286-99.
- Yurchenco, P. D. and J. C. Schittny (1990). "Molecular architecture of basement membranes." FASEB J **4**(6): 1577-90.
- Zetser, A.F. Levy-AdamV. KaplanS. Gingis-VelitskiY. BashenkoS. SchubertM. Y. FlugelmanI. VlodavskyN. Ilan (2004). "Processing and activation of latent heparanase occurs in lysosomes." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2249-58.

ANEXO I. DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS RELACIONADOS AOS PACIENTES COM CARCINOMA GASTROINTESTINAL.

| Caso | Paciente | Tipo de tumor | Idade | Sexo | Diagnóstico | Cirurgia |
|------|----------|---------------------------|-------|------|-------------|-------------------------------|
| 1 | AF | Esôfago-CEC | 82 | M | Carcinoma | Não operado |
| 2 | APP | Neoplasia de Reto | 63 | M | Carcinoma | Retossigmóide |
| 3 | CRP | Gástrico | 51 | M | Carcinoma | Gastroentero anastomose |
| 4 | DR | Neoplasia Estômago | 80 | M | Carcinoma | Gastrectomia |
| 5 | EAS | Esôfago | 73 | F | Carcinoma | Gastrectomia ampliada |
| 6 | ECC | Neoplasia Sigmóide | 51 | F | Carcinoma | Retossigmóide |
| 7 | FDB | Neoplasia Cólon | 57 | F | Carcinoma | Colectomia Esquerda |
| 8 | HL | Adenocarcinoma | 73 | M | Carcinoma | Gastroduodeno pancreatectomia |
| 9 | JÁ | Tumor de Cólon Direito | 77 | M | Carcinoma | ColectST |
| 10 | JLS | Neoplasia de Esôfago | 50 | M | Carcinoma | Tubo gástrico |
| 11 | JMP | Hepatocarcinoma | 69 | M | Carcinoma | não-operado |
| 12 | LFP | Neoplasia Colo-retal | 67 | F | Carcinoma | Retossigmóide |
| 13 | MCS | Esôfago | 78 | M | Carcinoma | Tubo gástrico |
| 14 | MG | Cólon Ascendente | 73 | M | Carcinoma | Colectomia direita |
| 15 | MNSS | Neoplasia Papila Duodenal | 66 | F | Carcinoma | Gastroduodeno pancreatectomia |
| 16 | NGT | Cólon Esquerdo | 78 | F | Carcinoma | Colectomia esquerda |
| 17 | OFF | Reto | 69 | M | Carcinoma | Retossigmóide |
| 18 | PRS | Neoplasia de Estômago | 82 | M | Carcinoma | Gastrectomia Total |
| 19 | RPF | Cólon Sigmóide | 61 | M | Carcinoma | Colectomia sigmoidal |
| 20 | RRS | Esôfago | 78 | M | Carcinoma | Esofagogastrectomia |
| 21 | RYT | Neoplasia de Reto | 68 | M | Carcinoma | Colostomia |

F, Feminino; M, Masculino

ANEXO II. DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS RELACIONADOS AOS PACIENTES COM CARCINOMA GASTROINTESTINAL.

| Paciente | Diferenciação | Cirurgia | Data Cirurgia | Estádio | Metástase | Óbito |
|----------|--------------------|----------|---------------|---------|-----------------|------------|
| AF | bem diferenciado | | | | Não | 13/12/2007 |
| APP | moderado | não | 16/11/2007 | T3N1M1 | Fígado | Não |
| CRP | pouco diferenciado | não | 29/10/2007 | M1 | Peritônio | Não |
| DR | moderado | Sim | 16/05/2008 | T2N0M0 | Não | Não |
| EAS | pouco diferenciado | Sim | 01/11/2007 | T1N0M5 | não | Não |
| ECC | moderado | Sim | 21/05/2008 | T3N1M0 | não | não |
| FDB | moderado | Sim | 16/05/2008 | T3N1M1 | Diafragma | 06/06/2008 |
| HL | bem diferenciado | Sim | 15/04/2008 | T3N0M0 | Não | 27/04/2008 |
| JÁ | bem diferenciado | Sim | 01/12/2007 | T2N0M0 | não | Não |
| JLS | pouco diferenciado | não | 24/07/2008 | N3 | | Não |
| JMP | | | | T3N1 | | 15/04/2008 |
| LFP | bem diferenciado | não | 19/02/2008 | T3N1M1 | Fígado | Não |
| MCS | | não | 12/12/2007 | | | 19/01/2008 |
| MG | moderado | Sim | 26/10/2007 | T3N0M0 | não | 25/03/2008 |
| MNSS | moderado | Sim | 22/02/2008 | T3N0M0 | Não | 09/03/2008 |
| NGT | bem diferenciado | Sim | 27/11/2007 | T3N0M0 | Não | Não |
| OFF | moderado | não | 29/11/2007 | T2N1M1? | Fígado | Não |
| PRS | moderado | Sim | 28/03/2008 | T2N1M0 | Cerebral | Não |
| RPF | pouco diferenciado | não | 31/10/2007 | T3N1M1 | peritônio | não |
| RRS | moderado | Sim | 05/12/2007 | T3N1M0 | Não | 20/07/2008 |
| RYT | moderado | não | 21/11/2007 | T4 | Invasão pélvica | Não |

ANEXO III. DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS RELACIONADOS AOS PACIENTES COM CARCINOMA GASTROINTESTINAL.

| Sigla | Sobrevida (meses) | Local | Invas. Angiovascular | Invasão Linfática | Infiltração Perineural | Óbito por Neoplasia |
|-------|-------------------|-----------------|----------------------|-------------------|------------------------|---------------------|
| AF | 18 | Esôfago | | | | sim |
| APP | 12 | Reto | | | | |
| CRP | 3 | Estômago | | | | |
| DR | 8 | Estômago | não | não | não | |
| EAS | 18 | Estômago | não | não | não | |
| ECC | 8 | Sigmóide | não | não | sim | |
| FDB | 1 | Descendente | sim | sim | não | não |
| HL | 6 | Papila duodenal | não | não | não | não |
| JÁ | 11 | Ceco-asc | não | não | não | |
| JLS | 6 | Esôfago | | | | |
| JMP | 4 | Fígado | | | sim | |
| LFP | 10 | Reto | sim | sim | não | |
| MCS | 18 | Esôfago | | | | sim |
| MG | 5 | Ascendente | não | não | não | sim |
| MNSS | 6 | Papila duodenal | não | não | não | não |
| NGT | 12 | Sigmóide | não | não | não | |
| OFF | 13 | Reto | sim | não | não | |
| PRS | 4 | Estômago | não | não | não | |
| RPF | 14 | Sigmóide | não | não | sim | |
| RRS | 8 | Estômago | sim | sim | não | não |
| RYT | 14 | Reto | | | | |

ANEXO IV. MEDIDAS DOS ÍNDICES DENSITOMÉTRICOS DE HEPARANASE DE CADA INDIVÍDUO COM CARCINOMA GASTROINTESTOINAL.

| Sigla | HPA1 50 kDa (pixels/ 2µg proteína) | | HPA1 65 kDa (pixels / 2µg proteína) | | HPA2 (pixels / 5 µg proteína) | |
|-------|---------------------------------------|----------|--|----------|----------------------------------|----------|
| | Paciente | Controle | Paciente | Controle | Paciente | Controle |
| AF | 68,05 | 18,43 | 44,12 | 26,87 | 210,36 | 214,84 |
| APP | 30,17 | 17,36 | 56,14 | 52,75 | 163,55 | 133,18 |
| CRP | 72,66 | 24,56 | 39 | 27,05 | 205,34 | 115,49 |
| DR | 41,09 | 19,3 | 38,07 | 24,75 | 139,88 | 112,27 |
| EAS | 77,69 | 32,54 | 59,35 | 33,77 | 331,33 | 293,7 |
| ECC | 36,81 | 10,45 | 51,92 | 17,5 | 113,15 | 82,93 |
| FDB | 28,56 | 26,27 | 27,83 | 31,58 | 218,72 | 207,53 |
| HL | 58,38 | 21,89 | 27,37 | 22,5 | 279,32 | 125,7 |
| JÁ | 27,02 | 18,68 | 48,14 | 35,98 | 177,03 | 96,04 |
| JLS | 21,36 | 17,62 | 28,7 | 33,69 | 189,29 | 73,7 |
| JMP | 57,04 | 29,14 | 29,11 | 18,96 | 174,93 | 147,31 |
| LFP | 61,36 | 54,51 | 87,26 | 74,79 | 292,55 | 163,09 |
| MCS | 88,37 | 27,04 | 75,89 | 22,42 | 257,39 | 118,67 |
| MG | 67,9 | 50,33 | 64,35 | 70,93 | 198,15 | 91,6 |
| MNSS | 58,37 | 19,98 | 30,92 | 35,91 | 205,99 | 103,48 |
| NGT | 73,91 | 23,39 | 49,92 | 39,99 | 172,57 | 171,28 |
| OFF | 35,99 | 13,08 | 56,03 | 42,63 | 98,53 | 64,92 |
| PRS | 27,54 | 18,09 | 30,19 | 41,17 | 131,43 | 103,24 |
| RPF | 63,37 | 24,1 | 43,08 | 23,47 | 191,59 | 141,2 |
| RRS | 33,3 | 26,34 | 43,21 | 33,31 | 194,68 | 115,54 |
| RYT | 57,71 | 18,31 | 34,57 | 23,65 | 252,16 | 134,51 |

ANEXO V. DADOS DA REAÇÃO DE PCR REAL TIME DE HPA-1.

| | PACIENTE | CONTROLE ENDÓGENO | GENE ALVO | ΔCt | $\Delta\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|-------------|----------|----------------------|--------------|--------------|-------------------|-------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| não operado | RRS | 25,07 | 24,02 | -1,05 | -4,44 | 4,44 | 21,7056692 | 19,8533 | 2,61964 |
| | RRS | | 24,29 | -0,78 | -4,17 | 4,17 | 18,0009358 | | |
| | RRS | | | | | | | | |
| não operado | MCS | 28,86 | 29,78 | -0,92 | -4,31 | 4,31 | 19,835 | 24,84619 | 7,086 |
| | MCS | | 30,37 | -1,51 | -4,9 | 4,9 | 29,8570557 | | |
| | MCS | | | | | | | | |
| não operado | JÁ | 24,99 | 29,94 | 4,95 | 1,56 | - | 0,33915108 | 0,659286 | 0,45274 |
| | JÁ | | 28,41 | 3,42 | 0,03 | 1,56 | - | | |
| | JÁ | | | | | - | 0,9794203 | | |
| não operado | AF | 22,03 | 28,41 | 6,38 | 2,99 | - | 0,12586944 | 0,071079 | 0,07749 |
| | AF | | 31,36 | 9,33 | 5,94 | 2,99 | - | | |
| | AF | | | | | - | 0,01628853 | | |
| não operado | APP | 24,86 | 30,05 | 5,19 | 1,8 | -1,8 | 0,28717459 | 0,11 | |
| | APP | | | | | | | | |
| | APP | | | | | | | | |
| não operado | MNSS | 22,33 | 35,49 | 13,16 | 9,77 | - | 0,00114535 | 0,001145 | 0 |
| | MNSS | | 35,49 | 13,16 | 9,77 | 9,77 | - | | |
| | MNSS | | 35,49 | 13,16 | 9,77 | - | 0,00114535 | | |
| não operado | NGT | 25,56 | 40,77 | 15,21 | 11,82 | - | 0,00027658 | 0,000253 | 3,3E-05 |
| | NGT | | 41,04 | 15,48 | 12,09 | 11,8 | - | | |
| | NGT | | | | | - | 0,00022938 | | |
| não operado | OFF | 24,43 | 40,23 | 15,8 | 12,41 | - | 0,00018375 | 0,000397 | 0,0003 |
| | OFF | | 38,5 | 14,07 | 10,68 | 12,4 | - | | |
| | OFF | | | | | - | 0,00060954 | | |
| controle | AMR | 10,91 | 16,38 | 5,47 | 2,08 | - | 0,23651441 | | |
| | AMR | | 16,38 | 5,47 | 2,08 | 2,08 | - | | |
| | AMR | | | | | - | 0,23651441 | 0,236514 | 0 |
| controle | LCT | 12,05 | 18,10 | 6,05 | 2,66 | - | 0,15821957 | | |
| | LCT | | 18,82 | 6,77 | 3,38 | 2,66 | - | | |
| | LCT | | | | | - | 0,0960547 | 0,127137 | 0,04396 |
| controle | MCCF | 12,18 | 18,39 | 6,21 | 2,82 | - | 0 | | |
| | MCCF | | 17,76 | 5,58 | 2,19 | 2,82 | - | | |
| | MCCF | | | | | - | 0,21915143 | 0,609576 | 0,55214 |
| | MCCF | | | | | 2,19 | 1 | | |

ANEXO VI. DADOS DA REAÇÃO DE PCR REAL TIME DE HPA-2.

| | AMOSTRAS | CONTROLE ENDÓGENO | GENE ALVO | ΔCt | $\Delta\Delta Ct$ | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|-------------|----------|-------------------|-----------|--------------|-------------------|-------------------|------------------------|---------------|---------------|
| não operado | RRS | 25,07 | 30,82 | 5,75 | 2,36 | -2,36 | 0,1947911 | 0,2705 | 0,10712 |
| | RRS | | 29,99 | 4,92 | 1,53 | -1,53 | 0,3462774 | | |
| | RRS | | | | | | | | |
| não operado | MCS | 28,86 | 16,81 | 12,05 | 8,66 | -8,66 | 0,002 | 0,0056 | 0,003 |
| | MCS | | 18,46 | 10,4 | 7,01 | -7,01 | 0,0077585 | | |
| | MCS | | 18,24 | 10,62 | 7,23 | -7,23 | 0,0066612 | | |
| não operado | JÁ | 24,99 | 28,83 | 3,84 | 0,45 | -0,45 | 0,7320428 | 0,4843 | 0,35039 |
| | JÁ | | 30,46 | 5,47 | 2,08 | -2,08 | 0,2365144 | | |
| | JÁ | | | | | | | | |
| não operado | AF | 22,03 | 26,84 | 4,81 | 1,42 | -1,42 | 0,3737123 | 0,4733 | 0,22601 |
| | AF | | 25,87 | 3,84 | 0,45 | -0,45 | 0,7320428 | | |
| | AF | | 27,09 | 5,06 | 1,67 | -1,67 | 0,3142533 | | |
| não operado | APP | 24,86 | 31,49 | 6,63 | 3,24 | -3,24 | 0,1058432 | 0,11 | |
| | APP | | | | | | | | |
| | APP | | | | | | | | |
| não operado | MNSS | 22,33 | 24,81 | 2,48 | -0,91 | 0,91 | 1,8790455 | 2,4352 | 0,48201 |
| | MNSS | | 24,29 | 1,96 | -1,43 | 1,43 | 2,6944672 | | |
| | MNSS | | 24,27 | 1,94 | -1,45 | 1,45 | 2,7320805 | | |
| não operado | NGT | 25,56 | 32,33 | 6,77 | 3,38 | -3,38 | 0,0960547 | 0,1705 | 0,10522 |
| | NGT | | 30,98 | 5,42 | 2,03 | -2,03 | 0,2448551 | | |
| | NGT | | | | | | | | |
| não operado | OFF | 24,43 | 30,41 | 5,98 | 2,59 | -2,59 | 0,1660857 | 0,1231 | 0,06072 |
| | OFF | | 31,46 | 7,03 | 3,64 | -3,64 | 0,0802141 | | |
| | OFF | | | | | | | | |
| controle | AMR | 10,91 | 13,73 | 2,82 | -0,54 | 0,54 | 1,4539725 | | |
| | AMR | | 14,06 | 3,15 | -0,24 | 0,24 | 1,1809927 | 1,3032 | 0,13872 |
| | AMR | | 13,98 | 3,07 | -0,35 | 0,35 | 1,2745606 | | |
| controle | LCT | 12,05 | 12,38 | 0,33 | 3,06 | -3,06 | 0,119908 | | |
| | LCT | | 12,14 | 0,09 | 3,03 | -3,3 | 0,1015315 | 0,1107 | 0,01299 |
| | LCT | | | | | | | | |
| controle | MCCF | 12,18 | 15,57 | 3,39 | 0 | 0 | 0 | | |
| | MCCF | | 15,21 | 3,03 | -0,36 | 0,36 | 1,2834259 | 1,3061 | 0,032 |
| | MCCF | | 15,16 | 2,98 | 0,41 | 0,41 | 1,3286858 | | |

RESUMO

A heparanase-1 (HPA1) é uma endo- β -glucuronidase que degrada ligações glicosídicas intrassacarídicas entre a hexosamina e ácido glucurônico de cadeias de heparam sulfato, constituintes dos proteoglicanos de matriz extracelular e superfície celular. Seu gene encontra-se localizado no cromossomo 4 humano (4q21,3). A HPA1 gera oligossacarídeos que estão envolvidos na proliferação celular, angiogênese e diferenciação celular relacionados com o desenvolvimento de tumores e metástases. A heparanase-2 (HPA2) é codificada pelo cromossomo 10q23-24. 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 voltada para o citoplasma e não apresentam atividade enzimática. O presente estudo tem por objetivo identificar e quantificar a expressão de HPA1 (isoformas 50kDa e 65 kDa), e isoformas da HPA2 no plasma de pacientes com carcinoma gastrointestinal, comparando-se com a expressão em indivíduos não acometidos por neoplasia (grupo controle). As proteínas plasmáticas foram identificadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) e transferidas para membrana Hybond-CE, que foi incubada com anticorpo primário anti-HPA1 H-80 ou anti-HPA2 C-17 e revelada com anticorpo secundário conjugado com HRP IgG peroxidase. Isoformas das heparanases foram quantificadas por densitometria (Scion Image) e confirmada por RT-PCR em tempo real. Análises estatística foram realizadas utilizando o programa SPSS 13.0 Windows (SPSS, Chicago, IL). Os resultados demonstraram que ambas isoformas da HPA1 (HPA1 50 kDa e HPA1 65 kDa) e isoformas de HPA2 encontram-se significativamente aumentadas no plasma de pacientes com carcinoma gastrointestinal, comparando-se com o grupo controle. As análises em tempo real da expressão de HPA1 e HPA2 na fração mononuclear do sangue evidenciaram aumento de expressão de HPA1 e HPA2 em pacientes com carcinoma gastrointestinal corroborando com as análises do plasma. Os resultados obtidos demonstram que tanto HPA1 como HPA2 desempenham papel fundamental na carcinogênese gastrointestinal e, portanto, entender o papel fisiológico que desempenham possa fornecer informações para desenvolvimento de possível terapia anti-tumoral.

ABSTRACT

Heparanase-1 (HPA1) is an endo- β -glucuronidase that degrades intradisaccharides glycosidic linkage between hexosamine and glucuronic acid into heparan sulfate chains, present on extracellular matrix and surface proteoglycans. HPA1 gene is located at 4q21.3 chromossome. Oligosaccharides generated by HPA1 are involved in cell proliferation, angiogenesis and cell diferentiation related with tumor development and metastasis. Heparanase-2 (HPA2) is encoded by 10q23-24 chromossome. There are three HPA2 isoforms containing 480, 534 and 592 aminoacids. All HPA2 isoforms have shown that they are intracellular, membrane associated proteins, containing C-terminal domain to the cytoplasm and do not present enzymatic activity. The objective of the present study is to identify and quantify HPA1 (isoforms 50 kDa and 65 kDa), and HPA2 isoforms expression in the plasma of gastrointestinal carcinoma patients, compared with individuals that do not present neoplasia (control group). Plasmatic proteins were identified by polyacrilamide gel electrophoresis (10% SDS-PAGE) and transferred to Hybond-CE membrane, incubated with primary anti-HPA1 H-80 or anti-HPA2 C-17 and developed using secondary antibody conjugated with HRP IgG peroxidase. Heparanases isoforms were quantified by densitometry (Scion Image) and confirmed by real time RT-PCR. Statistic analysis were performed using SPSS 13.0 program (SPSS, Chicago, IL). The results have shown that both HPA1 isoforms (HPA1 50 kDa and HPA1 65 kDa) and HPA2 isoforms were significantly increased in gastrointestinal carcinoma patients plasma, compared with control group. Real time analysis of HPA1 and HPA2 expression in the mononuclear fraction of blood demonstrated an increase HPA1 and HPA2 expression in gastrointestinal carcinoma patients that corroborates with plasma analysis. The obtained results demonstrated that both HPA1 and HPA2 have a fundamental role in gastrointestinal carcinogenesis and, therefore, to understand their physiological function it could help the development of possible new anti-tumor therapies.

ARTIGO

INTRODUCTION

Gastrointestinal carcinomas is one of the commonest malignant neoplasms world wide, with over 1 million new cases and around half million cancer-related deaths reported in 2000 (Parkin *et.al.*, 2001) Most patients who suffer from gastrointestinal cancer, succumb to the effects of distant metastatic lesions rather than the primary carcinoma itself. The invasion of foreign tissue by malignant cells involves interaction with the extracellular matrix and the basement membranes. Basement membranes consist of collagen-type IV, laminin and heparan sulfate proteoglycans which would facilitate cell migration. Therefore, tumor cells need to degrade basement membranes constituents in order to promote metastasis. The proteolytic activity of malignant cells involves metalloproteinases.

In the past decade the damage of structural proteins has been considered to be a critical step for tumors invasion and metastasis. However, we should never neglect the effect of hydrolytic enzymes which use heparan sulfate proteoglycans as substrates, as well as their roles in degrading basement membranes and extracellular matrix.

Heparanase is an endo-beta-glucuronidase cloned out by (Vlodavsky *et.al.*, 1999) Vlodavsky et al in 1999, which degrades heparan sulfate chains of proteoglycans (Hulett *et.al.*, 1999; Vlodavsky *et.al.*, 1999).

Studies have revealed that heparanase has multifunctional modulatory effect in the progression of cancer cells and cell to extracellular matrix interaction. Recent research has shown the important roles of heparanase in the progression of esophagus, stomach and colon cancer, and heparanase expression was closely related to the prognosis of

gastrointestinal cancer therapies. Heparanase silencing and inhibition of enzymatic activities have potential use as targets for anticancer drug development (Naomoto *et.al.*, 2005).

There are two members of heparanases, heparanase-1 (HPA1) and heparanase-2 (HPA2) encoded by different genes, respectively 4q21.3 and 10q23-24 (Vlodavsky *et.al.*, 1992; Vlodavsky *et.al.*, 1993; Baker *et.al.*, 1999; McKenzie *et.al.*, 2000; Vlodavsky *et.al.*, 2001a; Vlodavsky *et.al.*, 2001b). Both enzymes also present different tissue distributions and possibly different cellular localization. It is well know that HPA1 correlates with an increase in tumor and metastatic potential. However, studies should clarify the relative contribution of HPA2 to human healthy and disease, since it does not present enzymatic activity (McKenzie *et.al.*, 2000).

HPA1 has been found as two forms, one located at the cell surface presenting 65 kDa and described as a precursor with no apparent enzymatic activity. However, the mature active enzyme exists as a heterodimer with a 50 kDa C-terminal subunit, resulted from protease processing, and an 8 kDa N-terminal subunit (Dempsey *et.al.*, 2000; Nadav *et.al.*, 2002).

The human heparanase-1 (HPA1) encodes a pre pro-polypeptide of 543 amino acids. The protein is N-glycosylated at the six putative sites and tunicamycin inhibitor studies have shown that these are important the kinetics of estrogen receptor, to Golgi transport and enzyme secretion (Simizu *et.al.*, 2004). Signal peptidase cleavage of the pre pro-enzyme within the endoplasmic reticulum at Ala³⁵ generate the latent 65 kDa form of HPA1. The proteolytic processing of HPA1 occurs intracellularly within the late endosomes and lysosomes (Nadav *et.al.*, 2002; Zetser *et.al.*, 2004; Vreys *et.al.*, 2005).

The active heterodimer of HPA1 consists of an 8 kDa N-terminal subunit (Gln³⁶-Glu¹⁰⁹) non covalently associated with 50 kDa C-terminal subunit (Lys¹⁵⁸-Ile⁵⁴³). As the active

residues (Glu²²⁵ and Glu³⁴³) required for heparan sulfate cleavage are both combined within the 50 kDa subunit (Hulett *et.al.*, 2000). As the active residues (Glu²²⁵ and Glu³⁴³) required for heparan sulfate cleavage are both contained within the 50 kDa subunit (Hulett *et.al.*, 2000), it is presumed that 8 kDa subunit binding produces some conformation change within the active site that facilitates catalysis. The precise nature of the proteases responsible for generating both subunits is an area of intensive investigation. Immunofluorescence and cell fractionation studies show the presence of HPA1 in the nucleos, perinuclear region and, plasma membrane (Marchetti *et.al.*, 2000; Goldshmidt *et.al.*, 2003).

Interestingly, the homology between HPA1 and HPA2 is particularly striking over both these subunits, implicating that this processing could also apply to HPA2. However, the corresponding linker region of HPA2 is not obvious and another alternative is that the post-translational processing of HPA1 and HPA2 may be different. At the present it is not known if HPA2 proteins are constitutively active, or if activity is regulated by processing, or by some as yet unidentified mechanism.

HPA2 has three alternative variant splice transcripts (HPA2*a*, *b* and *c*), which encode putative proteins of 480, 534, and 592 amino acids, respectively. Sequence analyses predict that all three HPA2 proteins are intracellular, membrane-bound enzymes^[27], since in HPA2 the hydrophobic N-terminus of HPA2 characterizes a transmembrane domain with a C-terminus retained inside the cell. However, the precise cellular localization of HPA1 and HPA2 proteins will require further investigation and could change between health and disease.

Alignment of the predicted coding region of HPA2a to HPA1 revealed that the two proteins have an overall identity of 35% (McKenzie *et.al.*, 2000).

To understand the HPA1 regulation mechanism that modulate the levels of transcription appears to be interesting model to control malignant cells.

Hypomethylation of HPA1 promoter in benign prostatic hyperplasia and normal bladder correlated with increased levels of HPA1 expression. Higher levels of promoter methylation with demethylating agents such as 5/azacytidine, restore HPA1 activity and potentiated metastasis capacity *in vivo* (Shteper *et.al.*, 2003). Estrogen also activates HPA1 expression acting directly by the promoter (Elkin *et.al.*, 2003). Two interferon/stimulated response elements consensus sequences in the heparanase promoter (Edovitsky *et.al.*, 2006). It seems that HPA1 itself can act to promote further expression. It is unclear whether this mechanism involves the direct translocation of heparanase into the nucleus, mediating signaling or activation is a consequence of increased heparan sulfate. Other studies have shown that HPA1 is upregulated together with matrix metalloproteinase 2 (Fitzgerald *et.al.*, 1999).

In this study we evaluate heparanase isoforms in the plasma of patients with gastrointestinal carcinoma comparing with donors that do not present neoplasia.

METHODS

Patients

In the present study it was collected peripheral blood samples from 21 patients with histologically confirmed gastrointestinal carcinoma and 21 healthy blood donors from

Colsan (Associação Beneficente de Coleta de Sangue, São Paulo, Brazil). The donors did not present any medical history of neoplasia. The blood was collected after informed consent had been granted. The study conformed to the regulations of The Human Ethic Research Committee at Faculdade de Medicina do ABC no. 025/2008 and The Human Ethic Research Committee at Hospital Servidor Público Estadual no. 021/08.

Samples Collection

Peripheral blood samples were collected in a total of 20 ml, applying EDTA as an anticoagulant, samples were cooled and plasma was obtained by centrifugation (1500g for 15 minutes at 4°C). All samples were frozen and thawed once. Sodium citrate could not be used as anticoagulant due to platelet activation and release of heparanase-rich platelet dense granules and heparanase detection in plasma was noted to be affected by sodium citrate compared with EDTA (Eldor *et.al.*, 1987; Ishai-Michaeli *et.al.*, 1990)

Western Blot Analysis

For immunoblot analysis, 2 and 5 ug of total plasma protein aliquots were loaded on 10% sodium docecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), respectively, for HPA1 and HPA2. The proteins were transferred to Immobilon-P membrane (Millipore, Berdorf, MA), followed by successive incubations with block solution (1% non fat milk), anti-heparanase polyclonal antibodies anti-HPA1 H-80 (Santa Cruz, Biotechnology, USA), and anti-HPA2 C-17 (Santa Cruz, Biotechnology, USA). The primary anti-heparanase antibody was diluted 1:100 in 0.1% bovine serum albumin, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, and 0.05% Tween-20. The secondary antibody was Horseradish Peroxidase-conjugated anti-rabbit / mouse antibody (Jackson

Laboratories, ME, USA). Western Blot antibody reaction was detected using 0.5% 3, 3'-diamino-benzidine (DAB) and 0.01% H₂O₂. A mixture of standard protein markers (Sigma, MO, USA) was used for molecular mass relative determination. The Western Blot quantification was performed by densitometry analysis using program of Scion Image Software, version 4.03 (Scion, Frederick, MD). This program measures the intensity of each developed band in the Western Blot reaction comparing with internal control (donors plasma).

RNA extraction and cDNA synthesis

Mononuclear cell fractions were prepared from total peripheral blood samples (20 ml), using Ficoll Hypaque gradient (Teknica, Durham, NC). Mononuclear cell fraction is enriched by lymphocytes cells mainly, despite it also contains minor proportion of monocytes and macrophages. A total of 1 x 10⁶ lymphocytes/ml was submitted to RNA extraction using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following manufacturer's instructions. RNA quantification was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer with the RNA 6000 Nano LabChip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). All samples used in subsequent assays were also analysed the integrity by agarose gel electrophoresis to check 28S and 18S ribosomal rRNA. First-strand cDNA was synthesized from approximately 5 µg total RNA using 500 ng Oligo(dT)₁₂₋₁₈ and Superscript III reverse transcriptase (1st Strand Kit; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The reaction was hold at 50°C, 60 minutes, followed by 15 minutes at 70°C.

Real Time PCR

For quantitative PCR analysis 20 µl reaction included 1 X PCR buffer containing 3 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dATP, dCTP, and dGTP, 0.1 mM dTTP, 0.3 mM dUTP) (Roche Applied Science, USA), 5 µg cDNA and 1 U Platinum Taq (Invitrogen, USA). The dsDNA dye SYBR Green I PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). The primer sequences used were HPA1 forward primer 5' TGGCAAGAAGGTCTGGTTAGGAGA 3'; HPA1 reverse primer: 5'GCAAAGGTGTCGGATAGCAAGGG3'; HPA2 forward primer 5' CGCCTGTTAGACACAC TCTCTGA 3'; HPA2 reverse primer 5' GTCACCACACCTTCAAGCCAA 3'; GAPDH forward primer 5' GGAGAAGGCTGGGGCTC3'; GAPDH reverse primer 5' GTCCTTCCACGATAC CAAAG3'; RPL13a forward primer 5'TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA 3'; RPL13a reverse primer 5' CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA3'. PCR amplifications were performed in the Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 (Corbett Research), using an initial denaturation step (95°C, 90 seconds), followed by 48 cycles (annealing 60°C, 60 seconds and extension 95°C, 15 seconds). Fluorescence from the dsDNA dye SYBR Green I was acquired for each cycle after the extension step at 530 nm. The specificity of PCR was determined by post-amplification melting curve analysis. Reactions were automatically cooled to 70°C, at a rate of 3°C/s and slowly heated at 0.1°C/s to 95°C, while continuously monitoring the fluorescence.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS 13.0 program for Windows (SPSS, Chicago, IL). Variables in the study were considered parametric using the Kolmogorov-

Smirnov test. Therefore, *t*-tests and paired *t*-tests were used. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Clinical findings

In this study were included 21 patients with gastrointestinal cancer and 21 healthy individuals, named as case or patients group and control group, respectively. In control group 32 (74.4%) were men and 11 (25.6%) women with average age of 52.9 ± 5.0 years (ranging from 46 to 65 years). The patients group or case group presents 16 (76.2%) men and 5 (23.8%) women. The average age in the patients group was 68.7 ± 10.0 years (ranging from 50 to 82 years). All the patients were Caucasian.

Carcinomas were located in stomach in 5 (23.8%) patients, in colon in 5 (23.8%) patients, esophagus in 4 (19.0%) patients, in rectum in 4 (19.0%) patients, in duodenal papilla in 2 (9.5%) patients, and in liver in 1 (4.8%) patient. For histological differentiation, 4 (19.0%) lesions were poorly differentiated, 10 (47.6%) lesions were moderate differentiated and 5 (23.8%) lesions were well differentiated. In 2 (9.5%) patients, the lesions were not available for cellular differentiation grade. The lymph nodes were compromised by the tumor in 14 (66.6%) patients and free in 7 (33.3%) patients. Venous invasion occurred in 4 (19.0%) patients, lymphatic invasion in 3 (14.3%) patients, and neural infiltration were present in 2 (9.5%) patients. Of these 21 patients, distant metastasis was disclosed in 7 (33.3%) patients. Four (19.0%) patients died from metachronous metastasis or local recurrence from carcinoma.

Heparanase Analysis by Western Blot

Figure 1 shows *Western Blot* results obtained using anti-heparanase antibody (HPA1 H-80) to identify HPA1 in the plasma from a gastrointestinal carcinoma patient and the plasma from an individual that do not present neoplasia (control plasma). It can be observed two heparanase-1 bands (50 kDa and 65 kDa), and clearly it is demonstrated that heparanase-1 (HPA1) presents more intense labelled in the patient plasma compared with control plasma (Figure 1).

Heparanase-2 isoforms had also been investigated in the plasma from gastrointestinal carcinoma patients and donors using polyclonal anti-heparanase-2 antibody, HPA-2 C-17. This polyclonal antibody, HPA2 C-17 is able to identify three of HPA2 isoforms containing 480, 534 and 592 aminoacids, respectively nominated HPA2a, HPA2b and HPA2c. In the Figure 1 clearly could be observed that there is more HPA2 expression in all three isoforms in the gastrointestinal carcinoma plasma patient compared with the donor plasma (control).

In order to quantified HPA1 50 kDa and 65 kDa bands as well as HPA2 isoforms, *Western Blot* reactions was submitted to densitometry as described in methods.

The data analysis showed a significant difference in the HPA1 50 kDa plasma expression between patients with gastrointestinal carcinoma and control group ($P < 0.0001$ – test “U” Mann-Whitney). HPA1 50 kDa expression was 24.12 ± 9.70 and 53.71 ± 19.39 pixels / 2 μ g plasma proteins, respectively, in the control and gastrointestinal carcinoma patients group (Table I).

Similar results was obtained for HPA1 65 kDa expression in the plasma ($P = 0.002$ – teste “t” de Student) and is demonstrated in the Table I. HPA1 65 kDa expression

in the plasma of control group was 34.03 ± 13.60 pixels / 2 μ g of plasma proteins, while in the patients group the 65 kDa HPA1 plasma expression was significantly higher 46.67 ± 15.99 pixels / 2 μ g of plasma proteins.

The quantification analysis of HPA2 isoforms (Table I), demonstrated an average of plasma HPA2 expression of 126.95 ± 49.78 pixels / 5 μ g of plasma proteins in the control group, while patients group presented significant higher expression 196.04 ± 65.44 pixels / 5 μ g of plasma protein ($P < 0.0001$ – test “t” Student).

In the univariable statistic analysis performed in the studies, it was observed a direct correlation between the heparanases increased and the age. Therefore, the age could be a important variable in the studies, since the average age in the gastrointestinal carcinoma patients group was higher compared with the average age in the control group (donors). In conclusion, statistic analysis performed using Pearson Correlation Test demonstrated that patients who have carcinoma were older and present higher heparanases expression (HPA1 50 kDa: $R = 0.658$ and $P < 0.0001$; HPA1 65 kDa: $R = 0.380$ and $P = 0.002$; HPA2: $R = 0.345$ and $P = 0.005$), compared with control group (donors).

In order to solve the problem of variable age between control group and patients group a multivariable statistic analysis was performed and using a logistic regression it was proved that the tumor is the independent variable that can predict increase in all the heparanases isoforms. The statistic parameters obtained by the logistic regression proving that each heparanase isoforms expression are dependent of the tumor (HPA1 50 kDa: $P < 0.0001$; HPA1 65 kDa: $P = 0.002$ and HPA2: $P < 0.0001$) and the statistic parameters obtained by logistic regression

proving that heparanase isoforms are independent of age variable (HPA1 50 kDa: $P = 0.270$; HPA1 65 kDa: $P = 0.218$ and HPA2: $P = 0.717$).

Significant differences can be observed in all heparanases isoforms investigated (HPA1 50 kDa, HPA1 65 kDa and HPA2), when compared plasma expression between patients with gastrointestinal carcinomas and donors independent of age variable as previously discussed (Figure 2).

Statistical analysis demonstrated that there was no significant correlation between HPA1 50 kDa, HPA1 65 kDa or HPA2 expression and tumor differentiation, metastasis, tumor vascular invasion, tumor lymphatic invasion or tumor perineural infiltration.

It was investigated heparanase-1 and heparanase-2 expression by quantitative RT-PCR in the mononuclear cell fraction of peripheral blood from some of the patients with gastrointestinal carcinoma and donors in order to obtain more precise analysis of heparanase expression.

qRT-PCR Heparanases Analysis

Figure 3 represents the data obtained by real time RT-PCR and it can be observed that heparanase-1 expression was increased three times in the mononuclear cell fraction from patients group compared with donors, while there was an increased of six times in the heparanase-2 expression in the patients group compared with control group.

The results obtained with heparanase-1 and heparanase-2 expression in the mononuclear cell fraction corroborates with Western Blot data in the plasma samples, showing an increase in both heparanases gastrointestinal carcinoma patients compared with individuals with no neoplasia.

DISCUSSION

In normal human tissues, heparanase-1 mRNA is restricted to haematopoietic cells and placenta. In contrast, HPA2 expression is low in these tissues, but high in brain, mammary gland, prostate, small intestine, testis, uterus, and bladder. This markedly different pattern of HPA2 expression suggests that, at least in normal tissues, HPA2 and HPA1 may fulfill different functions (McKenzie *et.al.*, 2000).

The role of HPA1 in tumor development has been extensively demonstrated. This enzyme play a crucial role in the progression of gastrointestinal cancer (Naomoto *et.al.*, 2005). It was established that HPA1 facilitate malignant cell invasion through the degradation of the extracellular matrix, the rupture of the basement membrane and the derangement of cell-cell adhesion. Furthermore, HPA1 promotes tumor cell migration and support the evolution of metastatic lesions in the liver and other organs, through multiple molecular mechanisms, including growth factor release and angiogenesis (Elkin *et.al.*, 2001; Sanderson *et.al.*, 2005; Yang *et.al.*, 2005; Suarez *et.al.*, 2007).

The clinical significance of HPA1 expression in gastrointestinal tumor progression emerges from a systematic evaluation of human primary tumors using immunohistochemistry, RT-PCR and real time-PCR analysis. These studies include carcinomas of the colon (Friedmann *et.al.*, 2000), liver (El-Assal *et.al.*, 2001), pancreas (Kim *et.al.*, 2002) and gastric (Takaoka *et.al.*, 2003; Chen *et.al.*, 2004a; Chen *et.al.*, 2004b).

Heparanase-1 was related to colon cancer progression and metastasis. Friedmann *et.al.* studied the expression of heparanase in 16 patients with colon adenocarcinoma and concluded that most poorly differentiated carcinomas showed the highest expression of the enzyme; high expression was also noted in lung, lymph node, liver metastases, as

well as in the accompanying stromal fibroblasts. In contrast heparanase was low in normal tissues (Friedmann *et.al.*, 2000).

There is a significantly higher positive rate of heparanase-1 mRNA expression in gastric carcinomas (67%) than in non-cancerous gastric tissue (10%) ($P<0.05$). In addition, heparanase-1 mRNA tended to express more in those patients with serosal invasion, lymph node metastasis, advanced stage diseases, distant metastasis and larger size of tumors ($P<0.05$). However, it is still unknown of the definite roles of heparanase in the metastasis of gastric carcinomas, since metastasis in gastric carcinomas occurs not only through lymphatic and hematogenous ways but also by direct infiltration (Chen *et.al.*, 2004b).

While heparanase-1 had been exhaustively studied in tumor development and metastasis, there is not so many data in the literature concerning heparanase-2 expression and tumor progression.

Our group was pioneer to first demonstrated an over expression of HPA2, followed by syndecan-1 decreased in colorectal carcinoma compared to non neoplastic tissues, using a quantitative assay with higher sensitivity and specificity. In these studies it was proposed that HPA2 could modulate extracellular matrix possibly mediating syndecan-1 shedding due to syndecan-1 decreased in the colorectal carcinomas (Peretti *et.al.*, 2008).

In addition, it is not frequent in the literature articles describing heparanases isoforms and the possible biological functions of these proteins in tumor development. Recently, two heparanase (heparanase-1) splicing variants from *Xenopus laevis* had been studied and it was observed that both isoforms regulate the same developmental processes, but via different mechanisms (Bertolesi *et.al.*, 2008).

The heparanase gene from *Xenopus laevis* spans over 15 kb and consists of at least 12 exons. The heparanase-1 cDNA encodes a 531-amino acid protein, whereas the short splicing variant results in a protein with the same open reading frame but missing 58 amino acids as a consequence of a skipped exon 4. Comparative studies of both isoforms using heterologous expression systems showed that spliced variant heparanase is enzymatically inactive, remains associated with the membrane as a consequence of the loss of three glycosylation sites, while non spliced heparanase form is also secreted and increases cell adhesion of glioma cells to HS-coated surfaces (Bertolesi *et.al.*, 2008).

Another example of variable heparanase (or heparanase-1), isoform was reported in the blind subterranean mole rat (*Spalax ehrenbergi* superspecies), presenting 85% homologous to the human heparanase-1. The unique splice variant of the *Spalax* enzyme lacking 16 aminoacids encoded by exon 7. This deletion resulted in a major defect in trafficking and processing of the heparanase protein, leading to a loss of its enzymatic activity and indicates a possible role in adaptation to stress in *Spalax* evolution (Nasser *et.al.*, 2005).

Full-length heparanase (Heparanase-1) and the exon 5-deleted splice variant were expressed in COS-7 cells and examined by confocal laser scanning microscopy. Both proteins co-localized with calnexin, a marker protein for the endoplasmic reticulum, and they co-immunoprecipitated with calnexin (Sato *et.al.*, 2008). In addition to the 1.7 Kb heparanase transcript previously reported, a 1.5 Kb spliced variant lacking exon 5, which contains the essential glutamic acid residue required for enzyme activity. Treatment with endoglycosidases revealed that all potential N-glycosylation sites in the proteins were glycosylated. Tunicamycin treatment of transfected COS-7 cells inhibited N-glycosylation but did not change the subcellular localization. These results indicate that

overexpressed heparanase and its splice variant localize to the endoplasmic reticulum independent of glycosylation in COS-7 cells (Sato *et.al.*, 2008).

Finally biochemical studies characterizing the short glycosaminoglycans produced in Chinese hamster ovary (CHO) cells suggested that multiple heparanases are necessary for the formation of the short heparan sulfate chains (Bame *et.al.*, 1997). It was purified heparanase activity from CHO cell homogenates based on their ability to bind ion exchange resins and their elution from gel-filtration columns. Four separate heparanase activities were partially purified and all four activities cleave free glycosaminoglycans over a broad pH range of 3.5-6.0 or 6.5, suggesting that they act in the endosomal-lysosomal pathway. The sizes of the short heparin sulfate chains generated by the partially purified heparanases ranged from 6 to 9 kDa, and for two of the activities the product size is pH-dependent. Three of the four activities degrade proteoglycans as well as the free glycosaminoglycan chain.

Therefore, the results suggested that the formation of short heparan sulfate glycosaminoglycans inside CHO cells may be a result of the concerted action of multiple heparanases, and may depend on the proportions of the different enzymes and the environment in which the chains are degraded (Bame *et.al.*, 1998).

Despite, there are some studies on variable isoforms of heparanase and their biological function, no comparative evaluation between heparanases isoforms had been done concerning tumor studies.

In this study it was for the first time demonstrated that both heparanases isoforms (HPA1 and HPA2) are elevated in the plasma of gastrointestinal cancer patient. HPA1, HPA2 and isoforms was identified and quantified by Western Blot assay. The data showed a significant difference in the HPA1 50 kDa 24.12 and 53.71 pixels / 2 µg of plasma

proteins ($P < 0.0001$); HPA1 65 kDa 34.03 and 46.67 pixels / 2 μg of plasma proteins ($P = 0.002$) and HPA2 126.95 and 196.04 pixels / 5 μg of plasma protein ($P < 0.0001$), respectively, in the healthy group and gastrointestinal carcinoma patients.

Similar results had shown that heparanase (or heparanase-1) was increased in the plasma of pediatric cancer patients and closely correlate with treatment responsiveness, indicating that heparanase levels can be used to diagnose and monitor patient's response to anticancer treatment (Shafat *et.al.*, 2007).

Statistical analysis demonstrated that there was no correlation between HPA1 and HPA2 expression with tumor differentiation, metastasis, tumor vascular invasion, tumor lymphatic invasion or tumor perineural infiltration. Therefore, we suggest that to draw a further conclusion, larger sample investigations on gastric carcinomas are needed, since the cases with lymph node metastasis and vascular invasion were few. Despite, absence of clinical correlation with HPA1 and HPA2 expression, we could observed a significant plasma heparanase increased strongly correlated with gastrointestinal carcinoma in all the isoforms analyzed, HPA1 50 kDa, HPA1 65 kDa and HPA2.

Another proposed possibility of HPA2 involvement during carcinogenesis was the action through tumor cell adhesion and migration or apoptosis as described by the latent form of HPA1 65 kDa (Vlodavsky *et.al.*, 1999; Zetser *et.al.*, 2004). Therefore, HPA2 could initiate signal transduction that activates proliferation and survival of colorectal carcinoma cells independent of enzymatic activity.

The explanation of elevated levels of HPA1 50 kDa in the plasma of gastrointestinal carcinoma patients is easy due to the fact this protein presents an enzymatic activity as an endo-beta-glucuronidase. This enzyme cleaves heparan sulfate at specific sites, creating fragments of considerable sizes (5-10 kDa – 10 to 20 sugar units), which may be more

biologically active than their ancestor heparan sulfate chains (Sanderson *et.al.*, 2005; Vreys *et.al.*, 2007). Additionally, the enzyme releases factors, which are bound to heparan sulfate chains, mediating cell proliferation, migration and angiogenesis.

The possible biological function for HPA1 65 kDa and HPA2 during carcinogenesis could be the action through tumor cell adhesion and migration or apoptosis as described by the latent form of HPA1 65 kDa (Vlodavsky *et.al.*, 1999; Zetser *et.al.*, 2004). Therefore, HPA1 65 kDa and HPA2 could initiate signal transduction that activates proliferation and survival of gastrointestinal carcinoma cells independent of enzymatic activity and it could explain overexpression in the plasma of the patients compared with healthy individuals.

Taken together gastrointestinal carcinomas require an improvement in patient's prognosis, that largely depends on a reliable diagnosis. Our results strongly propose an easy and non invasive plasma test and which demonstrated that combined heparanases isoforms may prove beneficial for gastrointestinal carcinoma diagnosis.

REFERENCES

- Baker, E., J. Crawford, G. R. Sutherland, C. Freeman, C. R. Parish and M. D. Hulett (1999). "Human HPA endoglycosidase heparanase. Map position 4q21.3." Chromosome Res **7**(4): 319.
- Bame, K. J., A. Hassall, C. Sanderson, I. Venkatesan and C. Sun (1998). "Partial purification of heparanase activities in Chinese hamster ovary cells: evidence for multiple intracellular heparanases." Biochem J **336 (Pt 1)**: 191-200.
- Bame, K. J. and K. Robson (1997). "Heparanases produce distinct populations of heparan sulfate glycosaminoglycans in Chinese hamster ovary cells." J Biol Chem **272**(4): 2245-51.
- Bertolesi, G. E., G. Michaiel and S. McFarlane (2008). "Two heparanase splicing variants with distinct properties are necessary in early *Xenopus* development." J Biol Chem **283**(23): 16004-16.
- Chen, G. S., S. F. Chen and C. C. Lu (2004a). "Quantitative and qualitative analyses of DNA fragments based on electrical charge detection on a portable electrophoresis device." Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc **4**: 2647-9.

Chen, J. Q., W. H. Zhan, Y. L. He, J. S. Peng, J. P. Wang, S. R. Cai and J. P. Ma (2004b). "Expression of heparanase gene, CD44v6, MMP-7 and nm23 protein and their relationship with the invasion and metastasis of gastric carcinomas." World J Gastroenterol **10**(6): 776-82.

Dempsey, L. A., G. J. Brunn and J. L. Platt (2000). "Heparanase, a potential regulator of cell-matrix interactions." Trends Biochem Sci **25**(8): 349-51.

Edovitsky, E., I. Lerner, E. Zcharia, T. Peretz, I. Vlodayvsky and M. Elkin (2006). "Role of endothelial heparanase in delayed-type hypersensitivity." Blood **107**(9): 3609-16.

El-Assal, O. N., A. Yamanoi, T. Ono, H. Kohno and N. Nagasue (2001). "The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma." Clin Cancer Res **7**(5): 1299-305.

Eldor, A., M. Bar-Ner, J. Yahalom, Z. Fuks and I. Vlodayvsky (1987). "Role of heparanase in platelet and tumor cell interactions with the subendothelial extracellular matrix." Semin Thromb Hemost **13**(4): 475-88.

Elkin, M., I. Cohen, E. Zcharia, A. Orgel, Z. Guatta-Rangini, T. Peretz, I. Vlodayvsky and H. K. Kleinman (2003). "Regulation of heparanase gene expression by estrogen in breast cancer." Cancer Res **63**(24): 8821-6.

Elkin, M., N. Ilan, R. Ishai-Michaeli, Y. Friedmann, O. Papo, I. Pecker and I. Vlodayvsky (2001). "Heparanase as mediator of angiogenesis: mode of action." Faseb J **15**(9): 1661-3.

Fitzgerald, M., I. P. Hayward, A. C. Thomas, G. R. Campbell and J. H. Campbell (1999). "Matrix metalloproteinase can facilitate the heparanase-induced promotion of phenotype change in vascular smooth muscle cells." Atherosclerosis **145**(1): 97-106.

Friedmann, Y., I. Vlodayvsky, H. Aingorn, A. Aviv, T. Peretz, I. Pecker and O. Pappo (2000). "Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis." Am J Pathol **157**(4): 1167-75.

Goldshmidt, O., E. Zcharia, M. Cohen, H. Aingorn, I. Cohen, L. Nadav, B. Z. Katz, B. Geiger and I. Vlodayvsky (2003). "Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity." FASEB J **17**(9): 1015-25.

Hulett, M. D., C. Freeman, B. J. Hamdorf, R. T. Baker, M. J. Harris and C. R. Parish (1999). "Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis." Nat Med **5**(7): 803-9.

Hulett, M. D., J. R. Hornby, S. J. Ohms, J. Zuegg, C. Freeman, J. E. Gready and C. R. Parish (2000). "Identification of active-site residues of the pro-metastatic endoglycosidase heparanase." Biochemistry **39**(51): 15659-67.

Ishai-Michaeli, R., A. Eldor and I. Vlodayvsky (1990). "Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix." Cell Regul **1**(11): 833-42.

Kim, A. W., X. Xu, E. F. Hollinger, P. Gattuso, C. V. Godellas and R. A. Prinz (2002). "Human heparanase-1 gene expression in pancreatic adenocarcinoma." J Gastrointest Surg **6**(2): 167-72.

Marchetti, D., J. Li and R. Shen (2000). "Astrocytes contribute to the brain-metastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase." Cancer Res **60**(17): 4767-70.

McKenzie, E., K. Tyson, A. Stamps, P. Smith, P. Turner, R. Barry, M. Hircok, S. Patel, E. Barry, C. Stubberfield, J. Terrett and M. Page (2000). "Cloning and expression profiling of Hpa2, a novel mammalian heparanase family member." Biochem Biophys Res Commun **276**(3): 1170-7.

Nadav, L., A. Eldor, O. Yacoby-Zeevi, E. Zamir, I. Pecker, N. Ilan, B. Geiger, I. Vlodayvsky and B. Z. Katz (2002). "Activation, processing and trafficking of extracellular heparanase by primary human fibroblasts." J Cell Sci **115**(Pt 10): 2179-87.

Naomoto, Y., M. Takaoka, T. Okawa, T. Nobuhisa, M. Gunduz and N. Tanaka (2005). "The role of heparanase in gastrointestinal cancer (Review)." Oncol Rep **14**(1): 3-8.

Nasser, N. J., E. Nevo, I. Shafat, N. Ilan, I. Vlodayvsky and A. Avivi (2005). "Adaptive evolution of heparanase in hypoxia-tolerant *Spalax*: gene cloning and identification of a unique splice variant." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(42): 15161-6.

Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2001). "Estimating the world cancer burden: Globocan 2000." Int J Cancer **94**(2): 153-6.

Peretti, T., J. Waisberg, A. M. Mader, L. L. de Matos, R. B. da Costa, G. M. Conceicao, A. C. Lopes, H. B. Nader and M. A. Pinhal (2008). "Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma." Eur J Gastroenterol Hepatol **20**(8): 756-65.

Sanderson, R. D., Y. Yang, T. Kelly, V. MacLeod, Y. Dai and A. Theus (2005). "Enzymatic remodeling of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment: growth regulation and the prospect of new cancer therapies." J Cell Biochem **96**(5): 897-905.

Sato, M., K. Amemiya, S. Hayakawa and H. Munakata (2008). "Subcellular localization of human heparanase and its alternative splice variant in COS-7 cells." Cell Biochem Funct **26**(6): 676-83.

Shafat, I., A. B. Barak, S. Postovsky, R. Elhasid, N. Ilan, I. Vlodayvsky and M. W. Arush (2007). "Heparanase levels are elevated in the plasma of pediatric cancer patients and correlate with response to anticancer treatment." Neoplasia **9**(11): 909-16.

Shteper, P. J., E. Zcharia, Y. Ashhab, T. Peretz, I. Vlodayvsky and D. Ben-Yehuda (2003). "Role of promoter methylation in regulation of the mammalian heparanase gene." Oncogene **22**(49): 7737-49.

Simizu, S., K. Ishida, M. K. Wierzbza and H. Osada (2004). "Secretion of heparanase protein is regulated by glycosylation in human tumor cell lines." J Biol Chem **279**(4): 2697-703.

Suarez, E. R., A. S. Nohara, F. D. Mataveli, L. L. de Matos, H. B. Nader and M. A. Pinhal (2007). "Glycosaminoglycan synthesis and shedding induced by growth factors are cell and compound specific." Growth Factors **25**(1): 50-9.

Takaoka, M., Y. Naomoto, T. Ohkawa, H. Uetsuka, Y. Shirakawa, F. Uno, T. Fujiwara, M. Gunduz, H. Nagatsuka, M. Nakajima, N. Tanaka and M. Haisa (2003). "Heparanase expression correlates with invasion and poor prognosis in gastric cancers." Lab Invest **83**(5): 613-22.

Vlodayvsky, I., A. Eldor, A. Haimovitz-Friedman, Y. Matzner, R. Ishai-Michaeli, O. Lider, Y. Naparstek, I. R. Cohen and Z. Fuks (1992). "Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation." Invasion Metastasis **12**(2): 112-27.

Vlodayvsky, I., Y. Friedmann, M. Elkin, H. Aingorn, R. Atzmon, R. Ishai-Michaeli, M. Bitan, O. Pappo, T. Peretz, I. Michal, L. Spector and I. Pecker (1999). "Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis." Nat Med **5**(7): 793-802.

Vlodayvsky, I. and O. Goldshmidt (2001a). "Properties and function of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis." Haemostasis **31 Suppl 1**: 60-3.

Vlodavsky, I., O. Goldshmidt, E. Zcharia, S. Metzger, T. Chajek-Shaul, R. Atzmon, Z. Guatta-Rangini and Y. Friedmann (2001b). "Molecular properties and involvement of heparanase in cancer progression and normal development." Biochimie **83**(8): 831-9.

Vlodavsky, I., D. Komarek, M. Hoyhtya, M. Huaquan and R. Fridman (1993). "Extracellular-Matrix Produced by Corneal Endothelial-Cells Contains the 72 Kd Gelatinase Type-Iv Collagenase." Journal of Cellular Biochemistry: 157-157.

Vreys, V. and G. David (2007). "Mammalian heparanase: what is the message?" J Cell Mol Med **11**(3): 427-52.

Vreys, V., N. Delande, Z. Zhang, C. Coomans, A. Roebroek, J. Durr and G. David (2005). "Cellular uptake of mammalian heparanase precursor involves low density lipoprotein receptor-related proteins, mannose 6-phosphate receptors, and heparan sulfate proteoglycans." J Biol Chem **280**(39): 33141-8.

Yang, Y., V. Macleod, M. Bendre, Y. Huang, A. M. Theus, H. Q. Miao, P. Kussie, S. Yaccoby, J. Epstein, L. J. Suva, T. Kelly and R. D. Sanderson (2005). "Heparanase promotes the spontaneous metastasis of myeloma cells to bone." Blood **105**(3): 1303-9.

Zetser, A., F. Levy-Adam, V. Kaplan, S. Gingis-Velitski, Y. Bashenko, S. Schubert, M. Y. Flugelman, I. Vlodavsky and N. Ilan (2004). "Processing and activation of latent heparanase occurs in lysosomes." J Cell Sci **117**(Pt 11): 2249-58.

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](#)