

MARINA CURADO VALSECHI

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE GPC3 EM CARCINOMA
RENAL DE CÉLULAS CLARAS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
Co-orientadora: Dr^a. Marília de Freitas Calmon

São José do Rio Preto
2013

MARINA CURADO VALSECHI

**ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE GPC3 EM CARCINOMA
RENAL DE CÉLULAS CLARAS**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Dr^a. Ana Carolina Gomes Jardim
Universidade de Leeds- UK

Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior
Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto

Prof^a. Dr^a. Ana Elizabete Silva
UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Oliani
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 14 de Agosto de 2013

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP), com auxílio financeiro e bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Dedico esse trabalho...

À minha orientadora, Paula Rahal, pela amizade, por me incentivar, acreditar em mim e me ensinar tudo o que eu sei hoje.

Aos meus amados pais, Linoel e Elza, que sempre estiveram ao meu lado e nunca mediram esforços para a concretização dos meus sonhos. Não tenho palavras para descrever o amor que sinto por vocês.

Aos meus queridos irmãos e amigos, Marília e Linoel, pela amizade eterna, cumplicidade e união, e por estarem sempre ao meu lado me dando força. Amo vocês!!!

Ao meu namorado, Rui, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida, vibrando com minhas conquistas, me apoiando e me dando força. Amo você!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Paula Rahal, por esses 8 anos de convivência, pela amizade, apoio, conselhos e incentivo. Agradeço a confiança em mim depositada, a oportunidade que tive de trabalharmos juntas e o conhecimento adquirido ao longo desses anos. Obrigada por me fazer acreditar que eu era capaz e que iria conseguir chegar até aqui. Obrigada pelos conselhos, profissionais e pessoais, e pelas palavras sábias nos momentos certos. Obrigada por tudo!

À minha co-orientadora e amiga, Marília de Feitas Calmon, por todo o auxílio durante a realização e finalização desse trabalho, pelo incentivo, conselhos, apoio nos momentos difíceis e paciência. Obrigada por contribuir com meu conhecimento. Sem você, seria muito mais difícil.

À coordenadora e vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação, Profa. Dra. Cláudia Márcia Aparecida Carareto e Profa. Dra. Sônia Maria Oliani, pela atenção e disponibilidade em auxiliar nos problemas burocráticos e pela preocupação constante na formação dos alunos pós-graduandos.

Aos membros do Conselho de Pós-graduação em Genética, pela preocupação em auxiliar e atender os alunos, bem como pela disponibilidade em melhorar nosso programa.

Aos Membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pela disponibilidade em analisar e contribuir com o meu trabalho.

À Profa. Dra. Sônia Maria Oliani, por ter cedido espaço em seu laboratório e disponibilizado o Citômetro de Fluxo, para realização de parte das análises experimentais desse trabalho, e por estar sempre preocupada e disposta a me ajudar com a obtenção dos meus resultados.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, por ter cedido espaço em seu laboratório para a realização da técnica de Imunocitoquímica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro disponibilizado, essencial para realização desse trabalho, e iniciativa em incentivar as pesquisas.

À Analice, que sempre me auxiliou nas análises da citometria de fluxo, pelo apoio, pelos momentos de descontração.

À Lenira, pelo apoio, amizade, conselhos e disponibilidade em me atender e auxiliar em todos os momentos que bati em sua porta.

À minha amiga Paola, pela nossa amizade, pelos sábios conselhos, pela paciência e por me ouvir nos momentos em que eu mais precisava. Obrigada por me incentivar e torcer por mim.

À minha amiga Carol Bonfim, pela amizade, apoio, conselhos e pelos agradáveis momentos na hora do almoço.

Às amigas Carol Jardim, Cíntia e Lilian, pelo apoio, amizade, incentivo e auxílio sempre que necessário. E, é claro, pela companhia em nossos momentos de diversão.

Aos meus amigos Bruna e André, pela amizade, pelo auxílio nesse trabalho, pela paciência em me ouvir, pelos conselhos e apoio e também pelos momentos agradáveis na hora do almoço.

À Mariana, por sempre me auxiliar no almoxarifado, pelas nossas conversas e pela companhia na hora do almoço.

À minha ex-aluna de co-orientação e amiga Ana Beatriz, pelo aprendizado recíproco, pela paciência, companheirismo e por sempre me ajudar nos momentos em que precisava.

Aos meus amigos do Laboratório de Estudos Genômicos, pela convivência, pelos bons momentos e auxílio na realização desse trabalho. Cada um teve sua participação direta ou indireta nesse trabalho. Paola, Marília, Carol Jardim, Cíntia, Carol Bonfim, Bruno, Lilian, André, Bruna, Natália, Ana Cláudia, Mariana, Renata, Henrique, Ana Beatriz, Guilherme, Jaqueline, Rodolfo, Marina, Lucas, Karina, Mônica, Letícia, Álvaro, Raphael, Gabriel, obrigada pela convivência durante todo esse tempo.

Aos meus amigos de longa data Vivian, Maria Carolina, Vinícius, Renan, Juliana, Aline, Adriana, Andressa e Hederson. Obrigada pela amizade, por me apoiarem, me incentivarem e torcerem pelo meu crescimento, mesmo não estando sempre presentes.

À minha madrinha Ana Rosa e minha amiga Natália, que sempre me apoiaram, se preocuparam e torceram por mim. Obrigada pelo carinho, apoio e conselhos sempre bem vindos.

À família Curado e Valsechi, pelo carinho, amizade, conselhos, por me incentivarem e torcerem para meu crescimento pessoal e profissional. Todos vocês são muito importantes na minha vida.

Às minhas tias Rosa e Maria do Céu, pelas orações, por torcerem e estarem ao meu lado. Obrigada por tudo o que vocês fizeram e continuam fazendo por mim.

Aos meus sogros, Alfredo e Teresinha, pelo carinho, apoio, amparo nos momentos mais difíceis, palavras de conforto, momentos agradáveis e pela torcida para que tudo desse certo.

Aos meus cunhados Paulo e Talita, por me incentivarem, me apoiarem, me auxiliarem, principalmente na etapa final. Obrigada pelos conselhos e palavras de conforto.

Ao meu cunhado Luís Fernando, pelo apoio, torcida e momentos agradáveis.

Ao meu mais novo cunhado, Leonardo, pela torcida, apoio e pelos seus grandes conselhos.

À minha cunhada Juliana, pela sua amizade, pelo carinho, pelas suas palavras de conforto, por estar sempre disposta a me ajudar em qualquer momento. Obrigada por torcer e acreditar em mim.

Ao meu grande amigo e irmão, Linoel, pela nossa eterna amizade, pelo carinho, compreensão, por me incentivar, torcer e acreditar em mim. Obrigada por me ouvir, me aconselhar e pela força nos momentos mais difíceis da minha vida.

À minha irmã e melhor amiga, Marília, pela sua amizade, carinho e compreensão. Por estar sempre ao meu lado, torcendo para meu crescimento pessoal e profissional, por me ouvir e me aconselhar. Obrigada por ler e corrigir o meu trabalho e pelas sugestões, sempre muito bem-vindas. Obrigada por sempre estar ao meu lado.

Aos meus queridos e amados pais, Linoel e Elza, pela minha vida, pelo amor, carinho e dedicação. Pela minha educação, formação, dedicação e paciência comigo, pelos conselhos e sábias palavras. Obrigada por acreditarem na minha capacidade, por me incentivarem e por não me deixar desistir de tudo que eu sempre quis frente aos obstáculos encontrados no meio do caminho. Agradeço a participação intensa de vocês na minha vida e por me fazerem enxergar que a vida não é um mar de rosas, que é preciso ter força e coragem. Tudo o que sou hoje e o que alcancei até aqui foi por vocês existirem na minha vida. Devo tudo isso a vocês, os responsáveis pela minha existência.

Ao meu namorado, Rui, pelo amor, carinho, compreensão nos momentos difíceis. Obrigada por estar sempre presente na minha vida, até mesmo nos fins de semana e feriados que passávamos no laboratório para eu cuidar das minhas células. Obrigada por sempre me incentivar, me apoiar, torcer e não me deixar desistir. Agradeço por vibrar com as minhas vitórias e por me ajudar a me reerguer diante das dificuldades e das derrotas. Sem o seu apoio, tudo seria mais difícil.

A Deus, pela minha vida, pelas minhas conquistas e vitórias e por tudo que sou hoje.

E a todos que não foram mencionados, mas que, de alguma forma, estiveram presentes e torceram por mim.

Muito obrigada!!!

A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos.

(Charles Chaplin)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection (Coleção Tipos de Cultura Americana)
BSA	Bovine Serum Albumin (Soro de Albumina Bovina)
<i>BHD</i>	Birt-Hugg Dubé
<i>CAIX</i>	Carbonic Anhydrase IX (Anidrase Carbônica IX)
CCRCC	Clear Cell Renal Cell Carcinoma (Carcinoma Renal de Células Claras)
cDNA	Complementary DNA (DNA complementar)
C_T	Cycle Threshold (Ciclo do Limiar)
DAB	3'3-Diaminobenzidine (3'3-Diaminobenzidina)
ECM	Extra Cellular Matrix (Matriz Extracelular)
FBS	Fetal Bovine Serum (Soro Fetal Bovino)
GAG	Glycosaminoglycan (Glicosaminoglicano)
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase)
<i>GPC3</i>	Glypican 3 (Glipican-3)
GPI	Glycosylphosphatidylinositol (Glicosilfosfatidilinositol)
HCC	Hepatocellular Carcinoma (Carcinoma Hepatocelular)
<i>HIF</i>	Hypoxia Inducible Factor (Fator Indutor de Hipóxia)
HS	Heparin Sulfate (Heparina sulfatada)
HSPG	Heparin Sulfate Proteoglycan (Proteoglicano de Heparina)

	Sulfatada)
IMC	Índice de Massa Corpórea
mRNA	Messenger RNA (RNA mensageiro)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-Diphenyl-Tetrazolium Bromide (3-(4,5- Dimetiltiazol-2-il)2,5- Difenil-Tetrazolium Brometo
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tampão Fosfato Salino)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PI	Propidium Iodide (Iodeto de Propídeo)
RCC	Renal Cell Carcinoma (Carcinoma Renal)
qRT-PCR	quantitative Real Time- PCR (PCR em Tempo Real Quantitativo)
<i>VEGF</i>	Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Vascular Endotelial)
<i>VHL</i>	Von-Hippel-Lindau
TCE	Thrychlorethylene (Tricloroetileno)
<i>TFE3</i>	Transcription Factor E3 (Fator de Transcrição E3)
TNM	TNM stage (Estadiamento: Tumor, Nódulo Linfático, Metástase)

RESUMO

GPC3 (Glipican-3) é membro de uma família de proteoglicano de heparina sulfatada (HSPG). O *GPC3* pode atuar controlando a migração celular, regulação negativa do crescimento celular e indução de apoptose. Esse gene é relatado por estar hipoexpresso em vários tipos de cânceres, o que pode resultar no crescimento celular descontrolado e contribuir para o fenótipo maligno de alguns tumores. O objetivo desse estudo foi analisar o mecanismo de ação do gene *GPC3* em carcinoma renal de células claras (CCRCC). Primeiramente, foi construído o vetor de expressão e transfectado nas linhagens celulares de carcinoma renal ACHN e 786-O. A expressão de *GPC3* foi analisada usando qRT-PCR e imunohistoquímica. A proliferação celular foi avaliada usando o MTT e o ensaio de formação de colônia. Análises de apoptose e ciclo celular foram avaliadas por citometria de fluxo. Foi observado que o gene *GPC3* estava com baixa expressão em amostras de carcinoma renal de células claras e nas linhagens celulares quando comparado com amostras renais normais. Foi observado que a expressão de RNAm e os níveis de proteína *GPC3* aumentaram após a transfecção com o vetor de expressão contendo a ORF de *GPC3* nas linhagens celulares. A taxa de proliferação celular diminuiu nas células superexpressando *GPC3* em ambas as linhagens, ACHN e 786-O ($p < 0,01$). A apoptose não foi observada nas linhagens celulares de carcinoma renal superexpressando *GPC3* ($p > 0,05$); entretanto, ocorreu um aumento na população de células na fase G1 do

ciclo celular ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem que o gene GPC3 reduz a taxa de proliferação celular por meio da parada do ciclo celular na fase G1 em carcinoma renal.

Palavras-chave: GPC3; linhagens celulares; proliferação celular; carcinoma renal; transfecção.

ABSTRACT

Background: GPC3 (Glypican 3) is a member of the family of glypican heparan sulfate proteoglycans (HSPG). The GPC3 gene may play a role in controlling cell migration, negative regulation of cell growth and induction of apoptosis. This gene is reported to be downregulated in several cancers, which can result in uncontrolled cell growth and which can also contribute to the malignant phenotype of some tumors. The purpose of this study was to analyze the mechanism of action of the GPC3 gene in clear cell renal cell carcinoma (CCRCC). **Methods:** First, we constructed the expression vector and transfected renal carcinoma cell lines. GPC3 expression was analyzed using qRT-PCR and immunohistochemistry. We evaluated cell proliferation using MTT and colony formation assays. Apoptosis and cell cycle analyses were evaluated using flow cytometry. **Results:** We observed that the GPC3 gene was downexpressed in the clear cell renal cell carcinoma samples and in cell lines, which were both compared to normal renal samples. We observed that GPC3 mRNA expression and protein levels increased after the transfection into ACHN and 786-O cell lines. We found that the cell proliferation rate decreased in cells overexpressing GPC3 in both cell lines, ACHN and 786-O ($p < 0.01$). Also, apoptosis in the renal cell carcinoma cell line was not observed in cells overexpressing GPC3 ($p > 0.05$), but there was an increase in the cell population during the G1 phase in the cell cycle ($p < 0.05$). **Conclusion:** We suggest that the GPC3

gene reduced the cell proliferation rate through cell cycle arrest during the G1 phase in renal cell carcinoma.

Key-words: GPC3, cell lines, cell proliferation, renal carcinoma, transfection.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	19
1.1Tumor Renal.....	19
1.1.1 Epidemiologia.....	19
1.1.2 Classificação do Carcinoma Renal.....	20
1.1.3 Fatores de Risco	27
1.1.4 Diagnóstico.....	30
1.1.5 Prognóstico	31
1.1.6 Tratamento	35
1.1.7 Ocorrência.....	36
1.1.8 Marcadores Moleculares em Carcinoma renal	37
1.2 GPC3.....	41
1.3 Caracterização Funcional na Carcinogênese	45
2 OBJETIVOS	48
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	51
ABSTRACT	52
INTRODUCTION	53
MATERIAL E METHODS	55
Clear cell renal cell carcinoma samples	55
Cell Lines.....	55
Plasmid Construction	56
Transfection.....	56
Immunocitochemistry	58
Colony Formation Assay	58

Proliferation Assay	59
Apoptosis Assay	59
Cell Cycle Analysis	60
Statistical Analysis	60
RESULTS	61
Analysis of the GPC3 gene expression in clear cell renal cell carcinoma samples and renal carcinoma cell lines	61
GPC3 supresses colony formation	62
Effect of GPC3 on proliferation in cell lines	62
Effect of GPC3 on Apoptosis in cell lines	63
GPC3 Alters Cell Cyclo Progression	63
DISCUSSION	64
CONCLUSION	67
ACKNOWLEDGEMENTS	67
REFERENCES	68
FIGURES LEGENDS	74
TABLES	76
FIGURES	77
4. DISCUSSÃO	84
5. CONCLUSÃO	91
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumor Renal

1.1.1 Epidemiologia

O carcinoma renal (RCC) é o tipo mais comum de tumor renal e a mais letal doença urológica. (GIANAZZA et al., 2012; JEONG et al., 2012), sendo responsável por 4% das mortes no mundo (LEE et al., 2012). A incidência desse tumor vem aumentando nas últimas décadas (VAN POPPEL et al., 2011; KIM et al., 2012) e cerca de 100.000 pessoas morrem a cada ano dessa doença (CAI et al., 2012). Segundo Jeong e colaboradores são estimados, anualmente, 200.000 novos casos no mundo (JEONG et al., 2012). Nos Estados Unidos, foram previstos 39.000 novos casos e 13.000 mortes por ano (WONDERGEM et al., 2012).

A incidência dos pacientes diagnosticados com carcinoma renal tem aumentado devido aos recentes avanços na detecção precoce dos tumores renais, proporcionada pela melhoria nas técnicas de diagnóstico de imagem, como ultrassonografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética (DRUCKER, 2005; LANG et al., 2007; MARTIGNONI et al., 2007; GIRGIS et al., 2012; ZHAO et al., 2013).

O carcinoma renal acomete mais homens que mulheres e ocorre com mais frequência em indivíduos com idade avançada, de 50 a 70 anos (MARTIGNONI et al., 2007). Essa diferença na taxa de incidência pode estar relacionada a fatores reprodutivos, incluindo idade materna ao

nascimento do primogênito, uso de hormônios e uso oral de contraceptivos (MARTIGNONI et al., 2007). Tem sido observado que as mulheres apresentam melhores taxas de sobrevivência após a cirurgia em relação aos homens (MARTIGNONI et al., 2007).

1.1.2 Classificação do Carcinoma Renal

O RCC é uma doença heterogênea, baseada em diferenças na morfologia, características genéticas e comportamento clínico, que está dividida em vários subtipos histológicos (DASTE et al., 2013). Os subtipos são: células claras, papilífero, cromofóbico, ducto coletor, medular, oncocitoma, carcinoma mucinoso tubular e de células fusiformes, carcinoma renal associado à translocação e carcinomas não classificados (Figura 1) (MOCH, 2013; PURDUE et al., 2013). A classificação histopatológica é baseada na localização do néfron, nas características citoplasmáticas e no tipo de célula que originou o tumor (DRUCKER, 2005). A tabela 1 mostra a prevalência dos vários subtipos de carcinoma renal.

O carcinoma renal de células claras é o mais frequente subtipo de tumor renal, que acomete de 75% a 80% dos tumores renais, e o que apresenta o pior prognóstico (NELSON; EVANS; LARA, 2007). Esse carcinoma é originado das células dos túbulos proximal dos néfrons

(NELSON; EVANS; LARA, 2007). Histologicamente, apresenta-se como um tumor sólido, alveolar, contendo uma rede de vasos sanguíneos de paredes finas. O citoplasma é constituído de lipídeos e glicogênio, os quais se dissolvem durante o processamento histológico e origina um citoplasma claro envolvido por membranas distintas (HAGENKORD et al., 2011; SIRCAR et al., 2012). A patogênese do carcinoma renal de células claras é baseada em duas vias moleculares: a via de indução da hipóxia, que está associada à mutação do gene supressor tumoral Von Hippel-Lindau (*VHL*), e a via de sinalização mTOR (DENG; MELAMED, 2012). Von Hippel Lindau é uma síndrome de predisposição ao câncer autossômica dominante, causada por uma mutação no gene supressor tumoral *VHL*, localizado no cromossomo 3p25-p26. Pacientes com a doença VHL apresentam uma predisposição para o desenvolvimento do carcinoma renal de células claras (HAGENKORD et al., 2011).

O carcinoma papilífero acomete cerca de 10% a 15% dos carcinomas renais, sendo considerado o segundo tipo mais comum de carcinoma dos túbulos proximais renais (ZHANG et al., 2013). Esse tumor é caracterizado, histologicamente, pela presença de papilas, apresentando núcleos com agregados de macrófagos, grânulos citoplasmáticos de hemosiderina e cálcio (NELSON; EVANS; LARA, 2007), revestida por células neoplásicas e está subdividido em tipo 1 e tipo 2. No tipo 1, as células tumorais são pequenas e o citoplasma é escasso; no tipo 2, as células mostram-se pseudoestratificadas e o

citoplasma é eosinofílico (XU; WEIDNER, 2012; MOCH, 2013). Esses tipos histológicos se diferem em frequência por idade, sexo e raça, e ainda podem apresentar distintas etiologias. Na maioria dos casos de carcinoma papilífero, a alteração genética mais comum é a trissomia dos cromossomos 7 e 17 (PURDUE et al., 2013).

O carcinoma cromofóbico acomete 5% dos tumores renais. O tumor é caracterizado por células poligonais, algumas irregulares e multinucleadas, com citoplasma reticulado e membranas celulares proeminentes (BAI; WU, 2012; MOCH, 2013). Esse tumor mostra múltiplas anomalias citogenéticas, dentre elas, a perda dos cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 15, 17 e 21 (MAHER, 2013). A síndrome Birt-Hogg-Dubé é sugerida como a doença hereditária desse tumor, na qual podem existir tumores multifocais e bilaterais. O gene *BHD* (Birt-Hogg-Dubé), situado no cromossomo 17p, produz a proteína foliculina, cuja função é de supressor tumoral (DENG; MELAMED, 2012).

O carcinoma de ducto coletor é o tipo mais raro de carcinoma renal: acomete 1% de todos os tipos de câncer renal. Este tumor, localizado na região central do rim, é extremamente agressivo, e as metástases são frequentes (MOCH, 2013), afetando mais homens que mulheres (ELWOOD et al., 2011). Histologicamente, esse carcinoma é caracterizado por uma arquitetura composta de túbulos e papilas, revestidas por uma camada de células cubóides. As anomalias citogenéticas incluem monossomias dos cromossomos 1, 6, 14, 15 e 22,

com perda alélica dos braços 1q, 6p, 8p, 13q e 21q (SOUNG SULLIVAN et al., 2007; MOCH, 2013).

O carcinoma medular pode ser considerado uma variante do carcinoma de ducto coletor, está associado a pacientes com traço falciforme ou anemia, tem um prognóstico ruim (SOUNG SULLIVAN et al., 2007; ALGABA et al., 2011). Alguns estudos têm descrito que a ativação do fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*) pode estar relacionada com este carcinoma (SWARTZ et al., 2002; ALGABA et al., 2011).

Os oncocitomas são tumores benignos raros e correspondem de 3% a 10% de todos os tumores renais (BENATIYA et al., 2012). Esses tumores são caracterizados por células grandes com citoplasma eosinofílico granular, apresentando um grande número de mitocôndrias (YUSENKO, 2010). As alterações cromossômicas desse tipo de tumor ainda não estão bem caracterizadas; entretanto, alguns estudos genéticos têm mostrado que a perda parcial ou completa do cromossomo 1p é a mais comum alteração em ambos os tumores, esporádicos ou familiares (PICKEN, 2010).

O carcinoma mucinoso tubular e de células fusiformes é um carcinoma renal de baixo grau, caracterizado por células tubulares e estroma mucinoso (BALDEWIJNS et al., 2008). Geralmente, este carcinoma se apresenta como assintomático e, na maioria dos casos, o prognóstico é favorável (MOCH, 2013). Alguns autores acreditam que

este tumor pode ser uma variante do RCC papilar com origem no túbulo proximal (BALDEWIJNS et al., 2008; ALGABA et al., 2011).

O carcinoma renal associado a translocações é um tumor incomum, que geralmente afeta crianças e jovens adultos. Histologicamente, carcinomas com translocação apresentam uma arquitetura papilar composta de células claras com um volumoso e claro citoplasma eosinofílico (MOCH, 2013). A maioria das translocações, cerca de 90%, envolve o fator de transcrição E3 (TFE3), localizado no cromossomo Xp11.2 (BAI; WU, 2012). O carcinoma associado à translocação Xp11 é clinicamente agressivo; a maioria apresentando metástases (SIRCAR et al., 2012).

Carcinomas renais não classificados é uma categoria de diagnóstico, e não um tipo específico, que é utilizada para designar os carcinomas renais que não se encontram nos demais subtipos histológicos. São reconhecidos por constituírem um grupo heterogêneo; portanto, não apresentam uma forma limitada (DENG; MELAMED, 2012). Algumas características definem este carcinoma, como: produção de mucina, misturas de elementos epiteliais e do estroma e tipos celulares irreconhecíveis (ALGABA et al., 2011; DENG; MELAMED, 2012).

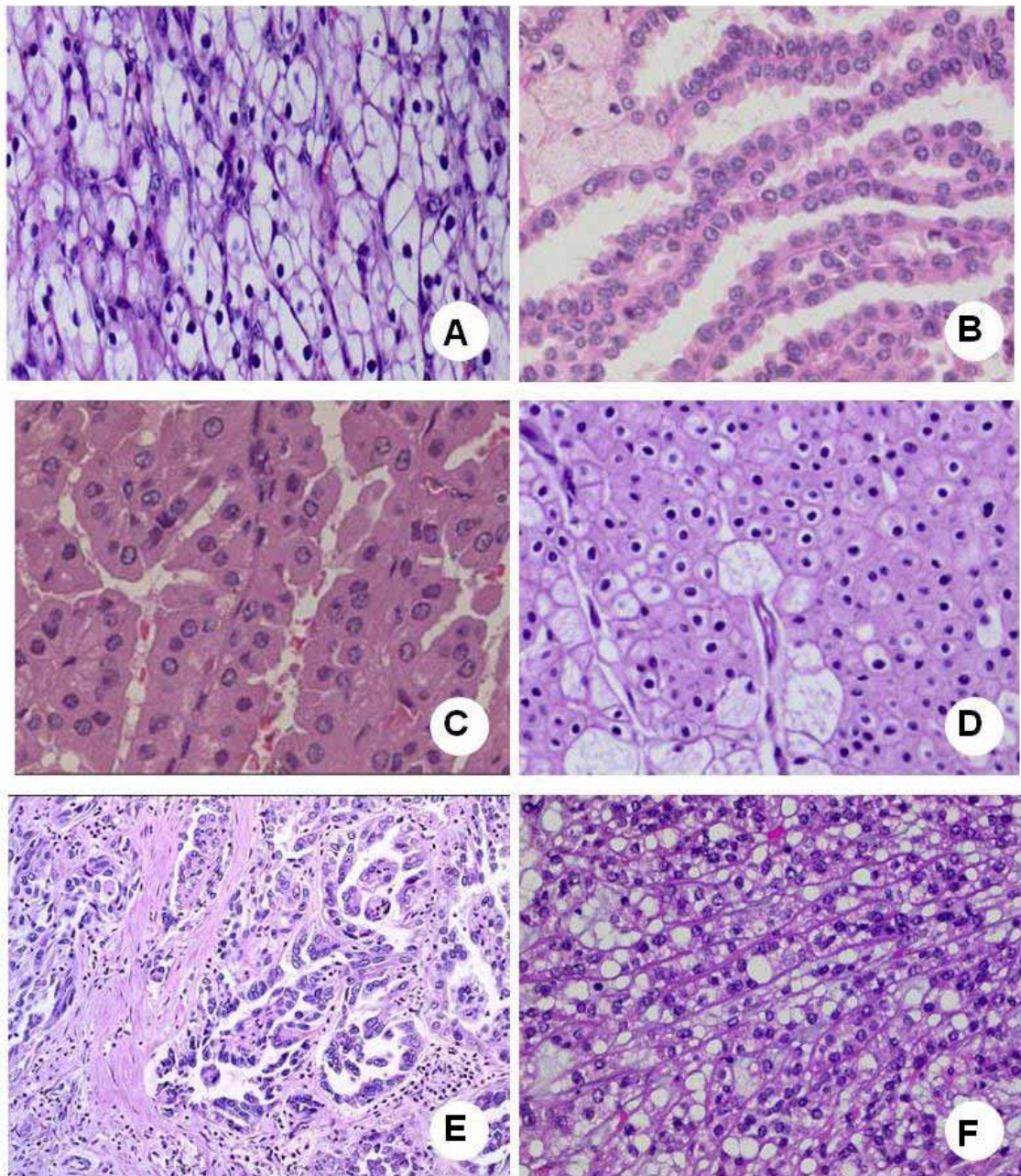


Figura 1: Cortes histológicos mostrando os tipos de carcinoma renal. (A) Carcinoma renal de células claras: células tumorais com citoplasma claro e abundante, e uma rede de vasos sanguíneos. (B) Papilífero Tipo I: células tumorais pequenas e cuboidais. (C) Papilífero Tipo II: células tumorais grandes com citoplasma eosinofílico. (D) Cromofóbico: células tumorais com membranas proeminentes. (E) Ducto Coletor: arquitetura túbulo-papilar revestida por células cuboides. (F) Carcinoma mucinoso tubular e de células fusiformes: células

tumorais tubulares e estroma mucinoso (Modificado de (DENG; MELAMED, 2012; MOCH, 2013)).

Tabela 1: Classificação e Prevalência do Carcinoma Renal

Câncer Renal	Prevalência	Alterações Genéticas
Carcinoma Renal de Células Claras	75-80%	Deleção no cromossomo 3p, mutações no gene Von Hippel-Lindau
Carcinoma Papilífero	10-15%	Trissomias dos cromossomos 7 e 17
Carcinoma Cromofóbico	5%	Síndrome de Birt-Hogg-Dubé, perda do cromossomo 17
Carcinoma de Ducto Coletor	<1%	
Oncocitoma		Perda parcial ou completa do cromossomo 1p
Carcinoma mucinoso e de células fusiformes	<1%	
Carcinoma Renal associado à Translocação	<1%	Translocações envolvendo o cromossomo Xp11.2
Carcinoma renal não classificado	4-7%	

1.1.3 Fatores de Risco

A causa do carcinoma renal ainda é desconhecida, entretanto, vários fatores de risco têm sido associados à doença (LABER, 2006); dentre eles, o tabaco, a obesidade e a hipertensão são os três mais bem estabelecidos (DECASTRO; MCKIERNAN, 2008). Outros fatores também têm sido associados incidência do carcinoma renal: álcool, dieta, atividade física e exposição ocupacional (LABER, 2006; CHOW; DEVESA, 2008; ESPER, 2012).

O tabaco é o mais significativo fator de risco, sendo responsável por mais de 20% dos carcinomas renais (ROBERTO PILI, 2008). A incidência de câncer renal em fumantes de cigarro é o dobro da incidência em relação aos não-fumantes, e os fumantes de cachimbo e charuto também são suscetíveis à doença (BAI; WU, 2012). O risco dos fumantes desenvolverem o carcinoma está diretamente relacionado à intensidade (quantidade de cigarro) e duração (tempo) do fumo (LABER, 2006). Alguns estudos sugerem que a interrupção do tabaco, por um longo período (20 anos ou mais), pode reduzir o risco da doença (PARKER et al., 2003; LJUNGBERG et al., 2011).

A obesidade é um fator de risco bem estabelecido, responsável por mais de 30% dos carcinomas renais (ROBERTO PILI, 2008). Uma análise de estudos prospectivos mostra uma evidência de associação entre o índice de massa corpórea (IMC) e o aumento do risco de desenvolvimento de tumor renal em homens e mulheres (CHOW;

DEVESA, 2008; LJUNGBERG et al., 2011). Vários mecanismos têm sido propostos para analisar como a obesidade pode ser relacionada ao desenvolvimento de tumores renais. Alguns pesquisadores têm relatado o papel endócrino e metabólico do tecido adiposo. A obesidade pode ocasionar o aumento de liberação de adipocinas, como ácidos graxos, e do fator de necrose tumoral. As adipocinas, juntamente com a hiperinsulinemia e o fator de aumento de insulina-1 associado à obesidade, podem levar à proliferação celular, redução da apoptose e tumorigênese (DECASTRO; MCKIERNAN, 2008).

A hipertensão influencia o desenvolvimento do carcinoma renal, sendo considerada o terceiro fator de risco da doença. Um estudo baseado em registros médicos revelou que o risco de câncer renal é maior com o aumento da pressão sanguínea dentro de 5 a 10 anos antes do diagnóstico do câncer. Outro estudo relata que a pressão arterial não distingue os diferentes tipos celulares de tumor renal (CHOW et al., 2000). A medicação anti-hipertensiva também tem sido relacionada com o elevado risco da doença. Os mecanismos biológicos responsáveis pela associação entre a hipertensão e o risco do carcinoma renal ainda não estão claros (CHO; ADAMI; LINDBLAD, 2011).

Embora o álcool seja relacionado com o elevado risco de vários tipos de câncer, estudos epidemiológicos têm mostrado uma relação inversa entre o risco de desenvolvimento do carcinoma renal e o consumo moderado de álcool (NICODEMUS; SWEENEY; FOLSOM, 2004;

GREVING et al., 2007; CHO; ADAMI; LINDBLAD, 2011). Essa relação foi observada nos seguintes tipos de bebidas alcoólicas: cerveja, vinho e licor. Greving e colaboradores (2007) mostraram que o moderado consumo de álcool está associado ao baixo risco da doença. O aumento da sensibilidade à insulina pode ser o mecanismo pelo qual esse consumo reduzido de álcool diminui o risco de diabetes do tipo 2 e o risco do câncer renal (GREVING et al., 2007).

Algumas evidências mostram que a atividade física pode reduzir o risco de câncer renal por meio de várias vias relacionadas, incluindo a redução do peso corporal e da pressão sanguínea, que melhora a sensibilidade à insulina e reduz a inflamação crônica e o estresse oxidativo (CHOW; DEVESA, 2008).

A exposição ocupacional não é um típico fator de risco do carcinoma renal; entretanto, a exposição a determinados compostos tóxicos, como o tricloroetileno (TCE), pode aumentar o risco da doença. O TCE é um solvente usado como desengordurante e aditivo químico. A Agência de Pesquisa Internacional do Câncer classifica o TCE como um carcinógeno humano, no entanto, alguns estudos epidemiológicos sugerem uma fraca associação entre o risco de câncer renal e a exposição a esse composto tóxico (KELSH et al., 2010; LJUNGBERG et al., 2011).

1.1.4. Diagnóstico

O carcinoma renal é frequentemente diagnosticado durante a ultrassonografia, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, e 25 % dos pacientes são diagnosticados com a doença em estágio avançado (WOOD, 2007). A maioria dos pacientes diagnosticados com carcinoma renal são assintomáticos; entretanto, alguns pacientes podem apresentar alguns sintomas clínicos, como dor abdominal, hematuria e massa abdominal palpável. Outros sintomas que também podem ser apresentados são: perda de peso, fadiga, anemia, anorexia e febre (HAAS; UZZO, 2007; ESCUDIER et al., 2012). Alguns indivíduos apresentam sintomas metastáticos, como dores nos ossos ou nódulos nos pulmões, ou síndromes paraneoplásicas, tais como a hipercalcemia e a eritrocitose (ESCUDIER et al., 2012).

Tumores detectados incidentalmente em pacientes assintomáticos têm aumentado progressivamente com a disseminação das técnicas de imagens, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética (NG et al., 2008). Cerca de 50% dos carcinomas renais são detectados incidentalmente (ESCUDIER et al., 2012).

O tumor, quando em estágio avançado, cresce e, frequentemente, se espalha nos órgãos adjacentes. Aproximadamente um terço dos pacientes diagnosticados com carcinoma renal desenvolvem metástases. Os mais comuns sítios de metástases são: os pulmões, nódulos linfáticos,

cérebro, ossos e fígado (DRUCKER, 2005). Os sítios metastáticos podem ser diagnosticados usando raio-X e tomografia computadorizada (DRUCKER, 2005).

1.1.5. Prognóstico

A identificação de fatores prognósticos em carcinoma renal tem sido considerada muito importante, pois fornece informação sobre os pacientes, sugerindo tratamentos apropriados, e seleciona pacientes para tratamentos adaptados, bem como novos ensaios clínicos (LETANG et al., 2009).

Os fatores prognósticos podem ser subdivididos em: anatômico (estadiamento TNM, tamanho do tumor), histológico (grau nuclear e subtipo histológico), clínico (sintomas) e fatores moleculares (DENG; MELAMED, 2012).

No momento, os fatores prognósticos mais aceitos são o estágio tumoral e o grau de diferenciação histológica. O sistema de classificação histológico mais aceito é o grau de Fuhrman, que é aplicado em todos os subtipos renais (MOCH, 2013).

O estadiamento é definido como classificação TNM e tem sido validado como o principal parâmetro prognóstico do carcinoma renal (DENG; MELAMED, 2012). No sistema TNM, os tumores são caracterizados com base no grau de extensão local do sítio de tumor

primário (T), no envolvimento de nódulos linfáticos (N) e presença de metástase (M) (Tabela 2) (ROBERTO PILI, 2008). Os tumores renais que apresentam alto estágio de tumor, metástases em nódulos linfáticos ou metástases à distância estão associados com prognóstico ruim e um menor período de sobrevida. Alguns estudos têm mostrado que o estágio do tumor é um importante indicador de prognóstico independente (LAU et al., 2002; VOLPE; PATARD, 2010).

Os fatores histológicos incluem o grau nuclear de Fuhrman, subtipo histológico, necrose tumoral e invasão do sistema coletor. O grau nuclear de Fuhrman é dividido em quatro graus nucleares, que foram definidos em ordem crescente de tamanho, irregularidade e proeminência nucleolar. Grau nuclear alto está correlacionado com agressividade do tumor e aumento do potencial metastático (GUDBJARTSSON et al., 2005). Assim, o grau de Fuhrman tem se mostrado eficaz na predição do desenvolvimento de metástases à distância, seguido de nefrectomia (FUHRMAN; LASKY; LIMAS, 1982). Alguns estudos têm mostrado uma associação entre os subtipos histológicos e a sobrevivência dos pacientes, sendo o carcinoma renal de células claras o tumor mais agressivo, seguido pelo papilífero e cromofóbico (MOCH et al., 2000; PATARD et al., 2005). Os distintos subtipos histológicos apresentam diferentes comportamentos clínicos e biológicos, afetando o potencial metastático dos tumores e a sobrevida dos pacientes (GUDBJARTSSON et al., 2005). A presença de necrose tumoral está bem estabelecida como

um independente indicador de prognóstico ruim para a doença localizada (LEE et al., 2006). A invasão do sistema coletor em carcinoma renal é rara, entretanto está associada com prognóstico ruim, especialmente em baixo estágio tumoral (PALAPATTU et al., 2003).

Os fatores clínicos incluem os sintomas locais, anemia e caquexia. A presença ou ausência de sintomas (dor abdominal, massa palpável, hematuria) apresentam um significativo valor prognóstico (VOLPE; PATARD, 2010).

Com a evolução e otimização de técnicas e métodos moleculares, a identificação de marcadores de prognósticos tem aumentado rapidamente (FINLEY; PANTUCK; BELLDEGRUN, 2011). Esses marcadores moleculares têm grande potencial para serem usados na detecção, diagnóstico e prognóstico de carcinoma renal, dentre eles destacam-se o *VHL*, *HIF* e o *VEGF* (VOLPE; PATARD, 2010).

Tabela 2: Estadiamento tumoral do carcinoma renal

Classificação	Descrição
T	Tumor primário
TX	Tumor primário não determinado
T0	Não há evidência de tumor primário
T1	Tumor ≤ 7 cm de dimensão, limitado ao rim
T1a	Tumor ≤ 4 cm
T1b	Tumor > 4 cm e ≤ 7 cm
T2	Tumor > 7 cm de dimensão, limitado ao rim
T2a	Tumor > 7 cm e ≤ 10 cm
T2b	Tumor > 10 cm, limitado ao rim
T3	Tumor se estende nas principais veias ou tecidos peri-néfricos, mas não atinge a glândula adrenal e também não se estende além da Fascia da Gerota
T3a	Tumor se estende para dentro da veia renal, mas não além da Fascia da Gerota
T3b	Tumor se estende para dentro da veia cava inferior ao diafragma
T3c	Tumor se estende para dentro da veia cava superior ao diafragma
T4	Tumor invade além da Fascia da Gerota
N	Linfonodo regional
NX	Linfonodo regional não determinado
N0	Ausência de metástases em linfonodo
N1	Metástases em linfonodo regional
M	Metástases à distância
M0	Não há metástases à distância
M1	Presença de metástase à distância
Estadiamento	

Estágio I	T1N0M0
Estágio II	T2N0M0
Estágio III	T3N0M0; T1-3N1M0
Estágio IV	T4M0, M1

(Escudier et al, 2012).

1.1.6 Tratamento

O tratamento de pacientes com carcinoma renal é determinado pelo estágio da doença e ocorre, principalmente, por meio da nefrectomia e imunoterapia (DRUCKER, 2005; PETRELLA; BRINCKERHOFF, 2006).

A cirurgia é o único tratamento potencialmente curativo para carcinoma renal localizado, principalmente para os estágios mais avançados. A nefrectomia radical é a cirurgia mais indicada, que envolve a ressecção do rim junto com a glândula supra-renal, onde há suspeita de invasão do tumor. A nefrectomia parcial é utilizada em paciente com tumores pequenos (inferiores a 4cm) ou tumores bilaterais (PEREZ-GRACIA et al., 2007). Apesar da nefrectomia ser o principal tratamento do carcinoma renal, cerca de 30% dos pacientes desenvolvem metástases ou recorrência tumoral sistêmica ou local após a cirurgia, apresentando uma expectativa de vida de 1 ano (TAKAHASHI et al., 2001; DRUCKER, 2005; PETRELLA; BRINCKERHOFF, 2006).

A imunoterapia com inteleucina-2 e interferon- α tem sido muito utilizada para o tratamento de carcinoma renal em estágios avançados (ESPER, 2012). Altas doses de inteleucina-2 podem ser efetivas em

pacientes metastáticos (BALDEWIJNS et al., 2008), o que sugere que a imunoterapia pode ter um papel crítico no tratamento de carcinoma renal. Interferon- α e interleucina-2 são imunoterapias usadas apenas em pacientes com carcinoma renal de células claras (INMAN; HARRISON; GEORGE, 2013).

A radioterapia pode ser usada como uma terapia paliativa em pacientes que não podem ser submetidos à cirurgia ou no caso de metastases ósseas ou no sistema nervoso central (BALDEWIJNS et al., 2008).

Inibidores de angiogênese podem ser usados como uma terapia estratégica, visto que a angiogênese é um fator importante no desenvolvimento do carcinoma renal. Dentre os inibidores de angiogênese, destacam-se o talidomida, que induz a estabilização tumoral, o fator de crescimento endotelial vascular e o bevacizumab, o primeiro inibidor angiogênico que apresentou um benefício clínico em pacientes com câncer renal. (DRUCKER, 2005; PEREZ-GRACIA et al., 2007).

1.1.7 Ocorrência

A ocorrência do carcinoma renal geralmente é esporádica, entretanto há um índice de predisposição hereditária para o câncer renal, 1-4% de todos os casos. As neoplasias renais hereditárias são mais

comuns em indivíduos mais jovens e podem ser multifocal e bilateral (BALDEWIJNS et al., 2008). A causa mais comum de um padrão de herança familiar é a doença de Von Hippel-Lindau (VHL), que pode ser causada por uma mutação germinativa no gene supressor tumoral *VHL* (WOODWARD et al., 2008).

O gene *VHL* é um gene supressor de tumor, localizado na região 3p25-26, que, quando alterado, resulta na desregulação da hipóxia, ocasionando uma super produção de fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF*), que, por sua vez, promove angiogênese, crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases (CHOUEIRI; BUKOWSKI; RINI, 2006; CASCON et al., 2007). A inativação do *VHL* ocorre devido à mutação, deleção alélica ou silenciamento epigenético por hipermetilação da região promotora, presentes em 60% dos casos esporádicos (NELSON; EVANS; LARA, 2007).

1.1.8 Marcadores Moleculares em Carcinoma Renal

Devido à evolução das técnicas moleculares, vários biomarcadores moleculares de prognóstico e de predição têm sido identificados como benefício terapêutico no carcinoma renal (VICKERS; HENG, 2010).

Biomarcadores moleculares são definidos como indicadores de importantes eventos clínicos, tais como o aparecimento do câncer, recidiva e progressão tumoral e até mesmo a morte do paciente. Esses

biomarcadores podem ser utilizados para a avaliação de risco da doença, diagnóstico, prognóstico e para a avaliação de recorrência e progressão da doença (VICKERS; HENG, 2010).

Vários marcadores moleculares têm sido avaliados em pacientes com carcinoma renal, com o objetivo de individualizar o tratamento e melhorar os fatores prognósticos. Dentre esses marcadores, destacam-se aqueles que estão associados à hipoxia e à angiogênese, como o Von Hippel-Lindau (*VHL*), Fator Indutor da Hipóxia (*HIF*), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*VEGF*) e Anidrase Carbônica (*CAIX*) (TANG; VICKERS; HENG, 2011).

O gene *VHL*, supressor tumoral, tem um papel crucial na indução da hipóxia. As mutações que ocorrem nesse gene podem ser inserções, deleções, mutação sem sentido, perda de heterozigosidade e metilação na região promotora (KAELIN, 2007). A perda da função do *VHL* é um passo inicial na carcinogênese, que é seguido por outras alterações. Alteração na proteína *VHL* resulta em alterações na degradação do fator indutor de hipóxia (*HIF*) (Figura 2). Outros efeitos do gene *VHL* incluem a regulação do ciclo celular via p53 e a deposição de matriz extracelular (SUN et al., 2011; TANG; VICKERS; HENG, 2011).

O Fator Indutor de Hipóxia (*HIF*) faz parte da via do gene *VHL* em carcinoma renal, pois atua como um fator de transcrição para genes angiogênicos na deficiência da proteína *VHL*. A investigação de *HIF* como um potencial biomarcador revelou que alterações genéticas em *HIF-1 α*

estão associadas ao desenvolvimento de metástases (VICKERS; HENG, 2010).

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*VEGF*) é uma glicoproteína dimérica e membro de um fator de crescimento derivado de plaquetas, que afeta a angiogênese tumoral. Em tumores, a angiogênese é induzida pelo *VEGF* (SUN et al., 2011). Em carcinoma renal, especificamente no subtipo células claras, a superexpressão de *VEGF* é esperada devido à desregulação de *HIF-1 α* , como resultado da perda da proteína VHL (SUN et al., 2011). Pacientes com RCC apresentam altos níveis de expressão de *VEGF* comparado com indivíduos saudáveis (TANG; VICKERS; HENG, 2011).

A Anidrase Carbônica IX (*CAIX*) é uma enzima de superfície de transmembrana, controlada pelo *HIF-1 α* e superexpressa em condições de hipóxia (VICKERS; HENG, 2010). Expressão de *CAIX* em tumores diferencia lesões renais malignas das benignas (VICKERS; HENG, 2010).

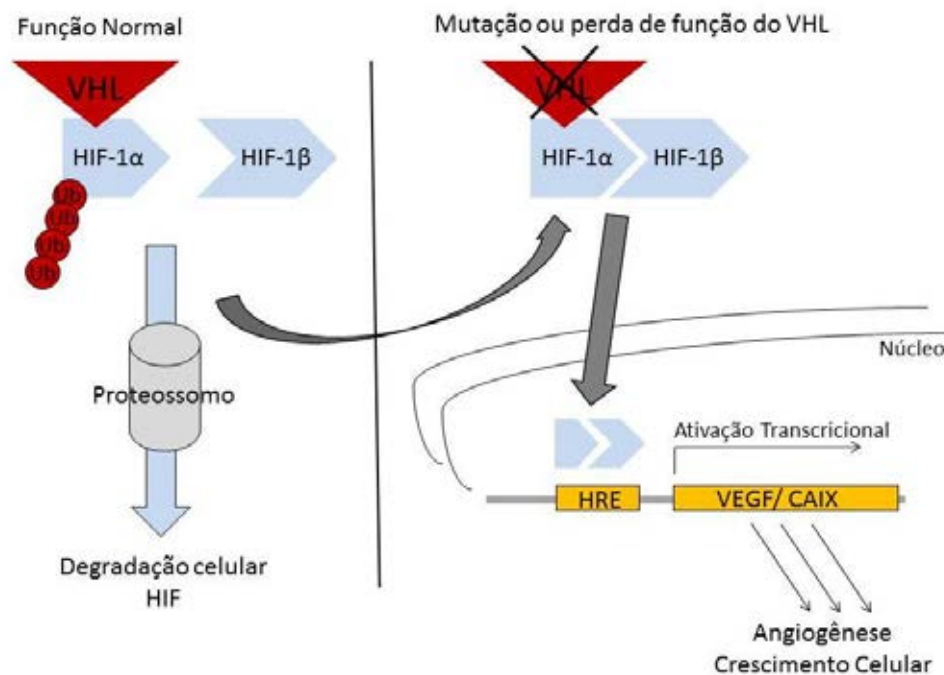


Figura 2: Função normal do gene *VHL* (Von Hippel-Lindau) comparada com o estado de mutação ou perda de função de *VHL*. Sob condições normais, o gene *VHL* se liga ao fator indutor de hipóxia (*HIF-1α*) e poliubiquitina para marcá-lo para a destruição pelo proteossomo. Quando a função de *VHL* é perdida, o *HIF-1α* liga-se ao *HIF-1β* e estes são translocados para o núcleo para ativar os elementos responsivos de HIF (HRE), levando à ativação transcricional de genes importantes na angiogênese e no crescimento celular (Modificado de (VICKERS; HENG, 2010)).

1.2 GPC3

O gene Glipican 3 (*GPC3*), localizado na região cromossômica Xq26.1, é membro de uma família glipicana de proteoglicano de heparina sulfatada (HSPG) (KWACK; CHOI; SUNG, 2006; JIA et al., 2007). HSPGs, proteoglicanos compostos por uma proteína central e uma cadeia de glicosaminoglicanos (GAG) de heparina sulfatada, são abundantes componentes da matriz extracelular (ECM) (BISHOP; SCHUKSZ; ESKO, 2007). As HSPG atuam como co-receptores para fatores de crescimento e podem regular a estabilidade e distribuição de moléculas sinalizadoras à ECM (KIRKPATRICK; SELLECK, 2007).

Existem três subfamílias de HSPGs: os proteoglicanos da matriz extracelular secretados, sindecans e glipicans (BISHOP; SCHUKSZ; ESKO, 2007). Os glipicans se ligam à superfície celular pela via de ancoragem do glicosilfosfatidilinositol (GPI). O tamanho da proteína central dos glipicans varia de 60-70 kDa, e todos eles exibem, na extremidade N-terminal, um peptídeo sinal secretor e um domínio hidrofóbico na extremidade C-terminal, que é requerido para ancoragem do GPI. Os glipicans compartilham uma característica: o local de inserção das cadeias de heparina sulfatada (HS), que está localizado próximo à região C-terminal, colocando as cadeias HS perto da membrana celular (FILMUS; SELLECK, 2001) (Figura 3).

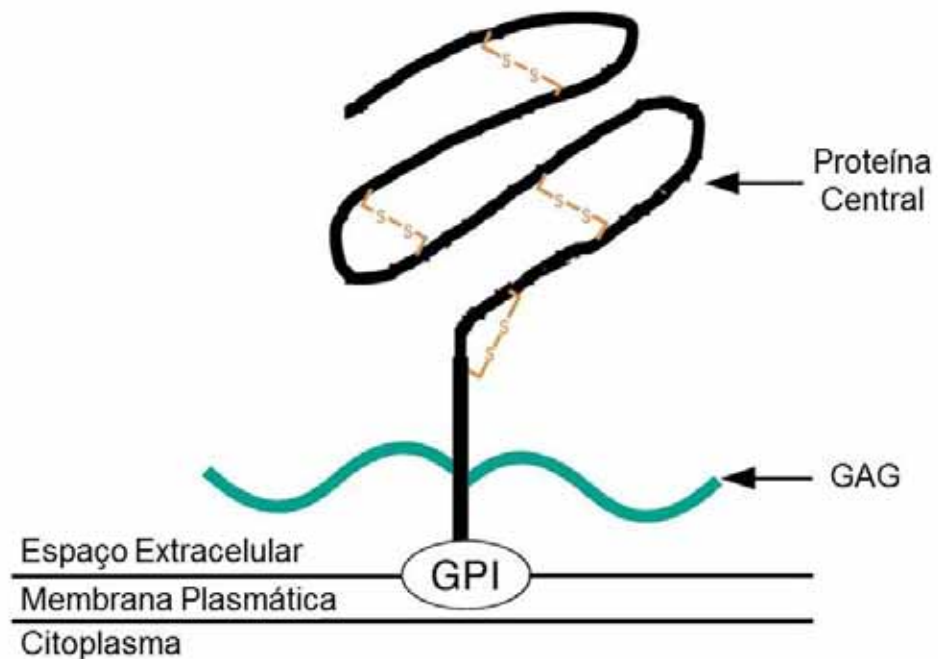


Figura 3: Esquema dos Glipicans. Os Glipicans estão ligados à superfície celular pela via do glicosilfosfatidilinositol (GPI). GAG: cadeias de glicosaminoglicanos. (Modificado de (FILMUS; SELLECK, 2001)).

Atualmente, seis membros dessa família têm sido identificados: *GPC1*, *GPC2*, *GPC3*, *GPC4*, *GPC5* e *GPC6* (LIN et al., 2012) (Figura 4). Todos os glipicans estão altamente expressos durante o desenvolvimento embrionário (VEUGELERS et al., 1999). Os glipicans atuam com receptores para fatores de crescimento ligados à heparina, e essa interação tem um importante papel no crescimento e diferenciação celular (KANDIL; COOPER, 2009).

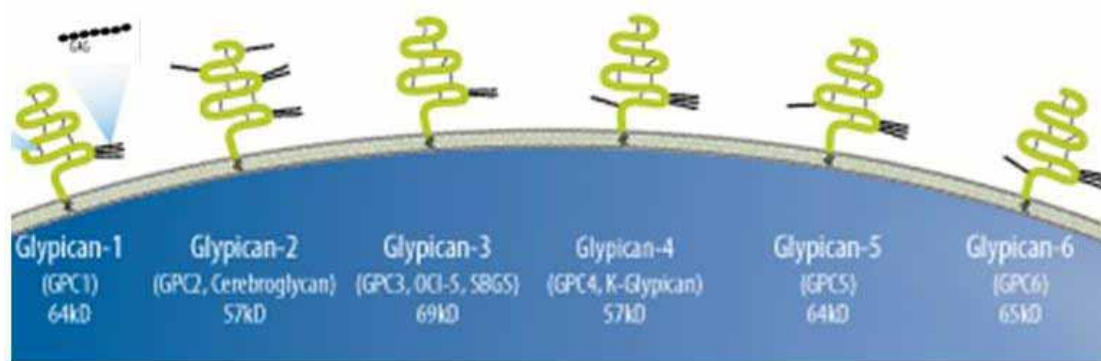


Figura 4: Os seis membros da subfamília glicopirânica. Glicopirânicos estão ancorados à superfície celular pela via de ancoragem GPI e exibem sítios de ligação GAG predominantemente perto da membrana. Os nomes alternativos e o peso molecular das proteínas estão indicados (Modificado de http://www.rndsystems.com/Cytokine_cb08i2_GlypicansinCancer.aspx)

Devido à habilidade dos glicopirânicos de regular a atividade dos fatores de crescimento, tem sido mostrada a associação entre alterações na expressão de glicopirânicos com a progressão tumoral (FILMUS; SELLECK, 2001). Um dos primeiros estudos que estabeleceu a conexão entre glicopirânicos e a carcinogênese mostrou que a expressão de *GPC1* está significativamente aumentada em câncer de pâncreas (KLEEFF et al., 1998). Filmus e Selleck (2001) (FILMUS; SELLECK, 2001) verificaram que o Glicopirânico-3 (*GPC3*) tem sido implicado na progressão tumoral.

O *GPC3* está envolvido no crescimento celular, diferenciação e migração celular (ZHU et al., 2001) e pode regular a proliferação celular como um gene supressor tumoral (LIN et al., 2012). Desde sua descoberta, o gene *GPC3* tem sido relacionado à ocorrência, desenvolvimento e prognóstico de uma variedade de tumores, incluindo o

câncer de fígado e o câncer de mama (BUCHANAN et al., 2010; LIN et al., 2012; CHEN et al., 2013).

O gene *GPC3* é diferencialmente expresso em alguns tipos de tumores, como no caso de carcinoma hepatocelular e melanoma, onde está superexpresso, e, por outro lado, em câncer de mama e ovário, onde sua expressão é reduzida (LIN et al., 1999; XIANG; LADEDA; FILMUS, 2001; HO; KIM, 2011). O silenciamento da expressão de *GPC3* ocorre, frequentemente, devido ao mecanismo de hipermetilação de sua região promotora em linhagens celulares de câncer de ovário e mama e em vários tumores malignos, como mesothelioma, carcinoma ovariano e colangiocarcinoma (SUNG et al., 2003; BAUMHOER et al., 2008).

A expressão ectópica de *GPC3* inibe o crescimento celular em mesotelioma e induz apoptose em linhagem celular de câncer de mama (GONZALEZ et al., 1998). Em linhagens celulares de câncer de ovário, o gene *GPC3* está com baixa expressão, e a restauração de sua expressão inibe o crescimento dessas células, sugerindo que *GPC3* possa atuar como um supressor tumoral em câncer de ovário (LIN et al., 1999). *GPC3* é diferencialmente expresso em carcinoma hepatocelular (HCC) em comparação com o fígado normal e pode atuar como um marcador tumoral nessa malignidade (HSU; CHENG; LAI, 1997). Em carcinoma renal de células claras (CCRCC), esse gene está com expressão reduzida quando comparado com rim normal, indicando que esse gene possa atuar

como um candidato a marcador molecular na carcinogênese renal (TAKAHASHI et al., 2001).

1.3 Caracterização Funcional na Carcinogênese

Estudos funcionais têm demonstrado uma grande eficiência em prover novas informações sobre como determinados genes podem influenciar no desequilíbrio da homeostase celular e suas possíveis consequências na carcinogênese (ANGELA SILVA BARBOSA, 2004; IVANOV et al., 2009).

Um fator crucial para o desenvolvimento e crescimento tumoral é o equilíbrio entre a proliferação celular e apoptose. Assim, estudos envolvendo análise do ciclo celular e apoptose podem ser úteis para prever o comportamento do tumor, na fase inicial da carcinogênese (IVANOV et al., 2009).

Dentre as estratégias para conhecer a função de um determinado gene, são utilizados ensaios de ganho e de perda de função. Os ensaios de perda de função consistem em impedir que um gene produza sua proteína, com o propósito de analisar as consequências ou o fenótipo decorrente desta inibição. Assim, pode-se deduzir a função do gene inativado, bem como as vias de sinalização a que pertence (ANGELA SILVA BARBOSA, 2004).

Assim, a análise funcional de genes específicos pode revelar como eles atuam no controle do crescimento e diferenciação celular, no

metabolismo celular e apoptose e na tumorigênese (PIEROBON et al., 2009).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi analisar os mecanismos de atuação do gene *GPC3* em carcinoma renal por meio de diversos estudos funcionais.

Seus objetivos específicos foram:

1. Analisar a expressão de *GPC3* em amostras e linhagens de carcinoma renal de células claras.

2. Analisar a expressão proteica do gene *GPC3* nas linhagens celulares de carcinoma renal por meio da Imunohistoquímica após a transfecção das células com o vetor contendo a ORF de *GPC3*.

3. Analisar o efeito do gene *GPC3* na proliferação celular por meio das técnicas de MTT e do ensaio de formação de colônia.

4. Verificar se o gene *GPC3* induz apoptose e está envolvido com a progressão do ciclo celular em linhagens celulares de carcinoma renal por citometria de fluxo.

ARTIGO CIENTÍFICO

3. ARTIGO CIENTÍFICO

**GPC3 Reduces Cell Proliferation in Cell
Lines of Renal Carcinoma**

Artigo Científico submetido à revista científica PLoS ONE

GPC3 REDUCES CELL PROLIFERATION IN CELL LINES OF RENAL CARCINOMA

Marina Curado Valsechi¹; Ana Beatriz Bortolozo Oliveira¹; André Luís Giacometti Conceição¹; Bruna Stuqui¹; Marília de Freitas Calmon¹; Paula Rahal¹.

1. Department of Biology, IBILCE-UNESP, Rua Cristóvão Colombo nº2265, Jardim Nazareth, CEP: 15054-000, São José do Rio Preto- SP, Brazil

E-mail: Marina Curado Valsechi- mcvalsechi@yahoo.com.br; Ana Beatriz Bortolozo Oliveira- abbo_aninha@hotmail.com; André Luís Giacometti Conceição- andre4487@gmail.com; Bruna Stuqui- bru.stuqui@gmail.com; Marília de Freitas Calmon- macal131@gmail.com; Paula Rahal- rahalp@yahoo.com.br

*Corresponding author

Written correspondence to:

Paula Rahal, PhD

Department of Biology

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE/UNESP

Rua Cristóvão Colombo, 2265,

15054-000 - São José do Rio Preto, SP, Brazil

e-mail: rahalp@yahoo.com.br

Phone: +55 17 3221-2379

Fax: +55 17 3221-2390

Funding: Source of funding: FAPESP. Grant numbers: 2010/01661-2 and 2010/08953-0. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ABSTRACT

Background: GPC3 (Glypican 3) is a member of the family of glypican heparan sulfate proteoglycans (HSPG). The GPC3 gene may play a role in controlling cell migration, negative regulation of cell growth and induction of apoptosis. This gene is reported to be downregulated in several cancers, which can result in uncontrolled cell growth and which can also contribute to the malignant phenotype of some tumors. The purpose of this study was to analyze the mechanism of action of the GPC3 gene in clear cell renal cell carcinoma. **Methods:** First, we constructed the expression vector and transfected renal carcinoma cell lines. GPC3 expression was analyzed using qRT-PCR and immunohistochemistry. We evaluated cell proliferation using MTT and colony formation assays. Apoptosis and cell cycle analyses were evaluated using flow cytometry. **Results:** We observed that the GPC3 gene was downexpressed in the clear cell renal cell carcinoma samples and in cell lines, which were both compared to normal renal samples. We observed that GPC3 mRNA expression and protein levels increased after the transfection into the cell lines. We found that the cell proliferation rate decreased in cells overexpressing GPC3 in both cell lines, ACHN and 786-O. Also, apoptosis in the renal cell carcinoma cell line was not induced in cells overexpressing GPC3, but there was an increase in the cell population during the G1 phase in the cell cycle. **Conclusion:** We

suggest that the GPC3 gene reduced the cell proliferation rate through cell cycle arrest during the G1 phase in renal cell carcinoma.

Key-words: GPC3, cell lines, cell proliferation, renal carcinoma, transfection

INTRODUCTION

Renal Cell Carcinoma (RCC) is the most lethal urological disease [1] and is responsible for 3% of all malignant neoplasms [2]. The incidence of RCC has been increasing over the last few decades [3] due to advances in early detection of renal tumors provided by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance imaging [4,5,6].

RCC is a heterogeneous histological disease, and clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) is the most common histological subtype – it makes up approximately 75-80% of the cases of renal tumors [1,7]. Renal cell carcinoma is diagnosed in the advanced stage of the disease in 25% of patients [8]. Although nephrectomy and radiotherapy are effective, 30% of patients develop metastasis after treatment, with a median survival period of 1 year [7,9].

The occurrence of RCC is usually sporadic, although genetic syndromes can cause a familial pattern of inheritance. An example of one of these genetic syndromes is Von–Hippel Lindau disease, which is associated

with mutations in the *VHL* gene [10]. In clear cell renal cell carcinoma, the occurrence of sporadic and familial diseases is associated with inactivation of the *VHL* gene [11]. Therefore, it is important to identify the genes associated with CCRCC and to better understand their possible mechanisms of action in renal tumor cells. Several studies have identified differentially expressed genes in clear cell renal cell carcinoma [9,12]. One of these genes is *GPC3* gene, which is downexpressed in clear cell renal cell carcinoma [9].

Glypican 3 (*GPC3*), which is located on the human X chromosome (Xq26), is a member of the heparan sulfate proteoglycan (HSPG) family [13,14]. This protein can bind to the surface of the cell membrane through via glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchorage [15]. *GPC3* plays important roles in cell growth regulation, proliferation, differentiation, migration and apoptosis [16,17]. It is differentially expressed in some tumor types – in hepatocellular carcinoma and melanoma, the gene *GPC3* is highly expressed [18]; however, its expression is reduced in ovarian and breast cancer [19,20], a finding which suggests that this gene expression may be involved in tumor development [21]. The *GPC3* gene is considered a potential molecular marker in hepatocellular carcinoma [22], and may act as a tumor suppressor in the ovary [19].

In the present study, we investigated the mechanisms of action of the *GPC3* gene in renal cell carcinoma using colony formation, cell

proliferation, the cell cycle progression and apoptosis assays to assess the potential role of *GPC3* in this type of cancer.

MATERIAL AND METHODS

Clear cell renal cell carcinoma samples

Thirty-five clear cell renal cell carcinoma samples and two normal renal fresh-frozen tissue samples were obtained from the Tumor Bank from the Pio XII Foundation/IBILCE-UNESP, Sao Paulo, Brazil. The use of patient-derived material was approved by the Committee Research Ethics of the Tumor Bank from the Pio XII Foundation/IBILCE-UNESP, Sao Paulo, Brazil, and written consent was obtained from all patients. Tissues were obtained during surgery on patients undergoing tumor resection, and the diagnosis of clear cell renal cell carcinoma was verified post-operatively using histopathology. The samples were classified according to the criteria provided by the International Union against Cancer [23].

Cell lines

The cell lines ACHN, 786-O, A-498, CaKi-1 and CaKi-2 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). ACHN and A-498 cells were cultured in a Mem Alpha Medium (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA), CaKi-1 and CaKi-2 cells were cultured in a McCoy's 5A Medium (Gibco by Life Technologies,

Grand Island, NY, USA) and 786-O cells were cultured in a RPMI1640 Medium (Gibco by Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Both were supplemented with 10% FBS (Cultilab, SP, Brazil), 100U/ml penicillin (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 100µg/ml streptomycin (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), and they were then placed in an atmosphere at 37°C, 5% CO₂.

Plasmid Construction

DNA oligonucleotides were chemically synthesized, and appropriate restriction sites were added using PCR amplification: CATCGGTACCATGGCCGGGACCGTGCG (Forward) and TCGACTCGAGCACCAAGGAAGAAGCACACCACCG (Reverse). After PCR purification, products and the pcDNA3.1/V5-HisB vector were digested by the restriction enzymes KpnI and XhoI (Uniscience, New England Biolabs, Hitchin, UK). The products were ligated by T4 DNA ligase (Uniscience, New England Biolabs, Hitchin, UK). The construct was confirmed using DNA sequencing.

Transfection

The pcDNA3.1/GPC3 expression vector and pcDNA3.1 (empty vector) were transfected into ACHN and 786-O cell lines using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacture's manual.

RNA extraction and qRT-PCR

Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies, Grand Island, NY) according to the manufacturer's instructions. Approximately 5µg of total RNA from each sample were used to synthesize cDNA, using the High Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Real-Time PCR was performed using an ABI prism 7300 Real Time PCR system and SYBR Green PCR Core Reagent (Applied Biosystems, Warrington, UK) following the manufacturer's protocol. The primer sequences were designed using Primer 3 software: GPC3: GTGCTTTGCCTGGCTACATC (Foward) and TCCACGAGTTCTTGTCCATTC (Reverse) and GAPDH: ACCCACTCCTCCACCTTTGA (Foward) and CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT (Reverse). In brief, the reaction mixture (20µL total volume) contained 25ng of cDNA, gene-specific forward and reverse primers for each gene, and 10µL of 2x Quantitative SYBR Green PCR Master Mix. The samples were tested in triplicate. Thus, the relative expression of each specific gene was calculated using the following formula: $R = (E_{\text{target}})^{\Delta C_t \text{ target (control - sample)}} / (E_{\text{endogenous}})^{\Delta C_t \text{ endogenous (control - sample)}}$, which had been published previously [24]; a cutoff higher than a 2-fold change was used.

Immunohistochemistry

ACHN and 786-O cells were grown in coverslips into 24-well plates. The cells were washed with PBS twice, and fixed with paraformaldehyde 4% for 30 minutes. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide for 30 minutes in the dark. The cells were incubated at 4°C overnight with rabbit polyclonal anti-GPC3 (5µg/mL) (ABCAM, Cambridge, UK) diluted in 1% BSA. After the washings, the cells were incubated with the biotinylated secondary antibody (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, California, USA), diluted in 1% BSA for 45 minutes at 37°C, and then exposed to an HRP-conjugated streptavidin complex (Santa Cruz Biotechnology, California, USA). The reactions were visualized using DAB substrate (Dako, Cambridge, UK) and they were counterstained with hematoxylin. Densitometric analyses of GPC3 were performed with an AxioShop II Microscope (Zeiss, Germany) using the Software Axiovision (Zeiss). For the analyses, eleven different fields from the coverslips were used and 15 points were analyzed. The values were obtained on an arbitrary scale.

Colony Formation Assay

ACHN and 786-O cells transfected with pcDNA3.1/GPC3 and pcDNA3.1 were placed into 6-well plates (300µL cell per well) containing 700µg/ml geneticin (G418, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). After 14

days, the colonies were stained with 0.01% crystal violet. Each experiment was performed in triplicate and in two independent assays.

Proliferation Assay

ACHN and 786-O were seeded into 96-well plates. After the transfection, 1mg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to the wells and incubated for 30 minutes, in an atmosphere at 37°C. Then, the MTT was removed and 100µl DMSO 100% (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to each well. Absorbance was measured at 562nm. Each experiment was performed in triplicate and in two independent assays.

Apoptosis Assay

ACHN and 786-O apoptotic cells were analyzed using an FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After the transfection, the cells were washed with PBS twice and then resuspended in binding buffer, and 5µL FITC-Annexin V and 5µL Propidium Iodide (PI) was added. Next, the cells were incubated for 15 minutes in the dark at room temperature. The cells were analyzed using an easyCyte 5HT flow cytometry (Millipore Guava Technologies, Hayward, USA). It was performed two independent experiments.

Cell Cycle Analysis

ACHN and 786-O cells were analyzed 24h, 48h, and 72h after the transfection. The cells were washed with PBS twice and then fixed with ice-cold ethanol (70%). Next, the samples were stained with 200 μ L of Guava Cell Cycle Reagent (EMD Millipore Corporation, Hayward, CA, USA), incubated for 30 minutes at room temperature, and analyzed using easyCyte 5HT flow cytometry (Millipore Guava Technologies, Hayward, USA). It was performed two independent experiments.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 Software. The Mann-Whitney U Test and Wilcoxon Single Ranks Test were applied in order to compare the protein expression levels detected through the use of immunohistochemistry. The comparisons of protein expression levels in cells overexpressing GPC3 to cells lacking GPC3 were performed using analysis of variance (ANOVA), with the appropriate post-hoc test. In all analyses, the differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Analysis of the *GPC3* gene expression in clear cell renal cell carcinoma samples and renal carcinoma cell lines

The *GPC3* gene was downexpressed in all clear cell renal cell carcinoma samples except in one sample (Figura 1A). It was not observed association between *GPC3* gene expression and the clinical data of the patients with clear cell renal cell carcinoma (Table 1). The cell lines analyzed were also compared to normal renal samples, with fold-change values for gene expression ranging from -1 to -10.3 in primary clear cell renal cell carcinoma samples and -7.8 to -14.4 in primary renal carcinoma cell lines (CaKi-2, A-498 and 786-O) and metastatic renal carcinoma cell lines (CaKi-1 and ACHN) (Figure 1B). It was observed that the *GPC3* expression was lower in metastatic cell lines than in primary cell lines. The same was observed in the case of clear cell renal cell carcinoma samples, in which *GPC3* gene expression was lower in metastatic samples than in non-metastatic samples. Unfortunately, there was a small number of metastatic clear cell renal cell carcinoma samples used in this study to perform a statistical test. In order to assess the potential role of this gene in this type of cancer, we performed some assays in the 786-O and ACHN cell lines.

We evaluated *GPC3* gene and protein expression in the ACHN and 786-O cell lines before and after the transfection with the pcDNA3.1/*GPC3*

expression vector and with an empty vector using qRT-PCR and immunohistochemistry, respectively. It was observed that the *GPC3* gene was upregulated in ACHN and 786-O cell lines after transfection with the pcDNA3.1/*GPC3* vector (Figure 2A). *GPC3* protein expression in the cells transfected with pcDNA3.1/*GPC3* vector showed an increase in the *GPC3* protein compared to cells transfected with an empty vector in both cell lines. *GPC3* immunostaining increased significantly in the cells transfected with the pcDNA3.1/*GPC3* vector ($P < 0.0001$) in the ACHN and 786-O cell lines (Figures 2B and 2C).

GPC3 suppresses colony formation

We transfected the pcDNA3.1/*GPC3* and pcDNA3.1 vectors in ACHN and 786-O cell lines, and observed colony formation ability after 14 days. These cell lines expressing *GPC3* were found to experience a growth suppressive effect in the colony formation assay. The *GPC3*-transfected cell grew significantly fewer colonies than cells transfected with an empty vector in both cell lines ($P < 0.01$) (Figure 3).

Effect of GPC3 on proliferation in cell lines

Cell proliferation in cells expressing *GPC3* was determined using MTT assays on ACHN and 786-O cell lines 24h, 48h, and 72h after the transfection. ACHN cells overexpressing *GPC3* were found to experience a more significant reduction in cell proliferation than ACHN cells lacking

GPC3 expression after 72h ($p < 0.01$) (Figure 4A). 786-O cells overexpressing GPC3 were found to experience a more significant reduction in their proliferation rates than 786-O lacking GPC3 after 24h ($p < 0.01$), 48h, and 72h ($p < 0.001$) (Figure 4B).

Effect of GPC3 on Apoptosis in cell lines

We studied the ability of GPC3 to induce apoptosis. The apoptosis rate was analyzed in cell lines after 24h, 48h, and 72 hours of transfection with pcDNA3.1/GPC3 and pcDNA3.1 vectors using FITC-Annexin V/PI. No difference in the apoptosis was observed between ACHN and 786-O cells either overexpressing or lacking GPC3 at any of the points in time that were analyzed ($p > 0.05$) (Figure 5).

GPC3 Alters Cell Cycle Progression

We then performed cell cycle analysis on ACHN and 786-O cell lines, using flow cytometry 24h, 48h, and 72h after transfection with pcDNA3.1/GPC3. The number of ACHN and 786-O cells overexpressing GPC3 were evaluated in each phase of the cell cycle, and compared with the number of ACHN and 786-O cells lacking GPC3, respectively. The results revealed that there were more ACHN cells overexpressing GPC3 in the the G1 phase and fewer cells overexpressing GPC3 in the S and G2 phases, 24h ($p < 0.001$), 48h ($p < 0.001$), and 72h ($p < 0.05$) after transfection (Figure 6A). In the 786-O cell line, a higher number of cells

overexpressing GPC3 was observed in the G1 phase 48h, and 72h after the transfection ($p < 0.001$) compared to the values found in 786-O cells lacking GPC3 (Figure 6B).

DISCUSSION

Glypican-3 (*GPC3*) is a member of the family of a heparan sulfate proteoglycans [25,26]. Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) have profound effects on both tumor cell growth kinetics and metastasis formation [27]. HSPGs have the functional capacity to regulate a myriad of molecular interactions that influence tumor cell proliferation and metastasis [28]. Glypican-3 expression is higher in several tissues, such as the gastrointestinal tract in human embryos. In different types of tumors, its expression is variable [29] – in liver cancer and melanoma, GPC3 is overexpressed [18]; in ovarian cancer and breast cancer, GPC3 is downregulated [19,20].

In the present study, *GPC3* expression was downregulated in primary clear cell renal cell carcinoma samples and in clear cell renal cell carcinoma cell lines. To the best of our knowledge, this report is the first that detects the downexpression of the *GPC3* gene in clear cell renal cell carcinoma cell lines. Tumor cell growth was reduced by colony formation in cells overexpressing GPC3 protein, and the cells overexpressing GPC3 reduced their proliferation rates post-transfection in the 786-O and ACHN

cell lines 72h after transfection in this study. Lin et al.[19] and Murthy et al. [30] found that *GPC3* reexpression in ovarian cancer cell lines resulted in the inhibition of the efficiency of colony formation. Some studies have shown that *GPC3* plays an important role in cell growth and differentiation, [31,32] such as the case of hepatocellular carcinoma [33]. The data obtained in the present study suggests that *GPC3* inhibits cell proliferation in clear cell renal cell carcinoma.

Therefore, we studied whether the reduced the proliferation rate in cells overexpressing *GPC3* occurs through the induction of apoptosis or through cell cycle arrest. Apoptosis, or programmed cell death, is a crucial point in the carcinogenic process. The cancer cells can overcome the apoptosis mechanism, and tumor progression continues [26,34]. It was observed that most cells, whether overexpressing and lacking *GPC3*, were viable at points in time in ACHN and 786-O cell lines. Based on the results obtained, we cannot suggest that the cells overexpressing *GPC3* in renal cell carcinoma induce apoptosis; however, we hypothesize that the inhibition of cell proliferation might occur through cell cycle arrest in the case of this cancer.

In this work, we analyzed the cell cycle using flow cytometry in order to verify whether *GPC3* overexpression arrests the cell cycle in renal cell carcinoma. Our study revealed that the observed growth-repressive effect was due to an arrest of *GPC3* overexpressing cells in the G1 cell cycle phase, which caused these cells to proliferate less in both cell lines

that were analyzed. In this study, we observed changes to cell proliferation through the use of MTT in the ACHN cell line only 72 hours post-transfection. Using flow cytometry, we were able to identify changes to the cell cycle and, consequently, to cell proliferation only 24 hours after transfection in the same cell line. This difference likely occurred because flow cytometry methodology is more sensitive than MTT when it comes to detecting any changes to the cell cycle/proliferation. One study observed that inhibition of GPC3 expression released hepatocyte carcinoma from G1 arrest, and thus modulated cell cycle progression in this type of cancer [35].

Moreover, cell surface HSPGs inhibit invasion by promoting tight cell–cell and cell–extra cellular matrix (ECM) adhesion. Previous studies documented diminished quantity and quality of heparan sulfate isolated from transformed cells as compared to normal cells [36]. This alteration in heparan sulfate accompanies a reduction in the adhesive capacity of transformed cells. Low levels of cell surface heparan sulfate also correlate with high metastatic activity in melanomas [37,38]. Furthermore, the downregulated expression was more significant in invasive areas, a result which further suggests the inhibiting role that GPC-3 plays in tumor progression in hepatocellular carcinomas [39]. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. Glypican-3 expression is also silenced in human breast cancer, and ectopic expression of glypican-3 inhibits growth of

breast cancer cell lines [20]. Moreover, glypican-3 was shown to inhibit invasion and metastasis of a mammary carcinoma cell line in vivo [40]. Thus, cells with normal epithelial morphology exhibit retention of cell surface HSPGs and firm attachment to the Extra Cellular Matrix. Cells that are beginning to invade exhibit reduced adhesion to the ECM, loss of epithelial morphology, and diminished levels of HSPG expression while deeply invading cells have completely lost HSPG expression [28]

CONCLUSION

GPC3 gene expression was downregulated in primary clear cell renal cell carcinoma, and *GPC3* protein overexpression arrests cells during the G1 phase and consequently reduces the cell proliferation rate in clear cell renal cell carcinoma cell lines. These results suggest that *GPC3* acts as a tumor suppressor in clear cell renal cell carcinoma.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Dr. Daniel Seabra and Dr. Eliney Ferreria Faria for their collaboration in collecting the samples and Dra. Lígia Maria Kerr for pathological review.

REFERENCES

1. Xue YJ, Xiao RH, Long DZ, Zou XF, Wang XN, et al. (2012) Overexpression of FoxM1 is associated with tumor progression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Transl Med* 10: 200.
2. Xu L, Zhu Y, Xu J, Wu K, Li J, et al. (2012) Notch1 activation promotes renal cell carcinoma growth via PI3K/Akt signaling. *Cancer Sci* 103: 1253-1258.
3. Van Poppel H, Becker F, Cadeddu JA, Gill IS, Janetschek G, et al. (2011) Treatment of localised renal cell carcinoma. *Eur Urol* 60: 662-672.
4. Drucker BJ (2005) Renal cell carcinoma: current status and future prospects. *Cancer Treat Rev* 31: 536-545.
5. Martignoni G, Brunelli M, Gobbo S, Remo A, Ficarra V, et al. (2007) Role of molecular markers in diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 29: 41-49.
6. Lang K, Danchenko N, Gondek K, Schwartz B, Thompson D (2007) The burden of illness associated with renal cell carcinoma in the United States. *Urol Oncol* 25: 368-375.
7. Girgis AH, Iakovlev VV, Beheshti B, Bayani J, Squire JA, et al. (2012) Multilevel whole-genome analysis reveals candidate biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res* 72: 5273-5284.
8. Wood LS. *Managing the Complex Journey of Renal Cell Carcinoma*; 2007; Las Vegas, NV.

9. Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, et al. (2001) Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9754-9759.
10. Moch H (2013) An overview of renal cell cancer: pathology and genetics. *Semin Cancer Biol* 23: 3-9.
11. Nickerson ML, Jaeger E, Shi Y, Durocher JA, Mahurkar S, et al. (2008) Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 14: 4726-4734.
12. Hirota E, Yan L, Tsunoda T, Ashida S, Fujime M, et al. (2006) Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 29: 799-827.
13. Yu G, Yao W, Wang J, Ma X, Xiao W, et al. (2012) LncRNAs expression signatures of renal clear cell carcinoma revealed by microarray. *PLoS One* 7: e42377.
14. Liu B, Bell AW, Paranjpe S, Bowen WC, Khillan JS, et al. (2010) Suppression of liver regeneration and hepatocyte proliferation in hepatocyte-targeted glypican 3 transgenic mice. *Hepatology* 52: 1060-1067.
15. Sawada Y, Sakai M, Yoshikawa T, Ofuji K, Nakatsura T (2012) A glypican-3-derived peptide vaccine against hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* 1: 1448-1450.

16. Kohashi K, Nakatsura T, Kinoshita Y, Yamamoto H, Yamada Y, et al. (2013) Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression. *Hum Pathol* 44: 526-533.
17. Wang YL, Zhu ZJ, Teng DH, Yao Z, Gao W, et al. (2012) Glypican-3 expression and its relationship with recurrence of HCC after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 18: 2408-2414.
18. Ho M, Kim H (2011) Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 47: 333-338.
19. Lin H, Huber R, Schlessinger D, Morin PJ (1999) Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 59: 807-810.
20. Xiang YY, Ladedo V, Filmus J (2001) Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. *Oncogene* 20: 7408-7412.
21. Li L, Jin R, Zhang X, Lv F, Liu L, et al. (2012) Oncogenic activation of glypican-3 by c-Myc in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 56: 1380-1390.
22. Sun CK, Chua MS, He J, So SK (2011) Suppression of glypican 3 inhibits growth of hepatocellular carcinoma cells through up-regulation of TGF-beta2. *Neoplasia* 13: 735-747.
23. (2009) TNM CLASSIFICATION OF MALIGNANT TUMORS; Leslie Bobin MG, Christian Wittekind, editor. 336 p.
24. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

25. Umezu T, Shibata K, Shimaoka M, Kajiyama H, Yamamoto E, et al. (2010) Gene silencing of glypican-3 in clear cell carcinoma of the ovary renders it more sensitive to the apoptotic agent paclitaxel in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 101: 143-148.
26. Liu S, Li Y, Chen W, Zheng P, Liu T, et al. (2012) Silencing glypican-3 expression induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 656-661.
27. Liu D, Shriver Z, Qi Y, Venkataraman G, Sasisekharan R (2002) Dynamic regulation of tumor growth and metastasis by heparan sulfate glycosaminoglycans. *Semin Thromb Hemost* 28: 67-78.
28. Sanderson RD (2001) Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol* 12: 89-98.
29. Lin CW, Mars WM, Paranjpe S, Donthamsetty S, Bhave VS, et al. (2011) Hepatocyte proliferation and hepatomegaly induced by phenobarbital and 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene is suppressed in hepatocyte-targeted glypican 3 transgenic mice. *Hepatology* 54: 620-630.
30. Murthy SS, Shen T, De Rienzo A, Lee WC, Ferriola PC, et al. (2000) Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. *Oncogene* 19: 410-416.
31. Gao W, Ho M (2011) The role of glypican-3 in regulating Wnt in hepatocellular carcinomas. *Cancer Rep* 1: 14-19.

32. Midorikawa Y, Ishikawa S, Iwanari H, Imamura T, Sakamoto H, et al. (2003) Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. *Int J Cancer* 103: 455-465.
33. Miao HL, Pan ZJ, Lei CJ, Wen JY, Li MY, et al. (2013) Knockdown of GPC3 inhibits the proliferation of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of YAP. *J Cell Biochem* 114: 625-631.
34. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
35. Farooq M, Hwang SY, Park MK, Kim JC, Kim MK, et al. (2003) Blocking endogenous glypican-3 expression releases Hep 3B cells from G1 arrest. *Mol Cells* 15: 356-360.
36. Robinson J, Viti M, Hook M (1984) Structure and properties of an under-sulfated heparan sulfate proteoglycan synthesized by a rat hepatoma cell line. *J Cell Biol* 98: 946-953.
37. Kure S, Yoshie O, Aso H (1987) Metastatic potential of murine B16 melanoma correlates with reduced surface heparan sulfate glycosaminoglycan. *Jpn J Cancer Res* 78: 1238-1245.
38. Moczar M, Caux F, Bailly M, Berthier O, Dore JF (1993) Accumulation of heparan sulfate in the culture of human melanoma cells with different metastatic ability. *Clin Exp Metastasis* 11: 462-471.
39. Zhu ZW, Friess H, Wang L, Abou-Shady M, Zimmermann A, et al. (2001) Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of

hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. *Gut* 48: 558-564.

40. Peters MG, Farias E, Colombo L, Filmus J, Puricelli L, et al. (2003) Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 80: 221-232.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: GPC3 expression using qRT-PCR. A) Clear cell renal cell carcinoma samples. B) Clear cell renal cell carcinoma cell lines.

Figure 2: GPC3 expression in renal cell carcinoma cell lines. A) Relative expression values of the GPC3 by qRT-PCR in renal cell carcinoma cell lines. B) Immunolocalization of GPC3 in ACHN and 786-O cell lines. Bars = 20 μ m. C) Densitometry graphic of GPC3 in ACHN and 786-O cell lines (***) = $p < 0.0001$, Mann Whitney test).

Figure 3: The GPC3 gene suppresses the colony formation in ACHN (A) and 786-O (B) cell lines. The colonies were counted 14 days after the transfection with pcDNA3.1 and pcDNA3.1/GPC3 (* $p < 0.01$).

Figure 4: Effect of GPC3 on cell proliferation. A) ACHN overexpressing GPC3 experienced a significant reduction in its proliferation rate after 72h ($p < 0.01$, ANOVA, Bonferroni post-hoc test). B) 786-O overexpressing GPC3 experienced a significant reduction in its proliferation rate after 24h ($p < 0.01$, ANOVA, Bonferroni post-hoc test), 48h and 72h ($p < 0.001$, ANOVA, Bonferroni post-hoc test).

Figure 5: The effect of GPC3 on Apoptosis. ACHN and 786-O cell lines were analyzed using flow cytometry 24h, 48h and 72h post-transfection. No difference in the apoptosis was observed between ACHN and 786-O cell overexpressing and lacking GPC3 at any of the points in time that were analyzed. Viable cells (Annexin V-/PI-) are located in the bottom left, early apoptotic cells (Annexin V+/PI-) in the bottom right, late apoptotic cells (Annexin V+/PI+) in the top right and necrotic cells (Annexin V-/PI+) in the top left quadrants, respectively.

Figure 6: GPC3 effect of cell cycle on cell lines. A) ACHN cell cycle histogram. B) 786-O cell cycle histogram. C) A significant increase in the number of ACHN pcDNA3.1/GPC3 cells during the G1 phase and decrease during the S and G2 phases 24h ($p < 0.001$, ANOVA), 48h ($p < 0.001$, ANOVA), and 72h ($p < 0.005$, ANOVA) after transfection. D) A significant increase in number of 786-O pcDNA3.1/GPC3 cells in S phase 24h after transfection ($p < 0.001$, ANOVA) and an increase in cells in the G1 phase 48h and 72h post-transfection ($p < 0.001$, ANOVA).

Table:**Table 1:** Description of clinical data of patients with clear cell renal cell carcinoma.

Variable	Number of Patients
Gender	
Male	19
Female	16
T Stage	
T1	13
T2	14
T3	7
T4	1
N Stage	
N0	31
N1	2
N2	1
N3	1
M Stage	
M0	28
M1	7
Average Age in Years	
Males	57.8
Females	57.1
Smoker	
No	30
Yes	5
Alcoholic	
No	27
Yes	8

Figure 1

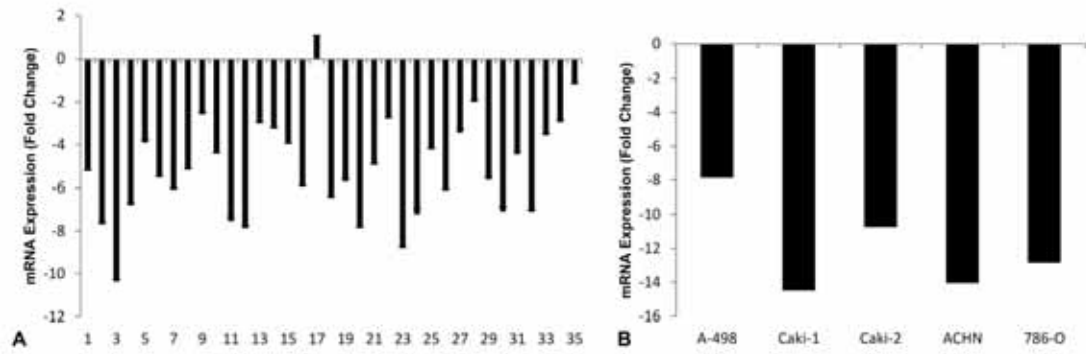


Figure 2

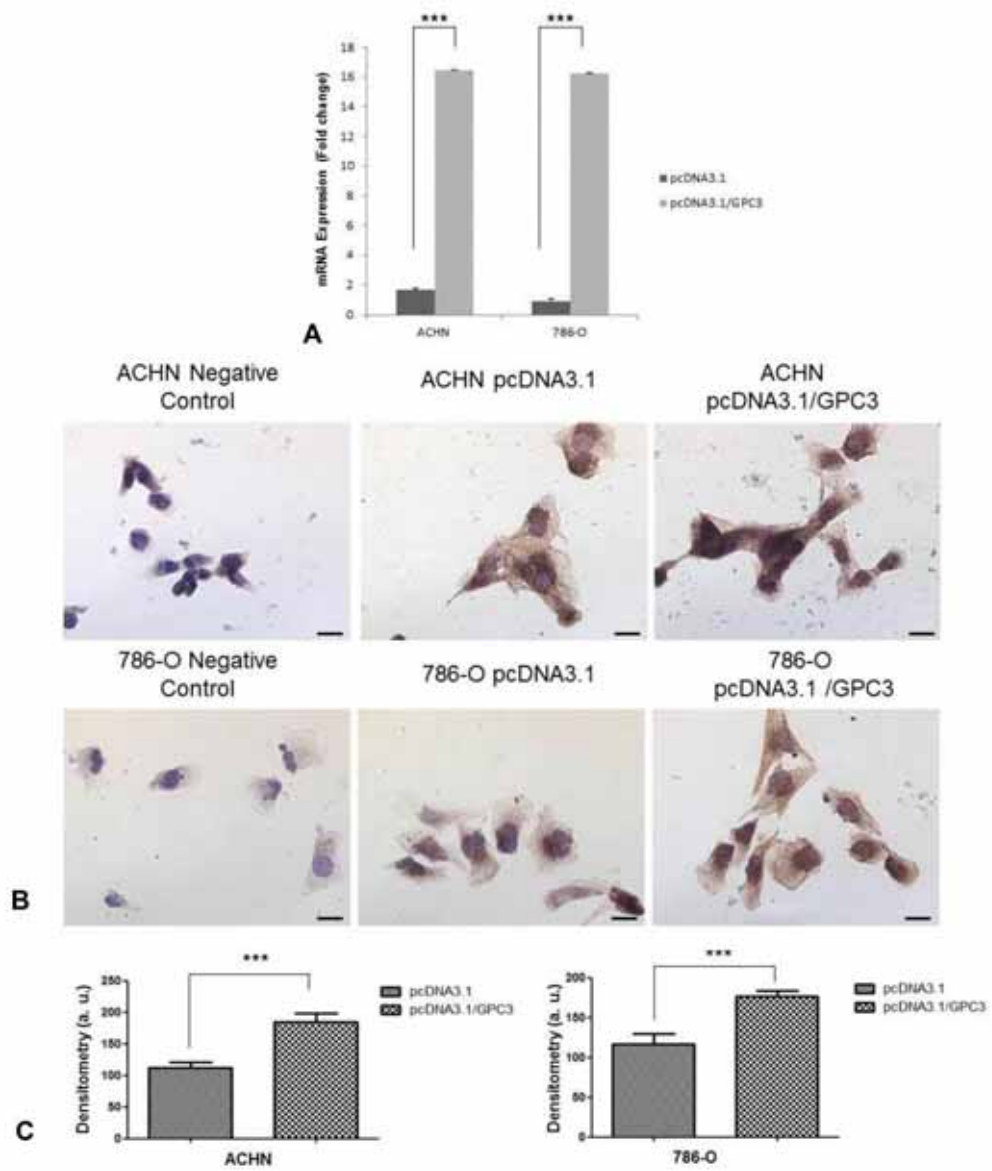


Figure 3

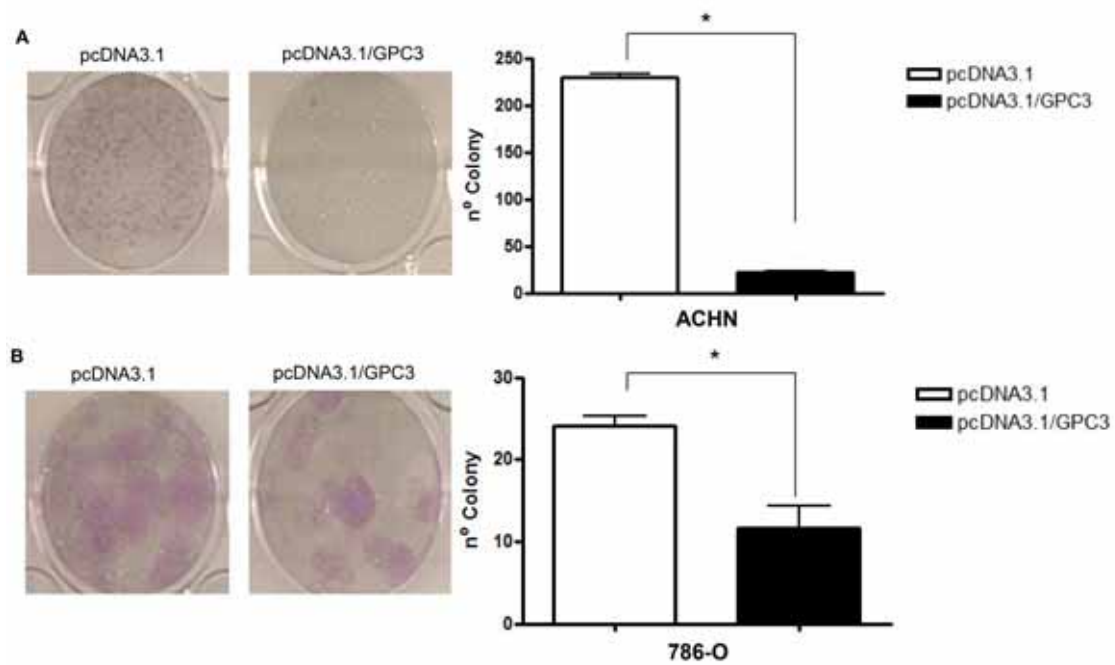


Figure 4

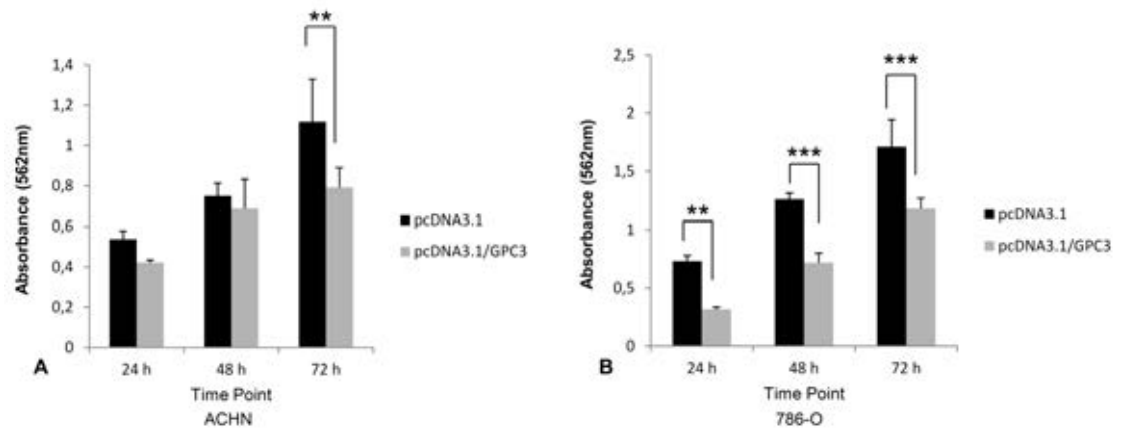


Figure 5

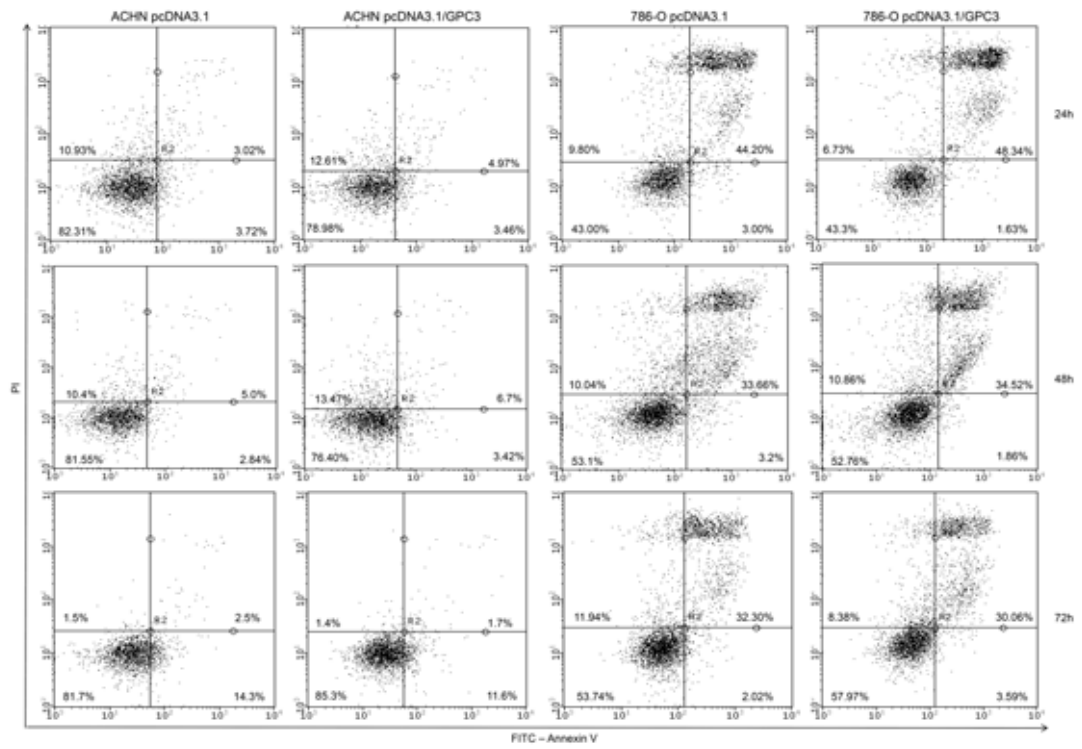
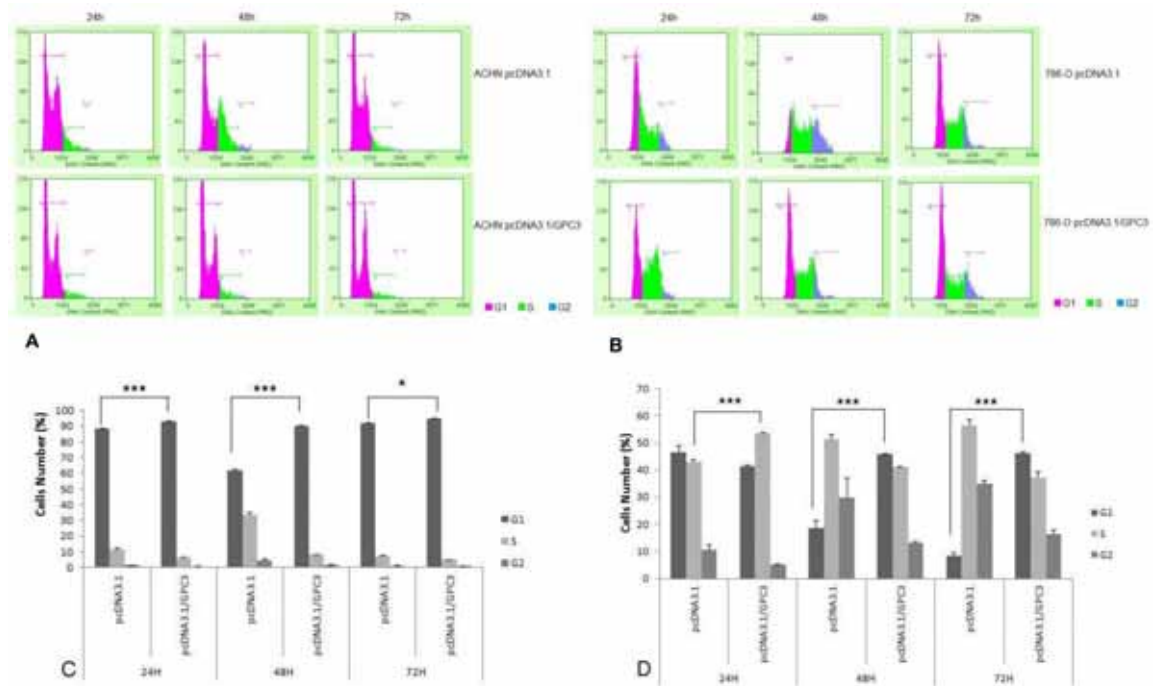


Figure 6



DISCUSSÃO

3. DISCUSSÃO

O tumor renal é raro e acomete 2% de todos os tumores malignos (WOOD, 2007). A incidência desta doença vem aumentando nas últimas décadas (COSTA; DRABKIN, 2007). É uma doença histologicamente heterogênea, sendo o subtipo histológico mais comum o carcinoma renal de células claras (PETRELLA; BRINCKERHOFF, 2006; NELSON; EVANS; LARA, 2007). O tratamento ocorre, principalmente, por nefrectomia e imunoterapia, modalidades terapêuticas bem estabelecidas; entretanto, a incidência de metástases em pacientes tratados é alta, apresentando uma expectativa de vida de 12 meses (CHO et al., 2008).

Apesar de muitos parâmetros clínicos serem utilizados na prática clínica, tais como a previsão de um bom resultado pós-cirúrgico ou uma terapia sistêmica, estes são bastante limitados; por isso, há necessidade de novas pesquisas e abordagens sobre o carcinoma renal, bem como a busca de novos marcadores de prognóstico e tratamento (TAN et al., 2008).

Assim, os mecanismos envolvidos na carcinogênese renal têm sido identificados por análise da expressão gênica, alvos moleculares para o desenvolvimento de novos tratamentos para carcinogênese renal (DOBASHI et al., 2009). Vários genes têm sido encontrados diferencialmente expressos em diversos tipos de tumores, entretanto

muito desses genes ainda têm função desconhecida no processo tumoral. Por isso é importante identificar genes associados com o carcinoma renal e analisar seus mecanismos de ação por meio de diversos estudos funcionais. Análise funcional de genes específicos podem fornecer informações de como esses genes atuam no equilíbrio da homeostase celular durante o processo carcinogênico (PIEROBON et al., 2009). Alguns estudos identificaram genes diferencialmente expressos em carcinoma renal de células claras, dentre eles, o gene *GPC3*, que foi encontrado com expressão reduzida nesse tipo de câncer (TAKAHASHI et al., 2001; HIROTA et al., 2006).

Glipican-3 (*GPC3*) é membro de uma família de proteoglicanos de heparina sulfatada (UMEZU et al., 2010; LIU et al., 2012). Os proteoglicanos de heparina sulfatada (HSPGs) possuem efeito no crescimento de células tumorais e na formação de metástases (LIU et al., 2002). HSPGs apresentam uma capacidade funcional para regular as interações moleculares que influenciam na proliferação celular e metástase (SANDERSON, 2001). A expressão de glipican-3 é alta em vários tecidos, como o trato embrionário gastrointestinal humano (LIN et al., 2011). Em diferentes tipos de tumores, sua expressão é variável; em câncer de fígado e melanoma, o *GPC3* é superexpresso (HO; KIM, 2011), já em câncer de ovário e câncer de mama, o *GPC3* está com baixa expressão (LIN et al., 1999; XIANG; LADEDA; FILMUS, 2001).

No presente estudo, o gene *GPC3* está com baixa expressão em carcinoma renal de células claras e em linhagens celulares de carcinoma renal. Esse resultado corrobora com os dados observados por Takahashi e colaboradores (TAKAHASHI et al., 2001), que também verificaram que o gene *GPC3* está com baixa expressão em amostras de carcinoma renal de células claras pela técnica de *Microarray*.

Nós observamos, pelo ensaio de formação de colônias, uma redução no crescimento tumoral das células superexpressando a proteína *GPC3*, e essas células superexpressando *GPC3* reduziram a taxa de proliferação após a transfecção na linhagem 786-O e 72h após a transfecção na linhagem ACHN.

Lin e colaboradores (LIN et al., 1999) e Murthy e colaboradores (MURTHY et al., 2000) mostraram que a reexpressão de *GPC3* em linhagens celulares de câncer de ovário resulta na inibição da eficiência de formação de colônias. Alguns estudos têm mostrado que *GPC3* desempenha um importante papel no crescimento e diferenciação celular (MIDORIKAWA et al., 2003; GAO; HO, 2011), como em carcinoma hepatocelular (MIAO et al., 2013). Os dados obtidos no presente estudo sugerem que *GPC3* inibe a proliferação celular em carcinoma renal de células claras.

Nós analisamos se a redução da taxa de proliferação nas células superexpressando *GPC3* ocorre por indução de apoptose ou pela parada do ciclo celular. Apoptose, ou morte celular programada, é um ponto

crucial no processo carcinogênico. As células tumorais podem driblar o mecanismo de apoptose e continuar a progressão (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LIU et al., 2012). Foi observado que a maioria das células expressando GPC3 e células não expressando GPC3 eram viáveis em todos os tempos, nas linhagens ACHN e 786-O. Baseado nos resultados obtidos, não podemos inferir que as células superexpressando GPC3 em carcinoma renal induzem apoptose; contudo, podemos hipotetizar que a inibição da proliferação pode ocorrer pela parada do ciclo celular neste tipo de câncer.

Nesse trabalho, analisamos o ciclo celular por citometria de fluxo para verificar se o GPC3 leva à parada do ciclo celular em carcinoma renal. Nossos resultados mostraram um efeito repressivo no crescimento devido à parada do ciclo celular na fase G1 de células superexpressando GPC3, reduzindo a proliferação em ambas as linhagens celulares analisadas. Observamos mudanças na taxa de proliferação celular utilizando a técnica de MTT na linhagem ACHN apenas em 72 horas após a transfecção. Por citometria de fluxo, foi possível identificar alterações no ciclo celular e, conseqüentemente, na proliferação celular em apenas 24 horas após a transfecção na mesma linhagem celular. Essa diferença provavelmente ocorreu porque a metodologia de citometria de fluxo é mais sensível que o MTT quando se trata de detectar quaisquer mudanças no ciclo celular/proliferação. Um estudo observou que a inibição da expressão de GPC3 libera as células da parada do ciclo

celular na fase G1 em carcinoma hepatocelular, modulando a progressão do ciclo celular nesse tipo de câncer (FAROOQ et al., 2003).

Além disso, HSPGs da superfície celular podem inibir a invasão por promover firme adesão célula-célula e célula- matriz extracelular (EMC). Estudos prévios documentaram quantidades e qualidades diminuídas de heparina sulfatadas isoladas de células transformadas, quando comparadas com células normais (ROBINSON; VITI; HOOK, 1984). Essa alteração em heparina sulfatada ocasiona redução na capacidade de adesão de células transformadas. Baixos níveis de heparina sulfatada na superfície celular também estão correlacionados com a alta atividade metastática em melanomas (KURE; YOSHIE; ASO, 1987; MOCZAR et al., 1993). A baixa expressão foi mais significativa em áreas invasivas, um resultado que sugere que a inibição de GPC3 desempenha um papel na progressão tumoral em carcinoma hepatocelular (ZHU et al., 2001). O aumento da expressão de glipican-3 diferencia a maioria dos carcinomas hepatocelulares de desordens hepáticas benignas. A expressão de GPC3 também está silenciada em câncer de mama e a reexpressão de glipican-3 inibe o crescimento de linhagens celulares de câncer de mama (XIANG; LADEDA; FILMUS, 2001). Além disso, glipican-3 pode inibir a invasão e metástases em linhagem celular de carcinoma de mama *in vivo* (PETERS et al., 2003).

Dessa forma, células com morfologia epitelial normal exibem uma retenção de HSPGs na superfície celular e aderem firmemente à matriz

extracelular. As células iniciando o processo de invasão exibem uma redução da adesão à matriz extracelular, perdem a morfologia epitelial e diminuem os níveis de expressão de HSPGs, enquanto células profundamente invasivas perdem totalmente a expressão de HSPG (Figura 5) (SANDERSON, 2001).

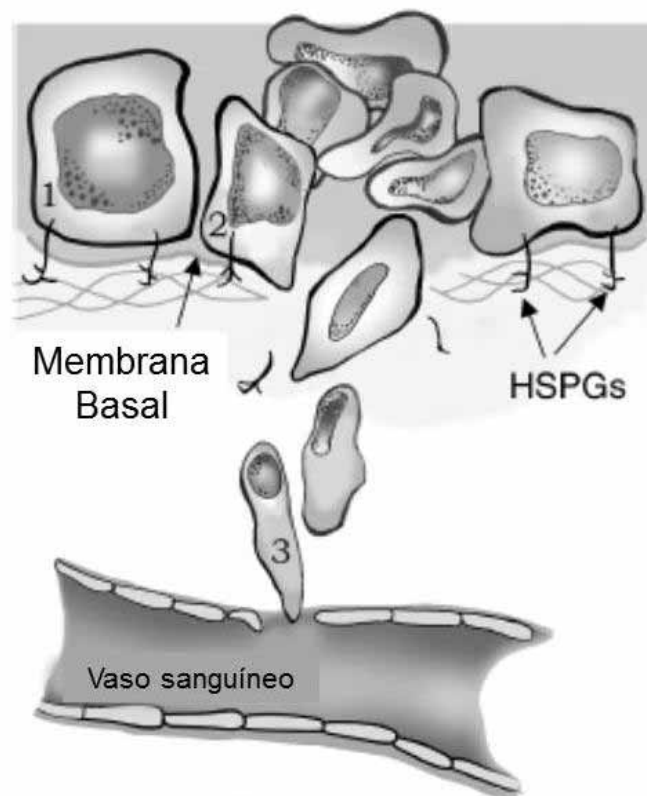


Figura 5: Modelo que descreve a perda da expressão de HSPG na superfície celular. Células com morfologia epitelial normal (1), células iniciando o processo de invasão (2) e células invasivas (3) (Modificado de (SANDERSON, 2001)).

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho permitiu concluir que:

- 1) A expressão do gene *GPC3* está reduzida em carcinoma renal de células claras e em linhagens celulares de carcinoma renal.
- 2) A expressão da proteína *GPC3* está aumentada nas células transfectadas com o vetor pcDNA3.1/*GPC3*, comparada com as células transfectadas com o vetor pcDNA3.1.
- 3) A superexpressão da proteína *GPC3* reduz a taxa de proliferação celular em linhagens celulares de carcinoma renal.
- 4) O gene *GPC3* não induz apoptose em linhagem celular de carcinoma renal.
- 5) A superexpressão da proteína *GPC3* leva à parada do ciclo celular na fase G1.

Os resultados obtidos sugerem que o gene *GPC3* atua como um supressor tumoral em carcinoma renal de células claras.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGABA, F. et al. Current pathology keys of renal cell carcinoma. **Eur Urol**, v. 60, n. 4, p. 634-43, Oct 2011.

ANGELA SILVA BARBOSA, C. J. L. Silenciamento de Genes com RNA Interferência: Um Novo Instrumento para Investigação da Fisiologia e Fisiopatologia do Córtex Adrenal

Arq. Bras Endocrinol Metab, v. 48/5, p. 612-619, 2004.

BAI, X.; WU, C. L. Renal cell carcinoma and mimics: pathologic primer for radiologists. **AJR Am J Roentgenol**, v. 198, n. 6, p. 1289-93, Jun 2012.

BALDEWIJNS, M. M. et al. Genetics and epigenetics of renal cell cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1785, n. 2, p. 133-55, Apr 2008.

BAUMHOER, D. et al. Glypican 3 expression in human nonneoplastic, preneoplastic, and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis of 4,387 tissue samples. **Am J Clin Pathol**, v. 129, n. 6, p. 899-906, Jun 2008.

BENATIYA, M. A. et al. Renal oncocytoma: experience of Clinical Urology A, Urology Department, CHU Ibn Sina, Rabat, Morocco and literature review. **Pan Afr Med J**, v. 12, p. 84, 2012.

BISHOP, J. R.; SCHUKSZ, M.; ESKO, J. D. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. **Nature**, v. 446, n. 7139, p. 1030-7, Apr 26 2007.

BUCHANAN, C. et al. Glypican-3 reexpression regulates apoptosis in murine adenocarcinoma mammary cells modulating PI3K/Akt and p38MAPK signaling pathways. **Breast Cancer Res Treat**, v. 119, n. 3, p. 559-74, Feb 2010.

CAI, M. Y. et al. High-expression of ZBP-89 correlates with distal metastasis and poor prognosis of patients in clear cell renal cell carcinoma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 426, n. 4, p. 636-42, Oct 5 2012.

CASCON, A. et al. Loss of the actin regulator HSPC300 results in clear cell renal cell carcinoma protection in Von Hippel-Lindau patients. **Hum Mutat**, v. 28, n. 6, p. 613-21, Jun 2007.

CHEN, I. P. et al. Positive glypican-3 expression in early hepatocellular carcinoma predicts recurrence after hepatectomy. **J Gastroenterol**, v., Mar 27 2013.

CHO, E.; ADAMI, H. O.; LINDBLAD, P. Epidemiology of renal cell cancer. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 25, n. 4, p. 651-65, Aug 2011.

CHO, K. S. et al. A comprehensive prognostic stratification for patients with metastatic renal clear cell carcinoma. **Yonsei Med J**, v. 49, n. 3, p. 451-8, Jun 30 2008.

CHOUJIRI, T. K.; BUKOWSKI, R. M.; RINI, B. I. The current role of angiogenesis inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma. **Semin Oncol**, v. 33, n. 5, p. 596-606, Oct 2006.

CHOW, W. H.; DEVESA, S. S. Contemporary epidemiology of renal cell cancer. **Cancer J**, v. 14, n. 5, p. 288-301, Sep-Oct 2008.

CHOW, W. H. et al. Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men. **N Engl J Med**, v. 343, n. 18, p. 1305-11, Nov 2 2000.

COSTA, L. J.; DRABKIN, H. A. Renal cell carcinoma: new developments in molecular biology and potential for targeted therapies. **Oncologist**, v. 12, n. 12, p. 1404-15, Dec 2007.

DASTE, A. et al. Prolonged efficacy of mTOR inhibitors in papillary renal cell carcinoma: progression-free survival lasting for over 3 years, a case report and review of the literature. **Target Oncol**, v., Jan 3 2013.

DECASTRO, G. J.; MCKIERNAN, J. M. Epidemiology, clinical staging, and presentation of renal cell carcinoma. **Urol Clin North Am**, v. 35, n. 4, p. 581-92; vi, Nov 2008.

DENG, F. M.; MELAMED, J. Histologic variants of renal cell carcinoma: does tumor type influence outcome? **Urol Clin North Am**, v. 39, n. 2, p. 119-32, v, May 2012.

DOBASHI, S. et al. Involvement of TMEM22 overexpression in the growth of renal cell carcinoma cells. **Oncol Rep**, v. 21, n. 2, p. 305-12, Feb 2009.

DRUCKER, B. J. Renal cell carcinoma: current status and future prospects. **Cancer Treat Rev**, v. 31, n. 7, p. 536-45, Nov 2005.

ELWOOD, H. et al. Immunohistochemical analysis of SMARCB1/INI-1 expression in collecting duct carcinoma. **Urology**, v. 78, n. 2, p. 474 e1-5, Aug 2011.

ESCUDIER, B. et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, v. 23 Suppl 7, p. vii65-71, Oct 2012.

ESPER, P. Concepts in advanced renal carcinoma. **Semin Oncol Nurs**, v. 28, n. 3, p. 170-9, Aug 2012.

FAROOQ, M. et al. Blocking endogenous glypican-3 expression releases Hep 3B cells from G1 arrest. **Mol Cells**, v. 15, n. 3, p. 356-60, Jun 30 2003.

FILMUS, J.; SELLECK, S. B. Glypicans: proteoglycans with a surprise. **J Clin Invest**, v. 108, n. 4, p. 497-501, Aug 2001.

FINLEY, D. S.; PANTUCK, A. J.; BELLDEGRUN, A. S. Tumor biology and prognostic factors in renal cell carcinoma. **Oncologist**, v. 16 Suppl 2, p. 4-13, 2011.

FUHRMAN, S. A.; LASKY, L. C.; LIMAS, C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v. 6, n. 7, p. 655-63, Oct 1982.

GAO, W.; HO, M. The role of glypican-3 in regulating Wnt in hepatocellular carcinomas. **Cancer Rep**, v. 1, n. 1, p. 14-19, 2011.

GIANAZZA, E. et al. Alterations of the serum peptidome in renal cell carcinoma discriminating benign and malignant kidney tumors. **J Proteomics**, v. 76 Spec No., p. 125-40, Dec 5 2012.

GIRGIS, A. H. et al. Multilevel whole-genome analysis reveals candidate biomarkers in clear cell renal cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 72, n. 20, p. 5273-84, Oct 15 2012.

GONZALEZ, A. D. et al. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. **J Cell Biol**, v. 141, n. 6, p. 1407-14, Jun 15 1998.

GREVING, J. P. et al. Alcoholic beverages and risk of renal cell cancer. **Br J Cancer**, v. 97, n. 3, p. 429-33, Aug 6 2007.

GUDBJARTSSON, T. et al. Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. **Eur Urol**, v. 48, n. 4, p. 593-600, Oct 2005.

HAAS, N. B.; UZZO, R. G. Targeted therapies for kidney cancer in urologic practice. **Urol Oncol**, v. 25, n. 5, p. 420-32, Sep-Oct 2007.

HAGENKORD, J. M. et al. Clinical genomics of renal epithelial tumors. **Cancer Genet**, v. 204, n. 6, p. 285-97, Jun 2011.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HIROTA, E. et al. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 29, n. 4, p. 799-827, Oct 2006.

HO, M.; KIM, H. Glypican-3: a new target for cancer immunotherapy. **Eur J Cancer**, v. 47, n. 3, p. 333-8, Feb 2011.

HSU, H. C.; CHENG, W.; LAI, P. L. Cloning and expression of a developmentally regulated transcript MXR7 in hepatocellular carcinoma: biological significance and temporospatial distribution. **Cancer Res**, v. 57, n. 22, p. 5179-84, Nov 15 1997.

INMAN, B. A.; HARRISON, M. R.; GEORGE, D. J. Novel immunotherapeutic strategies in development for renal cell carcinoma. **Eur Urol**, v. 63, n. 5, p. 881-9, May 2013.

IVANOV, K. et al. Comparative analysis of prognostic significance of molecular markers of apoptosis with clinical stage and tumor differentiation in patients with colorectal cancer: a single institute experience. **Hepatogastroenterology**, v. 56, n. 89, p. 94-8, Jan-Feb 2009.

JEONG, B. J. et al. CD44 is associated with tumor recurrence and is an independent poor prognostic factor for patients with localized clear cell renal cell carcinoma after nephrectomy. **Exp Ther Med**, v. 3, n. 5, p. 811-817, May 2012.

JIA, H. L. et al. Gene expression profiling reveals potential biomarkers of human hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 4, p. 1133-9, Feb 15 2007.

KAELIN, W. G., JR. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 2 Pt 2, p. 680s-684s, Jan 15 2007.

KANDIL, D. H.; COOPER, K. Glypican-3: a novel diagnostic marker for hepatocellular carcinoma and more. **Adv Anat Pathol**, v. 16, n. 2, p. 125-9, Mar 2009.

KELSH, M. A. et al. Occupational trichloroethylene exposure and kidney cancer: a meta-analysis. **Epidemiology**, v. 21, n. 1, p. 95-102, Jan 2010.

KIM, M. J. et al. HDAC inhibitors synergize antiproliferative effect of sorafenib in renal cell carcinoma cells. **Anticancer Res**, v. 32, n. 8, p. 3161-8, Aug 2012.

KIRKPATRICK, C. A.; SELLECK, S. B. Heparan sulfate proteoglycans at a glance. **J Cell Sci**, v. 120, n. Pt 11, p. 1829-32, Jun 1 2007.

KLEEFF, J. et al. The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. **J Clin Invest**, v. 102, n. 9, p. 1662-73, Nov 1 1998.

KURE, S.; YOSHIE, O.; ASO, H. Metastatic potential of murine B16 melanoma correlates with reduced surface heparan sulfate glycosaminoglycan. **Jpn J Cancer Res**, v. 78, n. 11, p. 1238-45, Nov 1987.

KWACK, M. H.; CHOI, B. Y.; SUNG, Y. K. Cellular changes resulting from forced expression of glypican-3 in hepatocellular carcinoma cells. **Mol Cells**, v. 21, n. 2, p. 224-8, Apr 30 2006.

LABER, D. A. Risk factors, classification, and staging of renal cell cancer. **Med Oncol**, v. 23, n. 4, p. 443-54, 2006.

LANG, K. et al. The burden of illness associated with renal cell carcinoma in the United States. **Urol Oncol**, v. 25, n. 5, p. 368-75, Sep-Oct 2007.

LAU, W. K. et al. Prognostic features of pathologic stage T1 renal cell carcinoma after radical nephrectomy. **Urology**, v. 59, n. 4, p. 532-7, Apr 2002.

LEE, H. J. et al. Overexpression of IL-32 is a novel prognostic factor in patients with localized clear cell renal cell carcinoma. **Oncol Lett**, v. 3, n. 2, p. 490-496, Feb 2012.

LEE, S. E. et al. Significance of macroscopic tumor necrosis as a prognostic indicator for renal cell carcinoma. **J Urol**, v. 176, n. 4 Pt 1, p. 1332-7; discussion 1337-8, Oct 2006.

LETANG, N. et al. [Prognostic factors in renal cell carcinoma]. **Bull Cancer**, v. 96, n. 4, p. 475-84, Apr 2009.

LIN, C. W. et al. Hepatocyte proliferation and hepatomegaly induced by phenobarbital and 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene is suppressed in hepatocyte-targeted glypican 3 transgenic mice. **Hepatology**, v. 54, n. 2, p. 620-30, Aug 2011.

LIN, H. et al. Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. **Cancer Res**, v. 59, n. 4, p. 807-10, Feb 15 1999.

LIN, Q. et al. Expression of GPC3 protein and its significance in lung squamous cell carcinoma. **Med Oncol**, v. 29, n. 2, p. 663-9, Jun 2012.

LIU, D. et al. Dynamic regulation of tumor growth and metastasis by heparan sulfate glycosaminoglycans. **Semin Thromb Hemost**, v. 28, n. 1, p. 67-78, Feb 2002.

LIU, S. et al. Silencing glypican-3 expression induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 419, n. 4, p. 656-61, Mar 23 2012.

LJUNGBERG, B. et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. **Eur Urol**, v. 60, n. 4, p. 615-21, Oct 2011.

MAHER, E. R. Genomics and epigenomics of renal cell carcinoma. **Semin Cancer Biol**, v. 23, n. 1, p. 10-7, Feb 2013.

MARTIGNONI, G. et al. Role of molecular markers in diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma. **Anal Quant Cytol Histol**, v. 29, n. 1, p. 41-9, Feb 2007.

MIAO, H. L. et al. Knockdown of GPC3 inhibits the proliferation of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of YAP. **J Cell Biochem**, v. 114, n. 3, p. 625-31, Mar 2013.

MIDORIKAWA, Y. et al. Glypican-3, overexpressed in hepatocellular carcinoma, modulates FGF2 and BMP-7 signaling. **Int J Cancer**, v. 103, n. 4, p. 455-65, Feb 10 2003.

MOCH, H. An overview of renal cell cancer: pathology and genetics. **Semin Cancer Biol**, v. 23, n. 1, p. 3-9, Feb 2013.

MOCH, H. et al. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. **Cancer**, v. 89, n. 3, p. 604-14, Aug 1 2000.

MOCZAR, M. et al. Accumulation of heparan sulfate in the culture of human melanoma cells with different metastatic ability. **Clin Exp Metastasis**, v. 11, n. 6, p. 462-71, Nov 1993.

MURTHY, S. S. et al. Expression of GPC3, an X-linked recessive overgrowth gene, is silenced in malignant mesothelioma. **Oncogene**, v. 19, n. 3, p. 410-6, Jan 20 2000.

NELSON, E. C.; EVANS, C. P.; LARA, P. N., JR. Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies. **Cancer Treat Rev**, v. 33, n. 3, p. 299-313, May 2007.

NG, C. S. et al. Renal cell carcinoma: diagnosis, staging, and surveillance. **AJR Am J Roentgenol**, v. 191, n. 4, p. 1220-32, Oct 2008.

NICODEMUS, K. K.; SWEENEY, C.; FOLSOM, A. R. Evaluation of dietary, medical and lifestyle risk factors for incident kidney cancer in postmenopausal women. **Int J Cancer**, v. 108, n. 1, p. 115-21, Jan 1 2004.

PALAPATTU, G. S. et al. Collecting system invasion in renal cell carcinoma: impact on prognosis and future staging strategies. **J Urol**, v. 170, n. 3, p. 768-72; discussion 772, Sep 2003.

PARKER, A. S. et al. Smoking cessation and renal cell carcinoma. **Ann Epidemiol**, v. 13, n. 4, p. 245-51, Apr 2003.

PATARD, J. J. et al. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: a multicenter experience. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 12, p. 2763-71, Apr 20 2005.

PEREZ-GRACIA, J. L. et al. [New treatments for renal carcinoma]. **An Sist Sanit Navar**, v. 30, n. 3, p. 393-403, Sep-Dec 2007.

PETERS, M. G. et al. Inhibition of invasion and metastasis by glypican-3 in a syngeneic breast cancer model. **Breast Cancer Res Treat**, v. 80, n. 2, p. 221-32, Jul 2003.

PETRELLA, B. L.; BRINCKERHOFF, C. E. Tumor cell invasion of von Hippel Lindau renal cell carcinoma cells is mediated by membrane type-1 matrix metalloproteinase. **Mol Cancer**, v. 5, p. 66, 2006.

PICKEN, M. M. Editorial comment from Dr Picken to Molecular pathology of renal oncocytoma: a review. **Int J Urol**, v. 17, n. 7, p. 613-4, Jul 2010.

PIEROBON, M. et al. Multiplexed cell signaling analysis of metastatic and nonmetastatic colorectal cancer reveals COX2-EGFR signaling activation as a potential prognostic pathway biomarker. **Clin Colorectal Cancer**, v. 8, n. 2, p. 110-7, Apr 2009.

PURDUE, M. P. et al. An investigation of risk factors for renal cell carcinoma by histologic subtype in two case-control studies. **Int J Cancer**, v. 132, n. 11, p. 2640-7, Jun 1 2013.

ROBERTO PILI, R. R. Cancer of the Kidney. In: ELSEVIER, C. L. (Ed.). **Abeloff's Clinical Oncology**. Philadelphia, 2008.

ROBINSON, J.; VITI, M.; HOOK, M. Structure and properties of an under-sulfated heparan sulfate proteoglycan synthesized by a rat hepatoma cell line. **J Cell Biol**, v. 98, n. 3, p. 946-53, Mar 1984.

SANDERSON, R. D. Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. **Semin Cell Dev Biol**, v. 12, n. 2, p. 89-98, Apr 2001.

SIRCAR, K. et al. Contemporary approach to diagnosis and classification of renal cell carcinoma with mixed histologic features. **Chin J Cancer**, v., Dec 7 2012.

SOUNG SULLIVAN, P. et al. Classical pathology versus molecular pathology in renal cell carcinoma. **Curr Urol Rep**, v. 8, n. 1, p. 5-11, Jan 2007.

SUN, M. et al. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. **Eur Urol**, v. 60, n. 4, p. 644-61, Oct 2011.

SUNG, Y. K. et al. Glypican-3 is overexpressed in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Sci**, v. 94, n. 3, p. 259-62, Mar 2003.

SWARTZ, M. A. et al. Renal medullary carcinoma: clinical, pathologic, immunohistochemical, and genetic analysis with pathogenetic implications. **Urology**, v. 60, n. 6, p. 1083-9, Dec 2002.

TAKAHASHI, M. et al. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 17, p. 9754-9, Aug 14 2001.

TAN, X. et al. Global analysis of metastasis-associated gene expression in primary cultures from clinical specimens of clear-cell renal-cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 123, n. 5, p. 1080-8, Sep 1 2008.

TANG, P. A.; VICKERS, M. M.; HENG, D. Y. Clinical and molecular prognostic factors in renal cell carcinoma: what we know so far. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 25, n. 4, p. 871-91, Aug 2011.

UMEZU, T. et al. Gene silencing of glypican-3 in clear cell carcinoma of the ovary renders it more sensitive to the apoptotic agent paclitaxel in vitro and in vivo. **Cancer Sci**, v. 101, n. 1, p. 143-8, Jan 2010.

VAN POPPEL, H. et al. Treatment of localised renal cell carcinoma. **Eur Urol**, v. 60, n. 4, p. 662-72, Oct 2011.

VEUGELERS, M. et al. Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. **J Biol Chem**, v. 274, n. 38, p. 26968-77, Sep 17 1999.

VICKERS, M. M.; HENG, D. Y. Prognostic and predictive biomarkers in renal cell carcinoma. **Target Oncol**, v. 5, n. 2, p. 85-94, Jun 2010.

VOLPE, A.; PATARD, J. J. Prognostic factors in renal cell carcinoma. **World J Urol**, v. 28, n. 3, p. 319-27, Jun 2010.

WONDERGEM, B. et al. Expression of the PTTG1 oncogene is associated with aggressive clear cell renal cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 72, n. 17, p. 4361-71, Sep 1 2012.

WOOD, L. S. C., S. C.; MOLDAWER, N. P. Managing the Complex Journey of Renal Cell Carcinoma

In: Spotlight on Symposia From the ONS 32nd Annual Congress in Las Vegas , NV. 2007.

WOODWARD, E. R. et al. Familial non-VHL clear cell (conventional) renal cell carcinoma: clinical features, segregation analysis, and mutation analysis of FLCN. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 18, p. 5925-30, Sep 15 2008.

XIANG, Y. Y.; LADEDA, V.; FILMUS, J. Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. **Oncogene**, v. 20, n. 50, p. 7408-12, Nov 1 2001.

XU, X.; WEIDNER, N. Papillary renal carcinoma arising in an ectopic native kidney and status after renal transplant: a report of a unique case and review of the literature. **Case Rep Pathol**, v. 2012, p. 831403, 2012.

YUSENKO, M. V. Molecular pathology of renal oncocytoma: a review. **Int J Urol**, v. 17, n. 7, p. 602-12, Jul 2010.

ZHANG, Y. Y. et al. Angiomyolipoma with minimal fat: differentiation from papillary renal cell carcinoma by helical CT. **Clin Radiol**, v. 68, n. 4, p. 365-70, Apr 2013.

ZHAO, A. et al. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. **Exp Mol Pathol**, v. 94, n. 1, p. 115-20, Feb 2013.

ZHU, Z. W. et al. Enhanced glypican-3 expression differentiates the majority of hepatocellular carcinomas from benign hepatic disorders. **Gut**, v. 48, n. 4, p. 558-64, Apr 2001.

<http://www.rndsystems.com/Cytokine_cb08i2_GlypicansinCancer.aspx>.
Acesso em 22 de Junho de 2013.