

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Daniel Pinheiro Ferreira

Perfil de expressão proteica de G6PD e NADK em carcinoma de células renais como
indicador prognóstico

Uberaba

2024

Daniel Pinheiro Ferreira

Perfil de expressão proteica de G6PD e NADK em carcinoma de células renais como
indicador prognóstico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Investigativa”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre. Orientador: Prof. Dra. Régia Caroline Peixoto Lira Fusco

Uberaba

2024

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

F44p	<p>Ferreira, Daniel Pinheiro Perfil de expressão proteica de G6PD e NADK em carcinoma de células renais como indicador prognóstico / Daniel Pinheiro Ferreira. -- 2024. 63 f. : il., fig., graf., tab.</p>
	<p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024 Orientadora: Profa. Dra. Régia Caroline Peixoto Lira Fusco</p>
	<p>1. Neoplasias renais. 2. prognóstico. 3. Glucosefosfato desidrogenase. I. Fusco, Régia Caroline Peixoto Lira. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p>
	<p>CDU 616.61-006</p>

PERFIL DE EXPRESSÃO PROTEICA DE G6PD E NADK EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIAS COMO INDICADOR PROGNÓSTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Investigativa” (Linha de Pesquisa: Aspectos Morfológicos, Celulares e Moleculares das Doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 27 de agosto de 2024

Banca Examinadora:

Dra. Régia Caroline Peixoto Lira Fusco – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Fernanda Bernadelli de Vito
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Graziella Ribeiro de Sousa
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP



Documento assinado eletronicamente por **REGIA CAROLINE PEIXOTO LIRA FUSCO, Professor do Magistério Superior**, em 29/08/2024, às 15:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA BERNADELLI DE VITO, Técnico-Administrativo em Educação**, em 30/08/2024, às 08:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **Graziella Ribeiro de Sousa, Usuário Externo**, em 30/08/2024, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1322841** e o código CRC **583181FC**.

Dedico a minha esposa Renata, que sempre me apoiou e a meus filhos Rafael e Luiza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa Renata que tanto me ajudou nesse projeto que estou concluindo agora. Sem ela seria impossível realizar esse sonho. Não posso também deixar de agradecer aos meus filhos Rafael e Luiza que compreenderam a minha necessidade de estudar e que abdicaram tempo comigo para que eu pudesse escrever essa dissertação.

Aos meus pais, José Luiz e Líbia, que sempre me apoiaram e fizeram de tudo para que eu tivesse a melhor educação acadêmica. As minhas irmãs, Carolina e Tércia, que mesmo longe sempre torceram por mim.

Agradecimento especial para a minha orientadora Dra. Régia Caroline, por todo aprendizado que adquiri nesse novo mundo da pós-graduação *Stricto Sensu*. Aos professores, funcionários e novos amigos da disciplina de patologia geral, com os quais tive o prazer de conviver nesses últimos dois anos, em especial a Dra. Adilha, Dra. Liliane e Dra. Crislaine que tiveram grande contribuição nesse estudo.

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”

Thomas Edison

APOIO FINANCEIRO

A realização deste trabalho obteve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Centro de Pesquisa em Rim da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Cepim – UFTM).

RESUMO

O carcinoma de células renais (CRR) é a neoplasia urológica mais letal e corresponde a cerca de 2-3% de todos os tipos de câncer diagnosticados. As principais variantes histológicas são células claras (CCRcc), papilífero (CCRp) e cromóforo (CCRcr). Os fatores prognósticos incluem classificação TNM, grau de Fuhrman e subtipo histológico. Para prevenir o estresse oxidativo, durante a progressão tumoral, as células ativam um complexo sistema de defesa antioxidante, que depende da geração de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH). A síntese de NADPH é regulada por enzimas e vias metabólicas, incluindo Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Kinase (NADK) e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) na via das pentoses-fosfato. O objetivo deste estudo foi investigar a expressão de G6PD e NADK associando com fatores prognósticos e de agressividade tumoral em uma coorte de CCR do Hospital de Clínicas da UFTM. As expressões proteicas foram investigadas por imuno-histoquímica em 121 casos, associações entre os padrões de expressão e dados clínicos e patológicos foram investigados através de análises estatísticas. Observou-se maior porcentagem de células marcadas e maior escore de expressão da G6PD em CCRp e CCRcr. Tumores maiores apresentaram maior porcentagem de células positivas e, para o subtipo CCRcc, o maior escore de expressão da G6PD também indicou tumores mais extensos. Maior porcentagem de células marcadas e o escore da G6PD também tiveram associação com graus mais elevados de Fuhrman. Já a presença de necrose tumoral teve associação com o escore de expressão da G6PD apenas no CCRcc. Para a enzima NADK, todos os casos de CCRp e CCRcr apresentaram mais de 50% de células marcadas, sendo o carcinoma papilífero o tumor com maior escore de expressão e a maior intensidade de imunomarcção. O grau de Fuhrman mais elevado também teve associação com a porcentagem de células marcadas e com o escore de NADK. Ainda, observou-se correlação positiva significativa entre os escores de G6PD e NADK. Os resultados sugerem que NADK e G6PD são enzimas associadas com CCRp e graus de Fuhrman mais elevados. A G6PD parece ter maior potencial como marcador de agressividade tumoral, sobretudo para tamanho e presença de necrose no subtipo CCRcc.

Palavras chaves: G6PD. NADK. Prognóstico. Carcinoma de células renais.

ABSTRACT

Renal cell carcinoma (RCC) is the most lethal urological neoplasm and accounts for approximately 2-3% of all diagnosed cancers. The main histological variants are clear cell (ccRCC), papillary (pRCC) and chromophobe (chRCC). Prognostic factors include TNM classification, Fuhrman grade, and histological subtype. To prevent oxidative stress, during tumor progression, cells activate a complex antioxidant defense system, which depends on the generation of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH). NADPH synthesis is regulated by enzymes and metabolic pathways, including Nicotinamide Adenine Dinucleotide Kinase (NADK) and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) in the pentose phosphate pathway. The objective of this study was to investigate the expression of G6PD and NADK associated with prognostic factors and tumor aggressiveness in a RCC cohort from Hospital de Clínicas - UFTM. Protein expressions were analyzed by immunohistochemistry in 121 cases, associations between expression patterns and clinical and pathological data were investigated through statistical analyses. A higher percentage of labeled cells and a higher G6PD expression score were observed in pRCC and chRCC. Larger tumors had a higher percentage of positive cells, and, in the ccRCC group, the highest G6PD expression score also indicated more extensive tumors. A higher percentage of labeled cells and G6PD expression score were also associated with higher Fuhrman grades. The presence of tumor necrosis was associated with the G6PD expression score only in the ccRCC group. Regarding the NADK enzyme, all cases of pRCC and chRCC showed more than 50% of labeled cells, papillary carcinoma presented the highest NADK expression score and the highest NADK intensity. The highest Fuhrman grade was also associated with the percentage of labeled cells and the NADK expression score. Furthermore, a significant positive correlation was observed between G6PD and NADK expression scores. The results suggest that NADK and G6PD are enzymes associated with pRCC and higher Fuhrman grades. G6PD appears to have greater potential as a marker of tumor aggressiveness, especially for size and presence of necrosis in the ccRCC.

Keywords: G6PD. NADK. Prognosis. Renal cell carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais subtipos histológicos do carcinoma de células renais.....	17
Figura 2 - Papel da NADK, G6PD e enzimas málicas na geração de NADPH.....	22
Figura 3 - Via das pentoses-fosfato.....	25
Figura 4 - Técnica de TMA.....	32
Figura 5 - Padrão de intensidade de expressão da enzima G6PD.....	37
Figura 6 - Resultados G6PD x tipo histopatológico.....	37
Figura 7 - Porcentagem de células marcadas G6PD nos tumores <7cm e >7cm.....	38
Figura 8 - Resultados G6PD x Grau de Fuhrman.....	38
Figura 9 - Resultados G6PD x Necrose.....	39
Figura 10 - Sobrevida geral de acordo com a porcentagem de células marcadas G6PD.....	40
Figura 11 - Padrão de intensidade de expressão da enzima NADK.....	41
Figura 12 - Resultados NADK x tipo histopatológico.....	42
Figura 13 - Resultados NADK x Grau de Fuhrman.....	43
Figura 14 - Correlação entre o escore numérico NADK e o escore numérico G6PD.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento TNM de acordo com AJCC.....	19
Tabela 2 - Agrupamento TNM - Classificação em quatro estadios.....	19
Tabela 3 - Graduação nuclear de Fuhrman.....	20
Tabela 4 - Associação entre porcentagem de células marcadas com G6PD e NADK e parâmetros clínicopatológicos	44

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	59
Anexo B – Protocolo de confecção do <i>tissue microarray</i>	63
Anexo C – Protocolo de Imuno-histoquímica.....	64

LISTA DE SIGLAS

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

ATP – Adenosina Trifosfato

BHD - Birt Hogg Dube

CCR – Carcinoma de Células Renais

CCRcc – Carcinoma de Células Renais tipo Células Claras

CCRcr – Carcinoma de Células Renais tipo Cromóforo

CCRp – Carcinoma de Células Renais tipo Papilífero

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EM – Enzimas Málticas

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

G6PD – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

GSH – Glutathiona

HC-UFTM - Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

HE - Hematoxilina & Eosina

ICBN - Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

IDH – Isocitrato Desidrogenase

IFN alfa – Interferon alfa

IHQ - Imuno-histoquímica

IL-2 – Interleucina 2

IMC - Índice de massa corporal

INCA – Instituto Nacional de Câncer

mTOR – *Mammalian Target of Rapamycin*

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADK – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo quinase

NADK1 – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo quinase citoplasmática

NADK2 – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo quinase mitocondrial

NADP – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (forma reduzida)

NNT - Nicotinamida Nucleotídeo transhidrogenase

PPP – Via Pentose Fosfato

TA – Temperatura ambiente

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

TKIs – *Tyrosine kinase inhibitors*

TMA - *Tissue Microarray*

TRX – Tio redoxina

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UICC – *Union for International Cancer Control*

VEGFR – *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

VHL - Von Hippel Lindau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CÂNCER RENAL	17
1.2 METABOLISMO CELULAR.....	21
1.2.1 NADPH	22
1.2.2 NADK	24
1.2.3 G6PD	25
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	27
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO	29
4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES	29
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	29
4.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS	29
4.5 REVISÃO HISTOPATOLÓGICA DOS CASOS SELECIONADOS	30
4.6 CONFECÇÃO DOS <i>TISSUE MICROARRAYS</i> (TMA)	30
4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA	33
4.7.1 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO.....	34
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5.RESULTADOS	35
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES	35
5.2 IMUNOEXPRESSÃO DE G6PD EM CCR	35
5.3 IMUNOEXPRESSÃO DE NADK EM CCR.....	40
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO	51

REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER RENAL

O câncer renal é a neoplasia urológica mais letal e corresponde a cerca de 2-3% de todos os tipos de câncer diagnosticados. De acordo com o Observatório Global do Câncer, é a 14ª neoplasia maligna mais comum em todo o mundo, o nono câncer mais comum entre os homens e o 14º entre as mulheres (SUNG, 2021). Sendo duas vezes mais frequente no sexo masculino. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021; SCELO, 2018a).

Nas últimas décadas houve aumento do número de casos em todo o mundo, supostamente devido ao uso de exames de imagem para avaliação de queixas ou sintomas abdominais, o que tem contribuído para a detecção precoce de pequenos nódulos renais antes mesmo da apresentação de sintomas (KANE, 2008).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) não dispõe de dados oficiais sobre o câncer de rim. Um cálculo aproximado, chegou à estimativa de 6.270 casos para o ano de 2018, sendo 3.760 homens e 2.510 mulheres (INSTITUTO ONCOGUIA, 2021).

O Carcinoma de Células Renais (CCR) é responsável por 90% dos casos de câncer renal, sendo o tipo de Células Claras (CCRcc) a variante histológica mais comum (65-70%), seguido pelo tipo Papilífero (RCCp), com 15-20% e o Cromóforo (CCRcr), com 5-7% (MOCH, 2016; INAMURA, 2017), Figura 1.

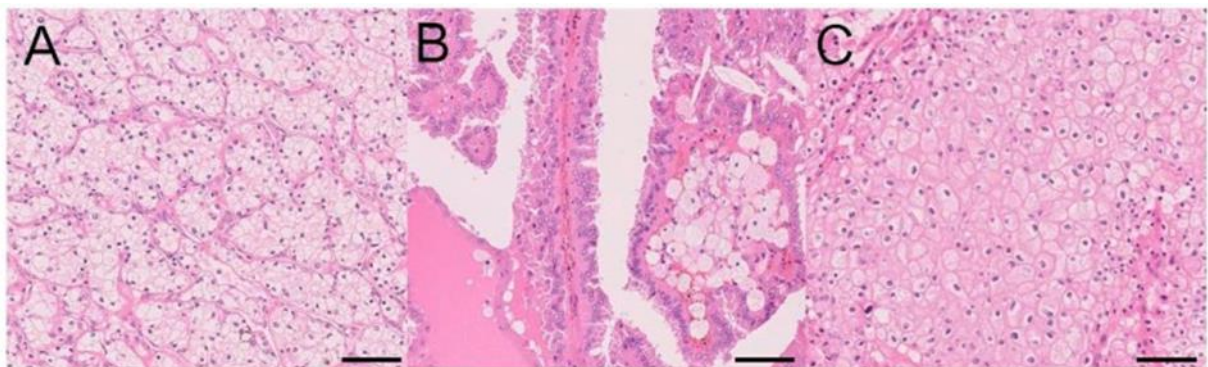


Figura 1 - Principais subtipos histológicos do carcinoma de células renais. A) Carcinoma de células claras; B) Carcinoma papilífero; C) Carcinoma cromóforo. Modificado de INAMURA, 2017.

Os principais fatores de risco para carcinoma de células renais são: tabagismo, obesidade, hipertensão arterial sistêmica, insuficiência renal crônica, diabetes mellitus e exposição ocupacional a tricloroetileno. A maioria dos casos de câncer renal são

esporádicos, apenas 3-5% são familiares. A síndrome de Von Hippel-Lindau é a síndrome genética mais frequente associada com o aumento do risco de câncer renal, sendo responsável por 1% dos carcinomas de células renais (SCELO, 2018a).

Os sinais e sintomas específicos mais descritos são hematuria, dor no flanco e massa abdominal palpável, constituindo a tríade clássica do CCR. No entanto, eles ocorrem em menos de 10% dos casos e, quando presentes, sugerem doença localmente avançada (PATARD, 2003). Nos casos de síndromes paraneoplásicas (20% dos casos) podem ocorrer as seguintes manifestações: febre, disfunção hepática, anemia, perda de peso, caquexia, hipercalcemia, eritrocitose e hipertensão arterial (SUFRIN, 1989). No entanto, mais de 50% dos casos são diagnosticados incidentalmente devido a disponibilidade de métodos de imagem não invasivos, como ultrassonografia e tomografia computadorizada, usados na investigação de outros sintomas não específicos (PANTUCK, 2000).

A *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* e a *Union for International Cancer Control (UICC)* utilizam o sistema de classificação denominado **TNM** como ferramenta para realização do estadiamento patológico das neoplasias renais com base em critérios descritos na Tabela 1. Baseado no estadiamento TNM, o câncer renal pode ser dividido em quatro estádios como descritos na Tabela 2.

Os fatores prognósticos no CCR incluem aspectos anatômicos (classificação TNM, tamanho do tumor), histológicos (grau de Fuhrman, subtipo histológico), clínicos (sintomas e status de desempenho) e moleculares (VOLPE, 2010). O estágio patológico do tumor é o fator prognóstico mais importante para o CCR, seguido pelo subtipo histopatológico, presença de características sarcomatoides, presença de necrose e grau de anaplasia celular ou grau de Fuhrman (MOCH, 2000). O CCRcc tem pior prognóstico quando comparado ao CCRp, e CCRcr no mesmo estágio tumoral (LEIBOVICH, 2010).

Tabela 1 - Estadiamento TNM

Sistema de estadiamento TNM			
Tumor Primário (T)		Linfonodos regionais (N)	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado.	Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
T0	Sem evidências de tumor.	N0	Ausência de metástase em linfonodos.
T1	≤ 7cm, limitado ao rim.	N1	Presença de metástase em linfonodos regionais.
T1a	Tumor <4 cm, limitado ao rim.	Metástase à distância (M)	
T1b	Tumor >4 cm, mas <7cm, limitado ao rim.	M0	Ausência de metástase.
T2	≥ 7cm, limitado ao rim.	M1	Presença de metástase a distância.
T2a	Tumor > 7cm, mas <10cm, limitado ao rim.		
T2b	Tumor >10 cm, limitado ao rim.		
T3	Invasão de vasos renais ou tecidos perirrenais.		
T3a	Tumor se estende para veia renal ou seus segmentos. Ou, invade sistema pélvico-alical ou gordura perirrenal e/ou seio renal, mas não além da fáscia de Gerota.		
T3b	Tumor se estende para veia cava abaixo do diafragma		
T3c	Tumor se estende para veia cava acima do diafragma ou invade parede da veia cava.		
T4	Invasão da fáscia de Gerota e adrenal.		

Fonte: AJCC, 2017

Tabela 2 - Agrupamento TNM - Classificação em quatro estádios.

Agrupamento TNM			
Estádio	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1/T2	N1	M0
	T3	N0/N1	M0
IV	T4	Qualquer	M0
	Qualquer	Qualquer	M1

Fonte: AJCC, 2017

Aliada a essas ferramentas, o grau nuclear de Fuhrman também serve para avaliar o prognóstico do câncer renal. A classificação de Fuhrman foi publicada em 1982 e desde então é amplamente utilizada. Trata-se de um sistema de quatro níveis com base no tamanho, forma nuclear e proeminência nucleolar como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Graduação nuclear de Fuhrman.

Grau de Fuhrman	Definição
G1	Núcleos pequenos, uniformes e arredondados, medindo menos de 10 µm, nucléolos ausentes ou inconspícuos.
G2	Núcleos discretamente irregulares, arredondados, medindo 15 µm, nucléolos pequenos visíveis com a objetiva de maior aumento (400x).
G3	Núcleos irregulares, arredondados a ovais, medindo 20 µm, nucléolos proeminentes visíveis com a objetiva de pequeno aumento (100x).
G4	Núcleos com pleomorfismo acentuado, bizarros e multilobados, medindo mais de 20 µm.

Fonte: Adaptado de Fuhrman, 1982

A classificação de Fuhrman passou por uma reclassificação, conhecida como grau WHO/ISUP. Esta, foi validada apenas para CCRcc e CCRp, uma vez que no CCRcr não mostrou utilidade. O grau de Fuhrman considera a proeminência nucleolar no grau 1, 2 e 3. Já no grau 4, baseia-se na presença de acentuado pleomorfismo nuclear, que pode ter presença de células tumorais gigantes ou com diferenciação sarcomatóide e/ou rabdoide (AJCC, 2017). O grau nuclear como fator prognóstico para o CCR é de extrema importância, e o trabalho original de Fuhrman relata sobrevida em 5 anos de 64% para o grau 1, 34% para o grau 2, 31% para o grau 3 e de 10% para o grau 4 (FUHRMAN, 1982)

Sobre as opções de tratamento para o câncer renal, recomenda-se que tumores localizados sejam tratados com nefrectomia radical, nefrectomia parcial, ablação térmica e/ou vigilância ativa (CAMPBELL, 2009; VOLPE, 2011). Sempre que possível, indica-se a nefrectomia parcial ou poupadora de néfrons, especialmente, em tumores menores que 7 cm e localizados em um dos polos renais. Já em pacientes estadio II e III ou, quando não é possível realizar a nefrectomia parcial, é realizada a

nefrectomia radical. A ablação térmica ou vigilância ativa é feita em pequenos nódulos (ATUALIZAÇÕES EM NEFROLOGIA, 2022).

Quanto ao câncer renal metastático, até 2005 o único tratamento aprovado era com agentes imunoestimulantes: Interleucina 2 (IL-2) e Interferon alfa (IFN alfa). Entre 2005 e 2010 surgiram os tratamentos direcionados ao *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor* (VEGFR) e à via *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Recentemente, os tratamentos imunoterapêuticos e direcionados evoluíram para inibidores do ponto de checagem imunológico, *tyrosine kinase inhibitors* (TKIs) direcionados ao VEGFR e combinações desses agentes (FITZGERALD, 2022).

1.2 METABOLISMO CELULAR

A proliferação celular descontrolada, que representa a essência da doença neoplásica envolve não apenas o controle desregulado da proliferação celular, mas também ajustes do metabolismo energético para estimular o crescimento e a divisão celular (HANAHAN, WEINBERG, 2011). Uma marca registrada (*Hallmark*) das células cancerígenas é sua capacidade de reprogramar o metabolismo para atender suas demandas biossintéticas, bioenergéticas e redox, proporcionando assim vantagem de crescimento seletivo e capacidade proliferativa sustentada (PIETROBON, 2021). A atividade metabólica na tumorigênese e na metástase aumenta os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). Manter os níveis adequados de EROs intracelular é essencial para a transdução de sinal e processos celulares (CHIARUGI, 2012; CHEN Z, 2020). No entanto, a superprodução de EROs pode induzir citotoxicidade e levar a danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) e apoptose celular (NOGUEIRA, HAY, 2013).

Para prevenir o estresse oxidativo e manter homeostase, as células tumorais ativam sistemas de defesa antioxidantes que ajusta, estrategicamente, múltiplas enzimas como catalase, glutatona redutase e moléculas antioxidantes. A síntese de moléculas antioxidantes depende da geração de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH), um cofator utilizado para manter a glutatona (GSH) e a tioredoxina (TRX) reduzidas (YING, 2008, XIAO, 2018) Figura 2.

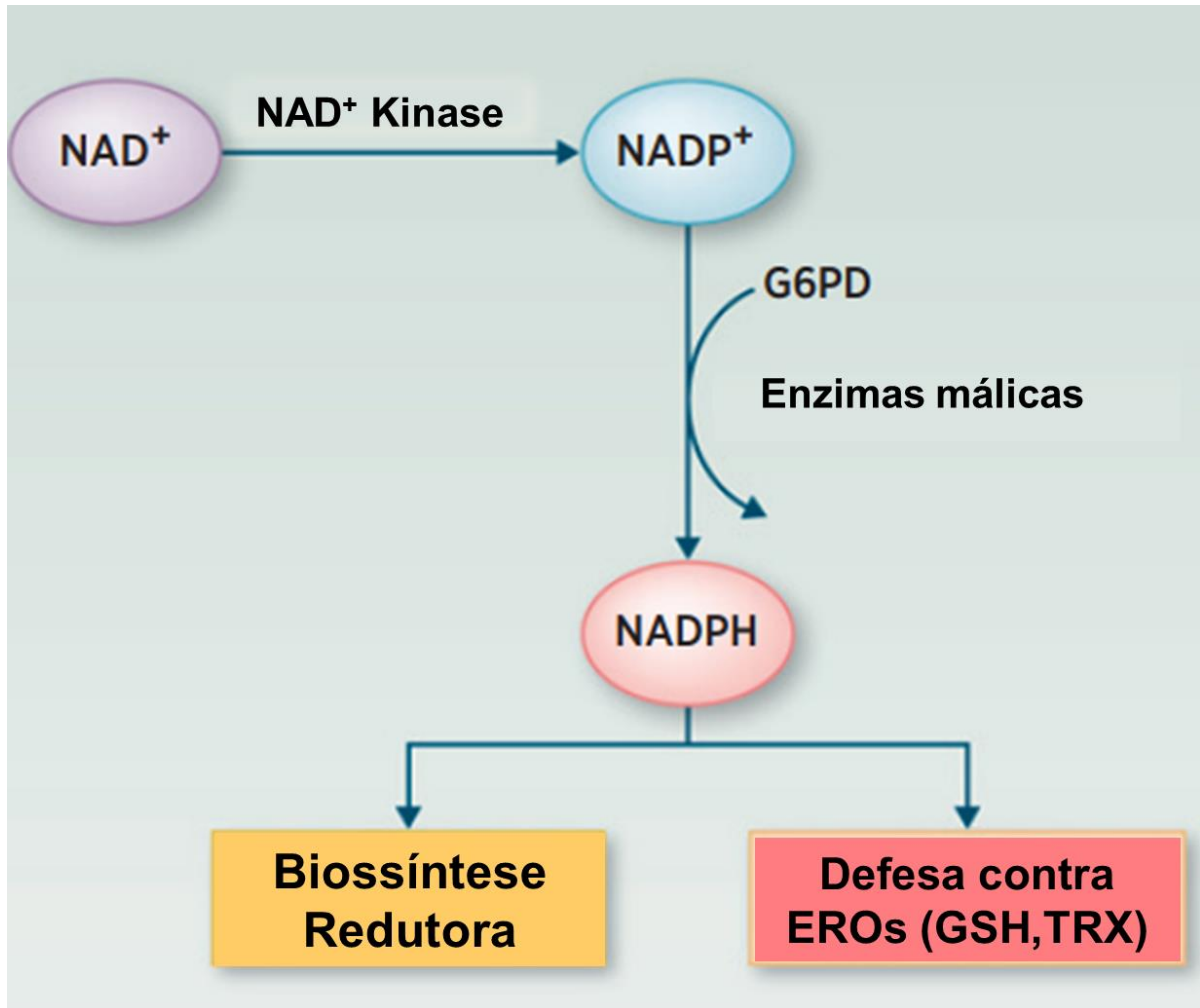


Figura 2 – Papel da NADK, G6PD e enzimas málicas na geração de NADPH. Essas enzimas são necessárias para biossíntese redutora (ácidos nucleicos, proteínas e ácidos graxos) e para proteger as células das espécies reativas de oxigênio (EROs) gerando formas reduzidas de glutathione (GSH) e tioredoxina (TRX). Modificado de TEDESCHI, 2016.

1.2.1 NADPH

A Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD) e o NADPH são cofatores utilizados para transferir e reservar o potencial de redução (TAO, 2017; CAO, 2020). Embora as estruturas estejam intimamente relacionadas, NAD(H) e NADP(H) são reconhecidas como enzimas compartimentadas únicas e exercem diferentes funções. O NAD(H) está envolvido principalmente em reações catabólicas, enquanto o NADP(H) está envolvido em efeitos antioxidantes celulares e reações anabólicas (JU, 2016; CAO, KATSYUBA, 2020). O NADPH, é a forma reduzida de NADP+ (KAWAI, MURATA, 2008), sendo considerada uma molécula não proteica associada a uma enzima com função catalítica, possui função de receptor de elétrons nas reações da via pentose fosfato e na síntese do piruvato a partir do malato, pela ação das enzimas

málicas (EM). Além disso, é uma coenzima utilizada em reações anabólicas, que necessitem do NADPH como agente redutor (SPAANS, 2015).

Estudos recentes encontraram evidências de que a regeneração e manutenção do conteúdo celular de NADPH está associada a uma variedade de condições patológicas, como diabetes, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, envelhecimento, carcinogênese e progressão tumoral (YING, 2008; XIAO, 2018; PRAMONO, 2020). De maneira geral, as células tumorais mantêm altos níveis de NADPH, tanto para fortalecer a defesa oxidação-redução, quanto para viabilizar reações biossintéticas e sustentar seu rápido crescimento. Essas evidências levaram a estudos moleculares do metabolismo do NADPH e sua exploração para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos (VANDER HEIDEN, 2009 e XIAO, 2018). Limitar o estresse oxidativo é um passo crítico para progressão tumoral, por isso, compreender as rotas de produção e consumo de NADPH é essencial para entender o metabolismo do câncer em busca de marcadores e alvos terapêuticos.

A homeostase do NADPH é regulada, principalmente, por vias metabólicas e enzimas, incluindo Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Kinase (NADK), a via pentose fosfato (PPP), metabolismo do carbono um mediado por folato, enzimas málicas (EM), nicotinamida nucleotídeo transidrogenase (NNT), isocitrato desidrogenase (IDH) NADP-dependente citosólica ou mitocondrial, o metabolismo da glutamina e a oxidação de ácidos graxos. No entanto, ainda não se tem total compreensão da contribuição dessas vias para a progressão do câncer (FAN, 2014 e LIU, 2016).

1.2.2 NADK (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Kinase)

Dentre as diferentes enzimas relacionada com a produção de NADPH, a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Kinase (NADK) catalisa a fosforilação NAD⁺ em NADP⁺, usando Adenosina Trifosfato (ATP) como doador de fosfato, Figura 2. Ela foi descoberta por Arthur Kornberg em 1950, isolando-a de *Saccharomyces cerevisiae* (KORNBERG, 1950). A NADKc citoplasmática (NADK1) humana é possui estrutura de dímero com tamanho de 50 kDa. Ao contrário das NADKs em procarióticos, o NADK1 humano é incapaz de usar fosfato inorgânico; em vez disso, a fosforilação de NAD para NADP requer ATP e íon magnésio como cofator (LERNER, 2001). Embora a estrutura e a função do NADKc humano sejam conhecidas há mais de uma década, a NADK mitocondrial (NADK2) foi descoberta recentemente e pode desempenhar um

papel predominante no controle das EROs geradas na mitocôndria (OHASHI, 2012; ZHANG, 2015).

Evidências recentes mostram o aumento da expressão de NADK como uma adaptação metabólica essencial no câncer. Schild, T. e colaboradores, em 2021, demonstraram que o oncogene KRAS promove hiperativação de NADK mantendo, assim, os níveis de NADP⁺ e NADPH nas células de adenocarcinoma pancreático ductal. Mostrando que a atividade aumentada de NADK é uma importante adaptação impulsionada pela sinalização oncogênica (SCHILD, 2021). Durante a cascata metastática, os níveis de NADK aumentam nas células de câncer de mama, levando à expansão de seus *pools* de NADP(H), que alimentam reações anabólicas e sistemas antioxidantes para permitir que as metástases surjam e prosperem (ILTER, 2023). Zeng e colaboradores demonstraram que a expressão de NADK está associada com metástase linfonodal, estágio tumoral mais avançados e menor sobrevida em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células (ZENG, 2023). Um estudo recente observou maior expressão de NADK em amostras de adenocarcinoma de pulmão em comparação com tecidos adjacentes não cancerosos, sendo a alta expressão indicativa de pior prognóstico. A inibição de NADK diminuiu os níveis de NADP(H) e inibiu a proliferação células tumorais *in vivo* e *in vitro*. Os autores concluíram que esses achados fornecem evidências para que a NADK seja um alvo potencial para o tratamento clínico do adenocarcinoma de pulmão (MENG, 2024).

1.2.3 G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase)

Na década de 1930, Warburg descobriu que, além da cascata glicolítica, a glicose-6-fosfato (G6P) poderia ser metabolizado por outra via oxidativa, a qual utiliza o NADP. Somente na década de 1950, entretanto, toda a via pentose fosfato foi elucidada por Frank Dickens, Bernard Horecker, Fritz Lipmann e Efraim Racker. Em 1956, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) humana foi descoberta pela primeira vez por Carson et al. Trata-se da primeira enzima da via da pentose fosfato, o produto do gene *G6PD* é uma proteína de 59 kDa com 514 aminoácidos, que é expressa em todas as células. Sua principal função é produzir ribose e NADPH (COHEN, 1969; SONG, 2022) Figura 3.

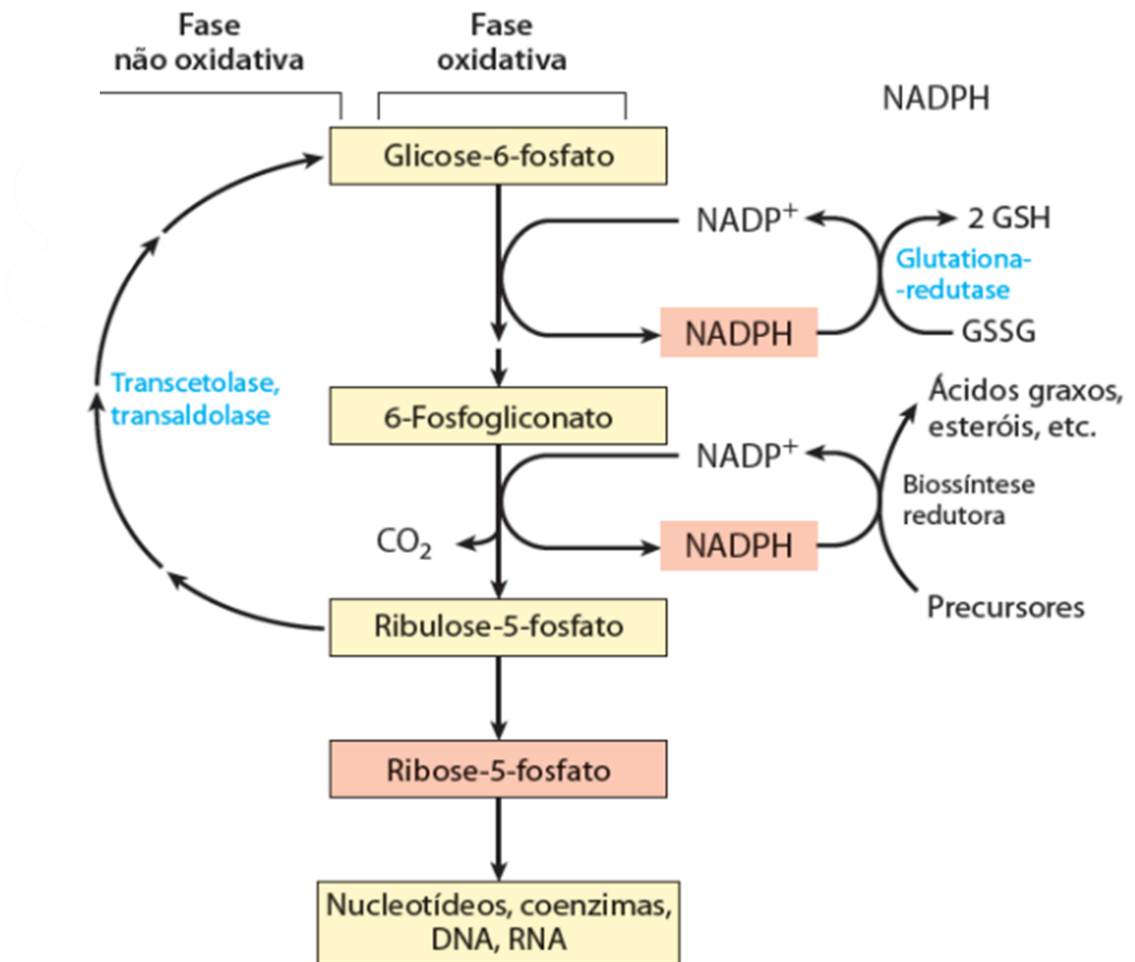


Figura 3 – Via das pentoses- fosfato. Modificado de NELSON, 2019.

Nas células normais, a expressão de G6PD é rigorosamente controlada. Entretanto, em muitos tumores, a regulação da sua expressão está alterada, resultando em aumento significativo na sua atividade. A superexpressão de G6PD ajuda as células cancerosas em seu crescimento, proliferação, metástase e invasão (CHAN, 2013; LU, 2018; NAGASHIO, 2019). Neste contexto, Kuo e colaboradores investigaram o papel da G6PD na tumorigênese e demonstraram que essa enzima está envolvida na regulação do crescimento celular e na própria tumorigênese. A superexpressão da G6PD em células NIH 3T3 não só alterou a morfologia celular, mas também deu origem a um rápido crescimento de grandes fibrossarcomas em camundongos (KUO, 2000).

Evidências acumuladas revelam que níveis elevados de expressão de G6PD foram encontradas em uma série de cânceres humanos, incluindo câncer de ovário (YI, 2015), mama (PU, 2015), cervical (HU, 2015), prostático (TSOUKO, 2014) e

câncer de bexiga (WANG, 2015). Além disso, sua superexpressão está intimamente relacionada com a progressão do câncer gástrico (WANG, 2012) e carcinoma de mama (PU, 2015), podendo ser considerado um preditor independente de mau prognóstico para esses cânceres. Além disso, evidências indicam que a inibição da expressão da G6PD tem mostrado efeitos positivos na inibição do câncer, com diminuição da proliferação e aumento da apoptose em células de melanoma (LI, 2009; CAI, 2015; HE, 2018) e até revertendo a resistência a quimioterapia. A via pentose fosfato hiperestimulada aumenta a produção de NADPH tornando sistema redox intracelular mais efetivo, o que torna as células tumorais mais resistentes ao estresse oxidativo induzido por drogas quimioterápicas (POLIMENI, 2011; FENG, 2020; YAMAWAKI, 2021).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O carcinoma de células renais está entre os 15 tipos de câncer mais comuns no mundo, sendo o mais letal dentre os tumores urológicos. Nas últimas décadas, houve aumento significativo da sua incidência. É um tumor heterogêneo, que possui alterações em vias bioenergéticas (metabolismo celular), classificação histológica falha e evolução incerta nos casos metastáticos.

O prognóstico do CCR se baseia, classicamente, no estadiamento e nos aspectos histopatológicos. A doença metastática se desenvolve em um terço dos pacientes após a cirurgia, mesmo em tumores localizados. Existem poucas opções de tratamento para esses pacientes, principalmente, em países cujo acesso às terapias-alvo e imunoterapias é limitado.

Dados preliminares, de análises *in silico*, evidenciaram associações significantes da alta expressão gênica de *G6PD* e *NADK* com menor sobrevida global, maior estadiamento tumoral e presença de metástase em uma grande coorte de carcinoma de células renais tipo células claras e papilífero.

Desta forma, ambas as enzimas parecem ser potenciais marcadores para compreensão da progressão do CCR, o que pode contribuir para o desenvolvimento de terapias.

Assim, a **hipótese** deste estudo é de que o perfil de expressão proteico de *G6PD* e *NADK*, avaliado por imuno-histoquímica (IHQ), está relacionado com parâmetros de progressão e pior prognóstico do CCR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o padrão de imunexpressão das enzimas G6PD e NADK e associá-lo com fatores prognósticos e de agressividade tumoral, em uma coorte de carcinoma de células renais do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigar a expressão proteica das enzimas G6PD e NADK em amostras de carcinoma de células renais;
- b) Associar os níveis de expressão com características clínicas e patológicas relacionadas com o prognóstico da doença;
- c) Correlacionar a imunexpressão das duas enzimas.

4 METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM parecer nº: 4.981.821 de 17 de setembro de 2021 (Anexo A).

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO

O projeto foi desenvolvido no setor de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas e Naturais (ICBN) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, que possui instalações e infraestrutura física para realização e análises dos resultados da técnica de imuno-histoquímica.

4.2 SELEÇÃO DE PACIENTES

Foi realizado, inicialmente, um levantamento do número de casos de pacientes adultos com câncer renal diagnosticados no HC-UFTM entre os anos 2000 e 2021. O estudo utilizou amostras disponíveis na Unidade Patologia Cirúrgica do HC-UFTM. Todo material biológico utilizado já havia sido preparado, previamente, na rotina diagnóstica da Unidade de Patologia, dispensando a necessidade de novas coletas ou processamento das amostras. Um total de 131 pacientes com CCR foram incluídos neste estudo.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo: pacientes adultos diagnosticados com carcinoma de células renais no HC-UFTM; pacientes que passaram por ressecção cirúrgica ou biópsia renais para realização do diagnóstico; casos com tecido adequado para reavaliação das lâminas e com dados clínicos disponíveis.

Foram excluídos do estudo: neoplasias que não se tratavam de carcinoma de células renais, tumores que não eram primários do rim (casos de metástases); casos cujo material apresentava muita necrose ou hemorragia, inviável para análise imuno-histoquímica.

4.4 COLETA DE DADOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Foram coletas as seguintes informações disponíveis nos prontuários do HC-UFTM: idade, sexo, cor/raça, cidade de origem, presença de comorbidades ou de

outra doença renal ou de doenças prévias, hipertensão, diabetes, obesidade pelo Índice de massa corporal (IMC), tabagismo/etilismo, sintomas, histórico familiar de câncer, data do diagnóstico do câncer renal, data da última consulta e óbito. Dos laudos histopatológicos foram coletadas as seguintes informações: tipo de cirurgia/tratamento, tamanho/estágio/classificação/tipo histológico do câncer, grau de Fuhrman, presença de necrose, invasão angiolímfática, presença de metástase e/ou recidiva tumoral.

4.5 REVISÃO HISTOPATOLÓGICA DOS CASOS SELECIONADOS

Foi realizada revisão dos laudos histopatológicos e confirmação do diagnóstico, por meio de revisão das lâminas coradas por Hematoxilina & Eosina (HE) disponíveis na Unidade de Patologia Cirúrgica do HC-UFTM. A reavaliação foi conduzida por um patologista experiente, que também revisou a classificação TNM e grau de Fuhrman de cada caso. Áreas que apresentavam grande quantidade de células tumorais foram demarcadas na lâmina com caneta de tinta permanente para posterior coleta e confecção do *Tissue Microarray* (TMA). Em seguida, foi realizada a seleção dos blocos de parafina com material biológico suficiente para realização da imuno-histoquímica.

4.6 CONFECÇÃO DOS *TISSUE MICROARRAYS* (TMAs)

Para preparação da lâmina na qual foi realizada a imuno-histoquímica, utilizamos a técnica de TMA. O TMA permite o alinhamento de vários núcleos/fragmentos de tecidos de diferentes blocos de parafina em apenas um novo bloco de parafina. Essa técnica é amplamente utilizada para análise de grandes amostras que dispõem de biomarcadores com fins diagnósticos, preditivos ou prognósticos. Seu uso apresenta melhor custo-benefício e menor prazo de execução, pois permite analisar em uma mesma lâmina vários casos, o que resulta em menor quantidade de reagentes utilizada e menor quantidade de dias necessários para realização da imuno-histoquímica, Figura 4.

O método manual de confecção do TMA foi realizado de acordo com estudos descritos na literatura, com algumas modificações (CHEN Y, 2020; KIM, 2013; PIRES; ANDREIUOLO; DE SOUZA, 2006). Foram utilizados 262 blocos doadores e cada bloco receptor possuía 20 pinos (tecidos coletados) com 3mm de diâmetro e 2mm de espaçamento entre estes. Para cada paciente incluído no estudo, foram coletados dois fragmentos de diferentes blocos de parafina, a partir das áreas demarcadas na

etapa de revisão das lâminas. Foram coletados também, 20 pinos de tecido não tumoral adjacente para confecção de bloco de TMA para ser analisado separadamente. A coleta do tecido foi feita com um *punch* de biópsia visando obter os fragmentos com 3 mm de diâmetro de cada área selecionada nos blocos.

Um mapa de localização, composto por letras e números definiu a posição de cada amostra no bloco de TMA. Baseado no mapa de localização, foi desenvolvido um molde no programa *Coreldraw* para auxiliar na montagem do TMA. Em cada bloco receptor, a primeira posição foi ocupada com um fragmento de fígado normal para orientação da posição do bloco (Anexo B).

Após a confecção dos blocos de TMAs, foram confeccionadas lâminas com cortes histológicos de 3 μ m de espessura. As lâminas passaram por banho de parafina e foram acondicionadas em congelador -20°C até o momento da realização da imunohistoquímica.

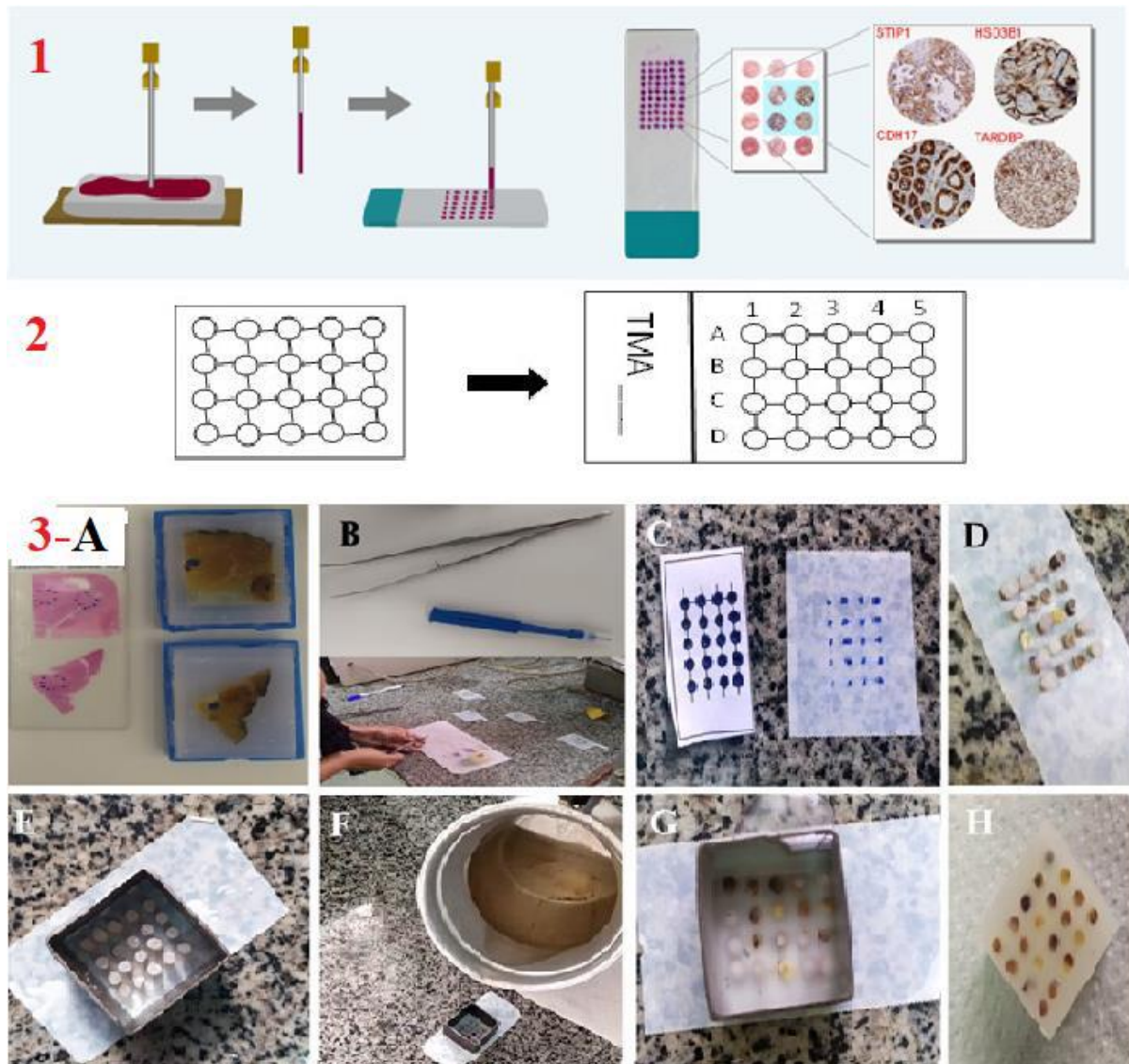


Figura 4 - Técnica de *Tissue microarray* (TMA). 1) Demonstração da funcionalidade do TMA. Para realização desta técnica necessita-se de diferentes blocos doadores de onde serão coletadas as áreas de interesse e inoculadas em um novo bloco denominado receptor. O bloco receptor passa a apresentar várias amostras o que permite a análise de vários casos em uma mesma lâmina. Imagem disponível em <http://www.abnova.com/products/Antibody-for-Tissue-Microarray-M0000.html>. 2) Representação do molde desenvolvido no *Coreldraw* para padronização da localização dos pinos do TMA. Dimensões utilizadas: pinos de 3mm e espaçamento entre estes de 2mm. 3) Etapas da confecção dos TMAs. 3A) Blocos doadores com suas respectivas lâminas com demarcação das áreas de tumores para coleta. 3B) Coleta dos pinos onde é utilizado extrator do tipo *punch* e pinça para colocar esses pinos em seu correto local no molde. 3C) Molde utilizado e demarcação deste em fita de dupla face sobre a bancada. 3D) Pinos colocados em seus locais corretos. 3E-G) Confecção do bloco com inclusão dos pinos em parafina líquida 3H) Bloco de TMA finalizado.

4.7 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de IHQ foi utilizada para avaliar a expressão proteica das enzimas G6PD e NADK. As amostras-controle positivas da reação foram selecionadas de acordo com recomendações do fabricante do anticorpo, sendo para o anti-G6PD utilizado tecido de testículo humano e para a anti-NADK, tecido de rim humano. Como controle negativo da reação, foi realizada a substituição do anticorpo primário por solução de albumina bovina a 4%.

O material foi desparafinado em xilol por 30 minutos, hidratado em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80%, 70%) e em água corrente e foi submetido à recuperação antigênica por meio de calor úmido e pressão na panela “Pascal” (Dako) utilizando o tampão citrato (pH = 6,0) por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram submetidas a seis lavagens com água destilada e uma lavagem de 5 minutos cada com tampão PBS. Após essa etapa, foi realizado bloqueio da atividade da peroxidase endógena aplicando uma gota de bloqueador de peroxidase (Peroxidase block, Kit EasyLink One System, EasyPath diagnósticos) em cuba escura e úmida em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas duas lavagens de 5 minutos cada com PBS. Para bloqueios de proteínas inespecíficas, utilizou-se uma gota de bloqueador de proteínas (Protein block, Kit EasyLink One System, EasyPath diagnósticos) em cuba escura e úmida por 25 minutos em temperatura ambiente. Depois desse tempo, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-G6PD monoclonal de rato (sc-373886, diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) ou anti-NADK policlonal de coelho (FNab05536, diluição 1:100, FineTest) em cuba escura e úmida *overnight* a 4°C. As lâminas foram então lavadas três vezes por 5 minutos cada com PBS 1x e incubadas com polímero de uma única etapa (Polymer EasyLink One, Kit EasyLink One System, EasyPath diagnósticos) por 60 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foram submetidas a duas lavagens de 5 minutos cada com PBS 1x e reveladas com cromógeno diaminobenzidina (DAKO) por cinco minutos. Foi realizada contra-coloração com hematoxilina por 30 segundos, seguida por lavagem em água corrente por dois minutos. As lâminas foram desidratadas em uma sequência de álcoois absolutos, diafanizadas em xilol e montadas com meio de montagem permanente e lamínula. Protocolo descrito no anexo C.

4.7.1 Análise da imunomarcção

A imunomarcção foi analisada pelo método semi-quantitativo, de acordo com a intensidade e a quantidade de células marcadas, como descrito no estudo de ZHANG e colaboradores em 2017. As lâminas foram avaliadas às cegas por dois observadores de maneira independente. Quando necessário, um terceiro observador foi incluído.

Para análise da intensidade, os casos foram classificados e pontuados da seguinte maneira: 0=negativo; 1=fraco; 2=moderado; 3=forte. Para quantidade de células marcadas, foi utilizada a seguinte pontuação: 0=negativo; 1=até 25%; 2= 26% a 50%; 3 = 51% a 75%; 4 >75%. O escore final de expressão foi dado como: intensidade x porcentagem de células marcadas. Foram considerados casos de baixa expressão quando o resultado final do escore foi ≤ 4 e alta expressão quando o escore foi > 4 .

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas nos softwares IBM®SPSS®v.20 e GraphPad Prism v.7.0. Foi adotado para significância estatística valor $\alpha = 0,05$. Foram realizadas análises de frequência contendo média, mediana e desvio padrão. A associação da expressão proteica com os dados categóricos clínicos/patológicos foi realizada pelo teste qui-quadrado. Associações do escore de expressão proteica com dados clínicos/patológicos foram realizadas por testes não-paramétricos (Mann-Whitney/Kruskal-Wallis). Análises de sobrevida foram realizadas por meio de curvas de Kaplan-Meier e pelo teste de log-rank.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS PACIENTES

Foram incluídos na pesquisa 131 indivíduos com diagnóstico de carcinoma de células renais (Tabela 4). A maioria era do sexo masculino 88 (67,2%), com idade média de $60,47 \pm 11,75$ anos e mediana de 62 anos, sendo a raça predominante branca 90 (68,7%). A maioria 86 (65,6%) apresentava alguma comorbidade associada (Hipertensão, doença renal crônica, *Diabetes mellitus*), 69 participantes (52,7%) tabagistas e/ou etilistas e 51 (38,9%) eram obesos / com sobrepeso. Apesar de apenas 26 indivíduos (19,8%) apresentarem um ou mais sintomas da tríade clássica do carcinoma renal (hematúria, dor lombar e massa palpável), a presença de sintomas teve associação significativa com menor sobrevida ($p=0,005$). Quanto ao histórico familiar de câncer, 16 (12,3%) participantes tinham histórico positivo, sendo 12 (9,2%) com parentes de primeiro grau e quatro (3,1%) com parentes de segundo grau.

Em relação ao tratamento, 101 (77,1%) casos foram submetidos à nefrectomia radical e 28 (21,4%) à nefrectomia parcial. O rim direito foi o mais acometido, com 69 casos (52,7%). Houve apenas um participante (0,8%) com tumor bilateral. Quanto ao subtipo de carcinoma células renais, a maioria era do tipo células claras 102 (77,9%), seguido do papilar 23 (17,6%) e seis (4,6%) cromófbos. A maioria dos tumores era estágios T1 ou T2 (69,5%; $n=91$) Fuhrman de baixo grau 1 e 2 (60,3%; $n=79$) e com presença de necrose tumoral (55,7%; $n=73$). Invasão angiolinfática foi observada em 20 (15,3%) casos, linfonodos positivos em apenas seis (4,6%) casos, e metástase foi diagnosticada em 12 (9,2%) pacientes. Na análise de sobrevida geral, pacientes com tumores classificados como Fuhrman 3 ou 4, com necrose tumoral e invasão angiolinfática tiveram menor sobrevida ($p=0,001$; $p=0,018$ e $p<0,0001$ respectivamente). Quanto ao acompanhamento clínico, sete (5,3%) pacientes apresentaram recidiva tumoral com uma média de $32,71 \pm 26,76$ meses até a recidiva, enquanto 18 (13,7%) foram a óbito.

5.2 IMUNOEXPRESSÃO DE G6PD EM CCR

A imunopressão de G6PD foi avaliada em 121 casos de CCR. A maioria 97 (80,2%) foi negativa, 14 (11,6%) foram classificados como imunopressão fraca, três

(2,5%) como moderada e sete (5,8%) como forte, Figura 5. Sendo também classificados categoricamente em imunomarcção negativa/fraca: 111 (91,7%) casos e, moderada/forte: 10 (8,3%) casos. A análise imuno-histoquímica do bloco de TMA de tecido não tumoral adjacente foi negativa.

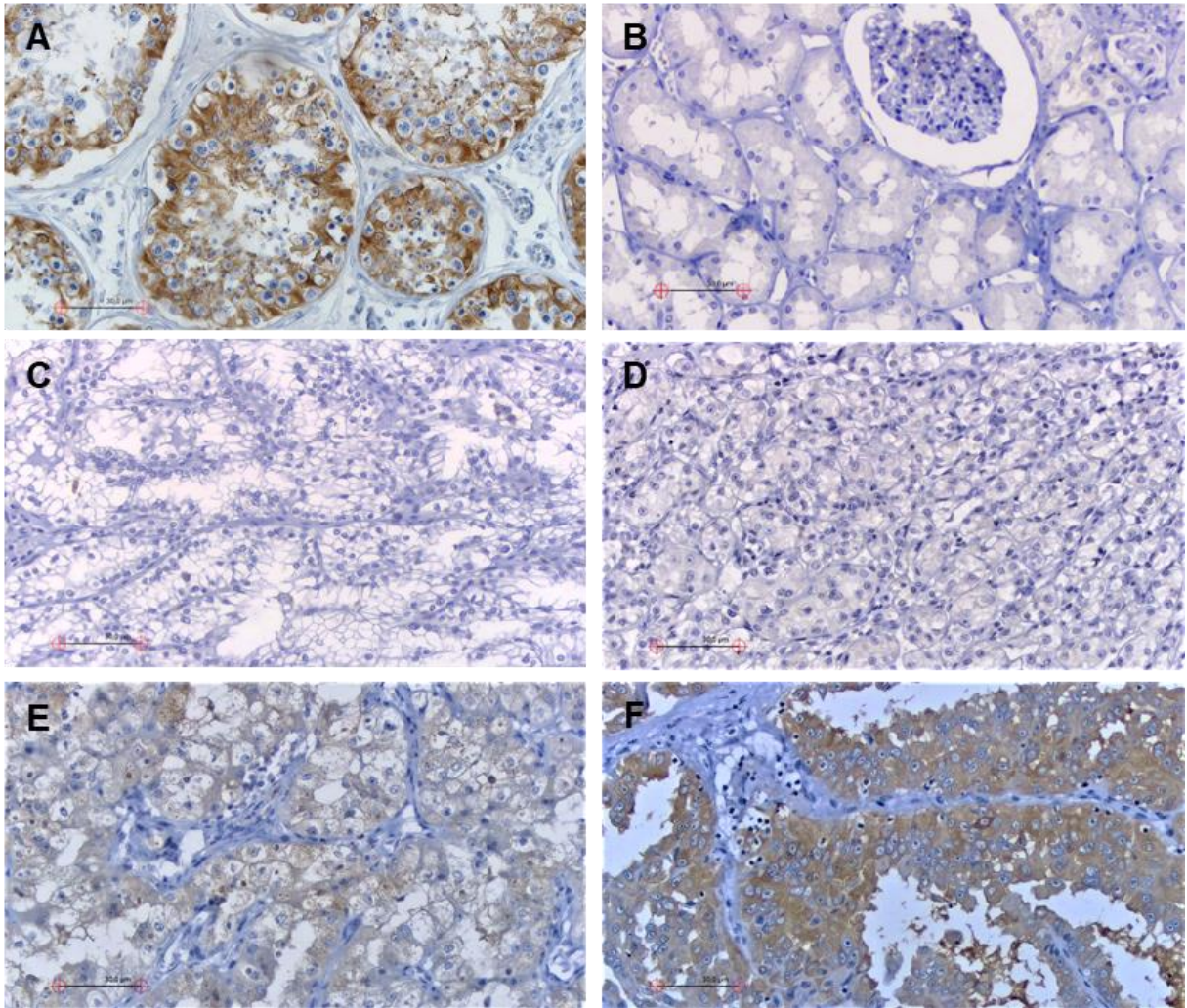


Figura 5 – Padrão de intensidade da expressão imuno-histoquímica da enzima G6PD, objetiva de 20x. A) Controle positivo testículo humano B) Tecido renal não tumoral adjacente C) Expressão negativa em CCR. D) Expressão fraca em CCR. E) Expressão moderada em CCR. F) Expressão forte em CCR.

Na avaliação da porcentagem de células marcadas, dos 24 casos positivos, foram observados seis casos (5%) em cada um dos subgrupos: <25%, 25-50%, 51-75% e >75%. Categoricamente, 109 (90,1%) casos foram classificados com porcentagem zero até 50%, enquanto 12 (9,9%) casos apresentavam >50% das células positivas.

A partir dos resultados de intensidade e porcentagem, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com o escore final: 114 (94,2%) casos de baixa expressão (escore ≤ 4) e sete (5,8%) casos de alta expressão (escore > 4).

Observamos que os CCRcc apresentaram maior proporção de casos expressando $\leq 50\%$ de células marcadas em comparação com o CCRp e o CCRcr ($p=0,001$), Tabela 4, Figura 6A. Ao compararmos o escore da expressão de G6PD entre os subtipos histológicos, confirmou-se que os subtipos CCRp e CCRcr apresentaram maiores escores, sendo a diferença entre papilífero e células claras significativa ($p<0,0001$), Figura 6B. Referente ao escore categórico de G6PD (alta expressão > 4 x baixa expressão ≤ 4), houve predominância significativa de alta expressão no subtipo CCRp 4/22 (18,2%), comparado à CCRcc (3/93; 3,2%) e CCRcr, que não apresentou nenhum caso de alta expressão (0/6; 0%), ($p=0,021$).

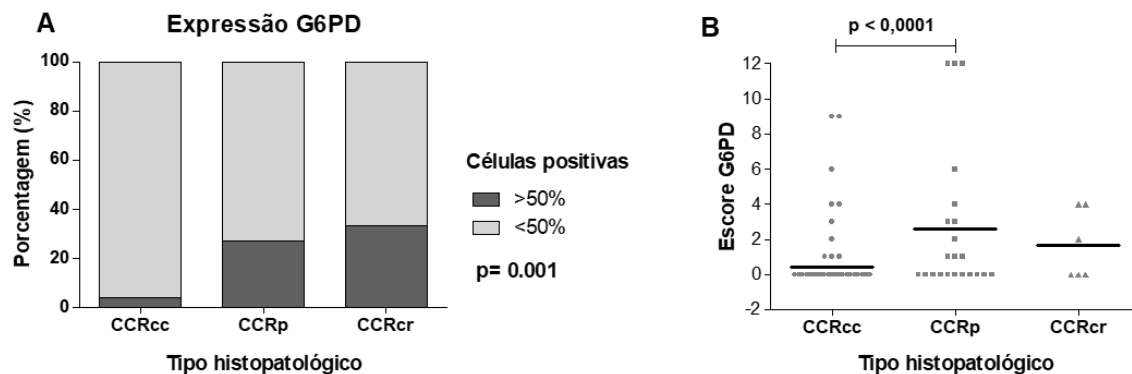


Figura 6 – Resultados G6PD x tipo histopatológico. A) Porcentagem de células marcadas G6PD nos três principais tipos histopatológicos. B) Escore numérico G6PD nos três principais tipos histopatológicos.

Observamos associação entre o tamanho do tumor e a porcentagem de células marcadas, havendo maior quantidade de células positivas em tumores mais extensos ($p=0,01$; *Odds Ratio* 6,7; IC 95% 1,41-32,24), Tabela 4, Figura 7A. Quando avaliamos somente o subtipo células claras, o escore de expressão elevado também mostrou associação significativa com tumores maiores (Teste de Mann-Whitney, $p=0,03$), Figura 7B.

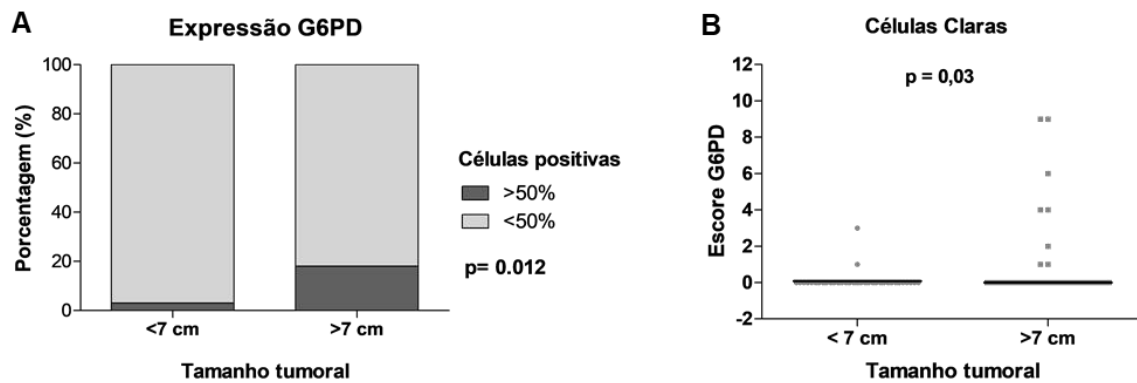


Figura 7 – Resultados G6PD x Tamanho tumoral. A) Porcentagem de células marcadas G6PD nos tumores < 7 cm e > 7 cm. B) Escore numérico G6PD nos tumores < 7 cm e > 7 cm nos CCRcc.

Padrão semelhante foi observado ao compararmos a porcentagem de células imunomarcadas com G6PD e grau categórico de Fuhrman (1/2 *versus* 3/4), com uma chance 5 vezes maior dos graus elevados de Fuhrman apresentarem mais células imunomarcadas ($p=0,012$; *Odds Ratio* 5,4; IC 95% 1,38-21,06), Tabela 4, Figura 8A. Escore elevado de G6PD, também foi associado a Fuhrman 3 e 4 (Teste de Mann-Whitney, $p=0,008$) Figura 8B. O mesmo ocorreu quando avaliamos somente o subtipo células claras (Teste de Mann-Whitney, $p=0,03$).

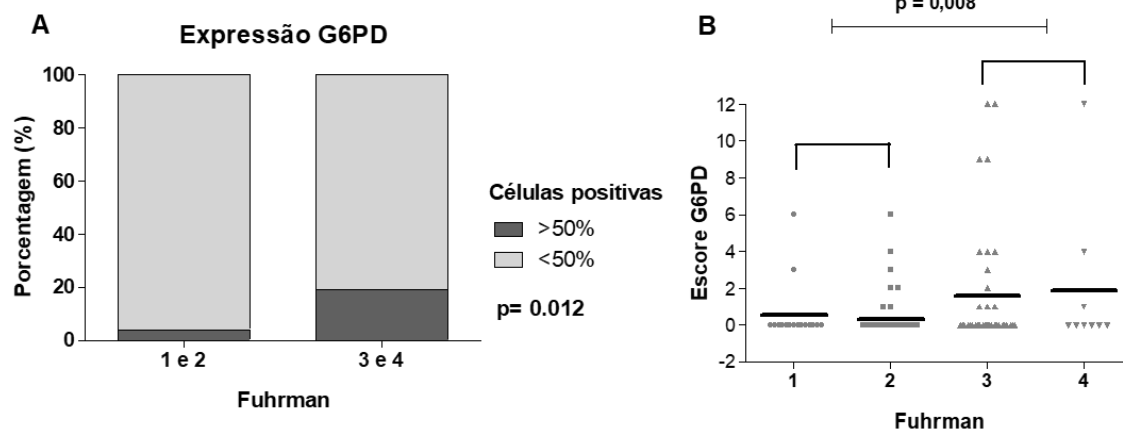


Figura 8 – Resultados G6PD x Grau de Fuhrman. A) Porcentagem de células marcadas G6PD nos graus 1 e 2 x 3 e 4. B) Escore numérico G6PD nos graus 1 e 2 x 3 e 4.

Observou-se ainda, tendência de tumores com necrose apresentarem maior porcentagem de células G6PD positivas, apesar da associação não ter sido significativa ($p=0,067$; *Odds Ratio* 4,2; IC 95% 0,89-20,25), Tabela 4, Figura 9A. O que também foi observado na avaliação do escore de expressão de G6PD ($p=0,06$),

Figura 9B. Porém, quando avaliamos somente o subtipo células claras, escores maiores tiveram associação significativa com necrose tumoral (Teste de Mann-Whitney, $p=0,02$), Figura 9C.

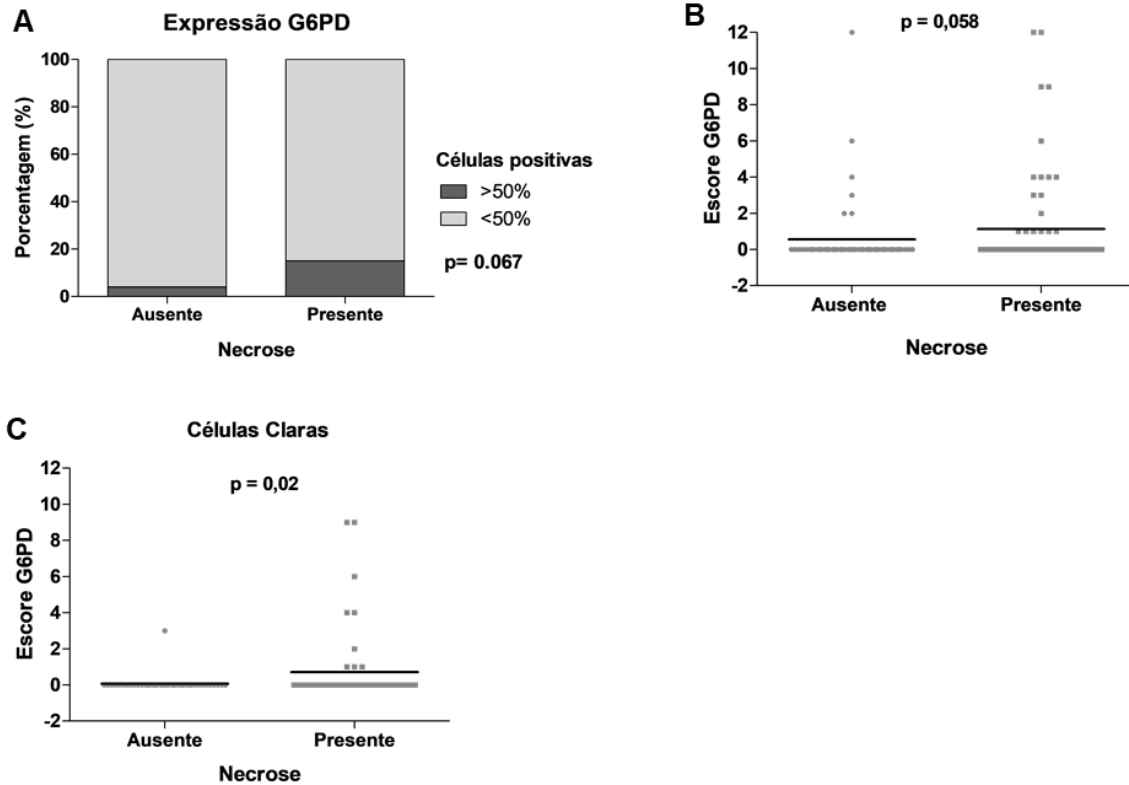


Figura 9 – Resultados G6PD x Necrose. A) Porcentagem de células marcadas G6PD na presença e ausência de necrose. B) Escore numérico G6PD na presença e ausência de necrose. C) Escore numérico G6PD na presença e ausência de necrose nos CCRcc.

Dos 111 pacientes com dados de sobrevida disponíveis, 13 foram a óbito. Apesar da diferença não ter sido significativa, os casos que apresentaram mais de 50% de células imunomarcadas tiveram menor estimativa de sobrevida geral ($67,3\% \pm 16\%$), quando comparados aos casos com menos de 50% das células positivas ($81,1\% \pm 5,6\%$), Figura 10.

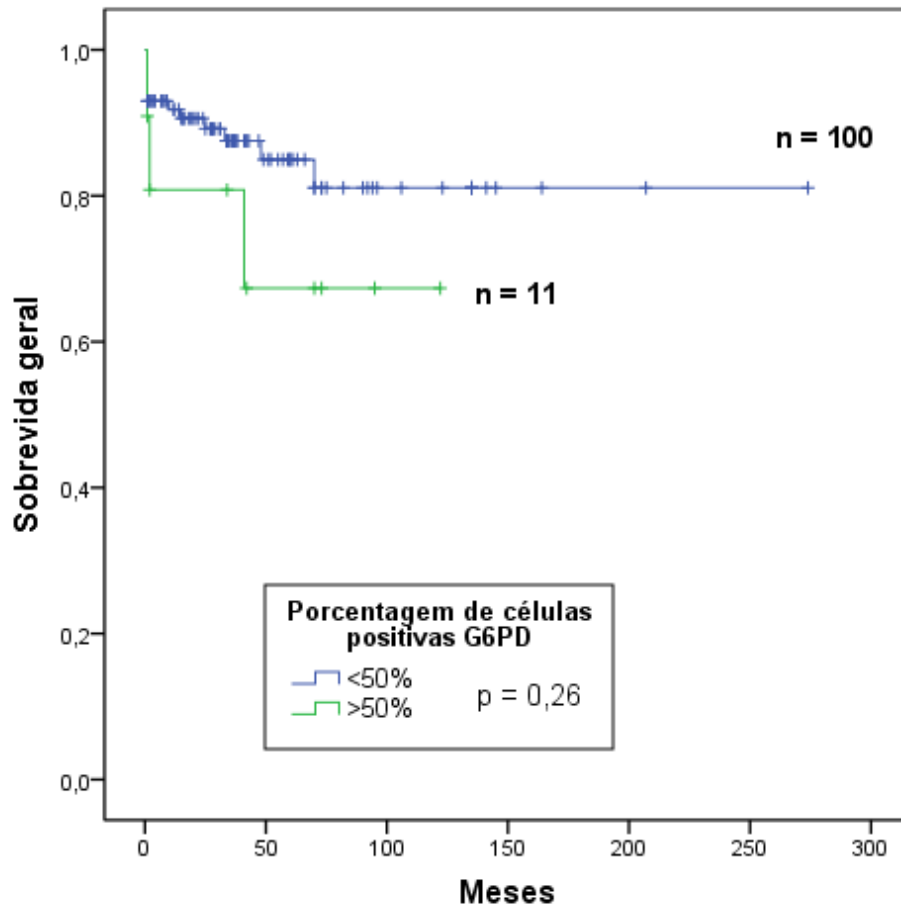


Figura 10 – Sobrevivida geral de acordo com a porcentagem de células marcadas G6PD.

5.3 IMUNOEXPRESSÃO DE NADK EM CCR

A imunopressão de NADK foi avaliada em 120 casos de CCR. Quanto a intensidade, ela foi negativa em quatro (3,3%) casos, fraca em 41 (34,2%), moderada em 34 (28,3%) e forte em 41 (34,2%), Figura 11. Sendo também classificados categoricamente em grupos: negativa/fraca 45 (37,5%) casos e moderada/forte 75 (62,5%) casos. No tecido renal não neoplásico adjacente, houve marcação positiva com intensidade variável de fraca até forte, principalmente, em citoplasma e membrana celulares. Observaram-se que alguns túbulos renais possuem marcação mais intensa.

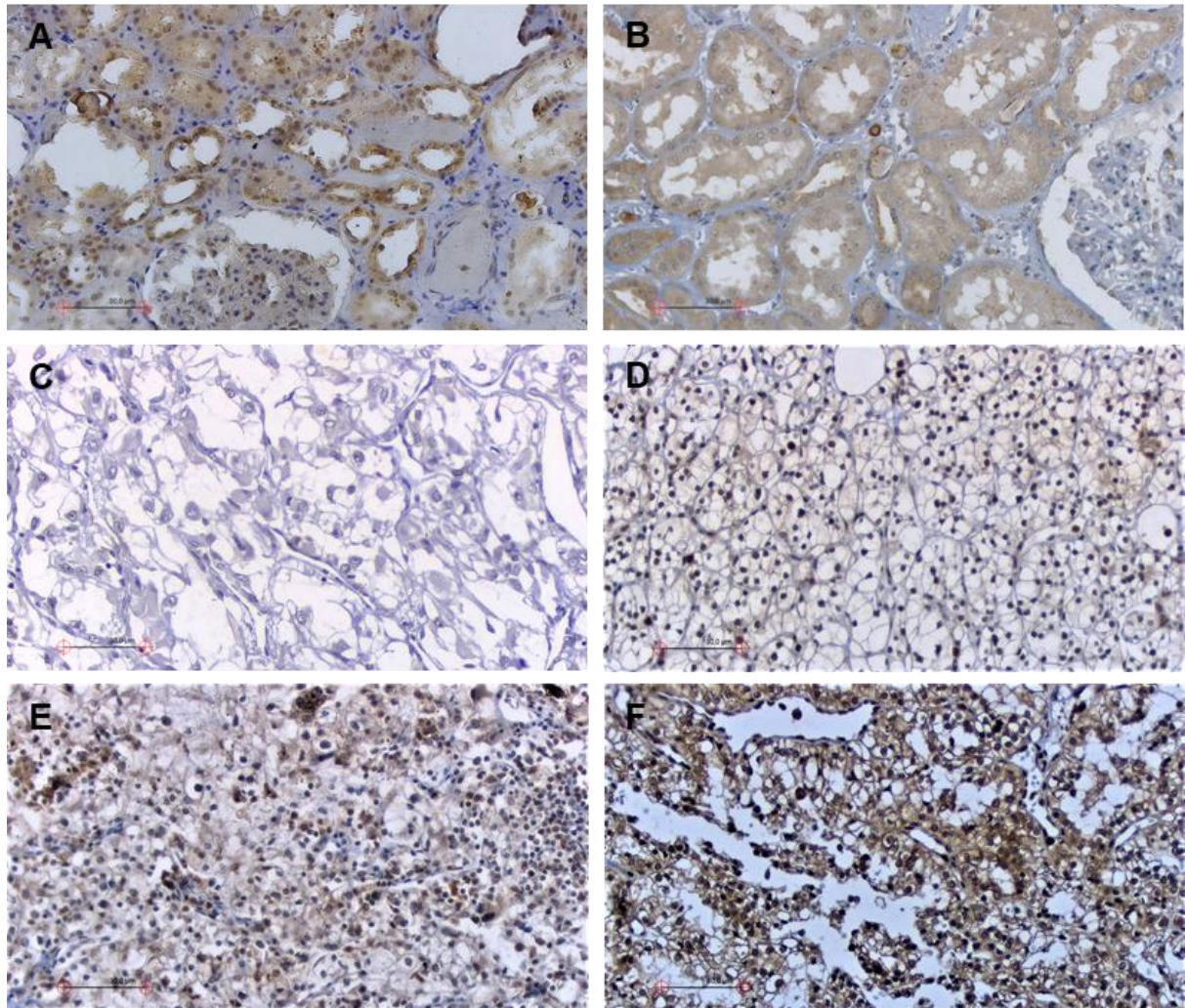


Figura 11 – Padrão de intensidade da expressão imuno-histoquímica da enzima NADK, objetiva de 20x. A) Controle positivo rim humano B) Tecido renal não tumoral adjacente C) Expressão negativa em CCR. D) Expressão fraca em CCR. E) Expressão moderada em CCR. F) Expressão forte em CCR.

Na avaliação da porcentagem de células imunomarcadas, quatro (3,3%) casos foram negativos, 10 (8,3%) marcaram <25%, 8 (6,7%) marcaram de 25%-50%, 20 (16,7%) marcaram 51%-75% e 78 (65%) marcaram >75%. Sendo também classificados categoricamente em grupos: 0%-50%, 22 (18,3%) casos e, >50%: 98 (81,7%) casos. A partir dos resultados de intensidade e porcentagem, calculou-se o escore de expressão e os pacientes foram divididos em: 45 (37,5%) casos de baixa expressão (escore ≤ 4) e 75 (62,5%) casos de alta expressão (escore > 4).

Quanto ao tipo histológico e a porcentagem de células imunomarcadas, todos os tumores papilíferos (n=21) e todos os cromofobos (n=6) apresentaram mais de 50% das células positivas, o que não foi observado para o CCRcc (p=0,02), Tabela 4, Figura 12A. Ao avaliarmos o escore de expressão de NADK (baixa expressão ≤ 4 x alta expressão > 4) de acordo com os subtipos histológicos, novamente o CCRp e

CCRcr apresentaram maior proporção de casos com alta expressão ($p=0,04$). Além disso, o grupo de CCRp apresentou escores, significativamente, maiores do que o grupo células claras ($p=0,001$), Figura 12B. Interessante ressaltar que, quando analisamos intensidade das células imunomarcadas com NADK (negativa/fraca x moderada/forte) nos três tipos histopatológicos, notamos maior proporção de casos de CCRp com intensidade mais forte em comparação com o CCRcc e o CCRcr ($p=0,048$), Figura 12C.

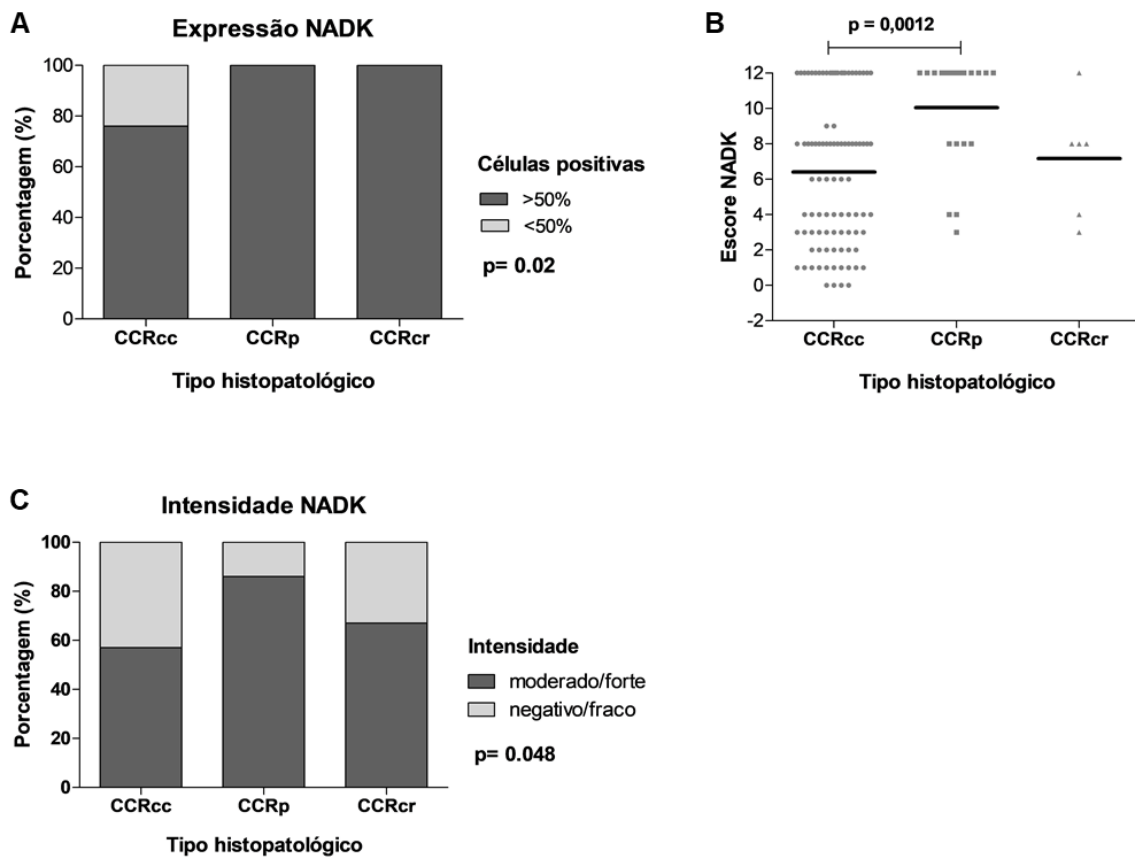


Figura 12 – Resultados NADK x tipo histopatológico. A) Porcentagem de células marcadas NADK nos três principais tipos histopatológicos. B) Escore numérico NADK nos três principais tipos histopatológicos. C) Intensidade da marcação NADK nos três principais tipos histopatológicos.

Em relação a porcentagem de células imunomarcadas e o grau de Fuhrman, os graus mais elevados (2, 3 e 4) apresentaram maior número de casos com imunomarcagem em mais de 50% das células ($p=0,002$), Tabela 4, Figura 13A. O mesmo ocorreu com o escore de expressão para NADK, que se mostrou mais elevado nos tumores com Fuhrman 2, 3 e 4 ($p=0,008$), Figura 13B. Padrão semelhante ocorreu quando analisamos apenas o subtipo células claras, os graus mais elevados de

Fuhrman (2, 3 e 4) apresentaram maior número de casos com marcação em mais de 50% das células ($p=0,001$; *Odds Ratio* 6,2; IC 95% 1,85-20,67) e o maior escore NADK foi associado a graus de Fuhrman mais elevados (Teste de Mann-Whitney, $p=0,01$).

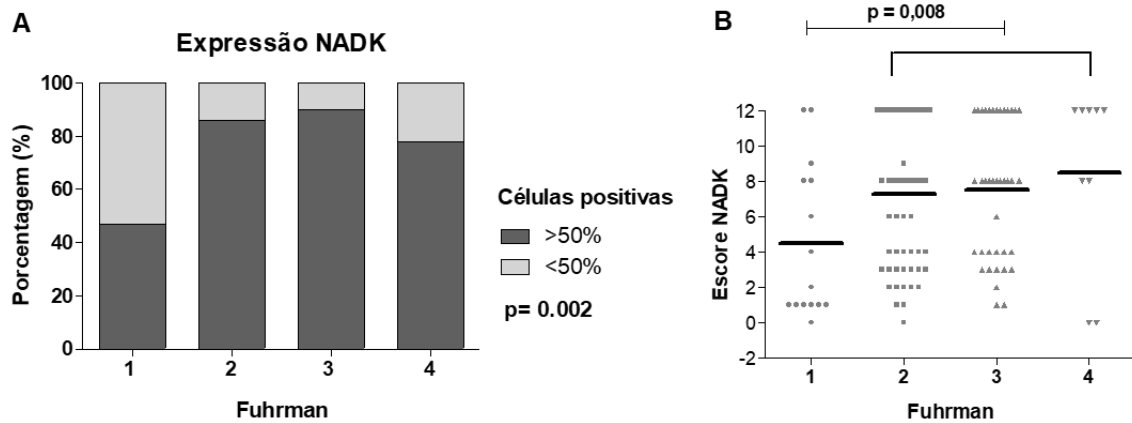


Figura 13 – Resultados NADK x Grau de Fuhrman em todos os subtipos histológicos de CCR. A) Percentagem de células marcadas nos quatro graus de Fuhrman. B) Escore de expressão de NADK nos quatro graus de Fuhrman.

Para finalizar, houve correlação positiva significativa entre os escores das duas enzimas estudadas, G6PD e NADK ($p=0,0025$), Figura 14.

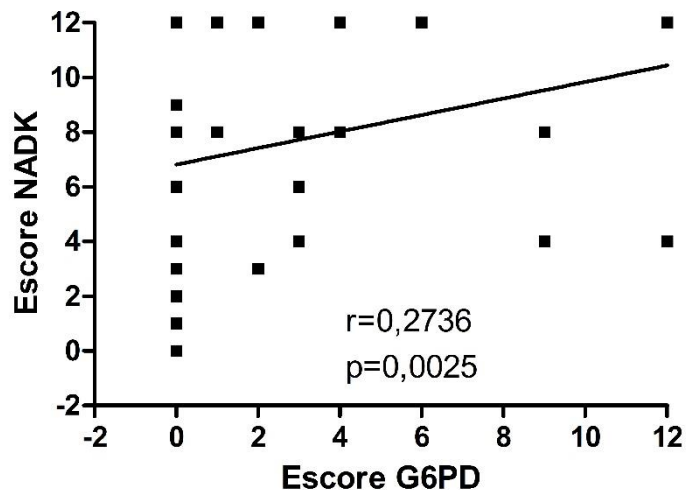


Figura 14 – Correlação Spearman entre os escores de expressão dos marcadores NADK e G6PD.

Tabela 4 – Associação entre porcentagem de células marcadas com G6PD e NADK e parâmetros clinicopatológicos

Variáveis	Porcentagem de células marcadas							
	G6PD				NADK			
	n	≤50%	>50%	p-valor Odds Ratio (IC 95%)	n	≤50%	>50%	p-valor Odds Ratio (IC 95%)
Idade								
<50 anos	19	17	2	1,000	19	3	16	1,000
≥50 anos	102	92	10	0,9 (0,19-4,6)	101	19	82	0,80 (0,21-3,06)
Gênero								
Masculino	81	78	3	0,002	80	11	69	0,067
Feminino	40	31	9	7,55 (1,92-29,74)	40	11	29	0,42 (0,16-1,08)
Tipo histológico								
CCRcc	93	89	4	0,001	93	22	71	0,020
CCRp	22	16	6		21	0	21	
CCRcr	6	4	2		6	0	6	
Grau de Fuhrman								
1	16	16	0	0,058	15	8	7	0,002
2	57	54	3		57	8	49	
3	39	32	7		39	4	35	
4	9	7	2		9	2	7	
Grau de Fuhrman								
1 e 2	73	70	3	0,012	72	16	56	0,18
3 e 4	48	39	9	5,4 (1,38-21,06)	48	6	42	2,00 (0,72-5,55)
Diâmetro								
≤7 cm	64	62	2	0,012	63	11	52	0,76
>7 cm	56	46	10	6,74 (1,41-32,24)	56	11	45	0,86 (0,34-2,18)
Estadiamento								
I e II	81	75	6	0,19	80	13	67	0,4
III e IV	40	34	6	2,2 (0,66-7,33)	40	9	31	0,67 (0,26-1,73)
Necrose								
Ausente	52	50	2	0,067	51	10	41	0,76
Presente	69	59	10	4,24 (0,89-20,25)	69	12	57	1,16 (0,46-2,94)
Metástase								
Não	107	97	10	1,0	106	19	87	0,4
Sim	10	9	1	1,08 (0,12-9,40)	10	3	7	0,51 (0,12-2,15)

CCRcc: Carcinoma de Células Renais subtipo Células Claras; CCRp: Papilífero; CCRcr: Cromóforo
 IC: Intervalo de Confiança; n: número de pacientes

6 DISCUSSÃO

Em nossa coorte de carcinoma de células renais, 67,2% dos pacientes eram do sexo masculino, 83,2% tinham mais de 50 anos de idade e 69,8% eram brancos, o que está de acordo com literatura recente sobre esse tipo de neoplasia, que cita predominância do sexo masculino em torno de 1,5:1 e pico de incidência entre 60 e 70 anos (CAPITANIO, 2019).

Apesar de estudos associarem obesidade com carcinoma de células renais (MACLEOD, 2013), apenas 38,9% da nossa coorte tinha sobrepeso/obesidade, enquanto a maioria 48,1% dos casos não tinha dados disponíveis nos prontuários. Talvez, por isso, não observamos associações significativas com este parâmetro. Observamos que 52,7% dos casos avaliados tinha história de tabagismo e/ou etilismo. Porém, não houve separação nos dados sobre tabagismo e etilismo, o que pode ter limitado a avaliação dessa variável, já que foi demonstrado, por metanálise, que o consumo de álcool moderado possui efeito protetor significativo para o desenvolvimento do câncer renal (BAGNARDI, 2015). Por outro lado, o tabagismo exerce efeitos deletérios e aumenta o risco de câncer renal em 39% (LIU, 2019). Sobre a presença de comorbidades, a maioria dos nossos pacientes apresentava *Diabetes mellitus*, hipertensão e/ou doença renal crônica, o que vai de acordo com literatura, que demonstra risco aumentando de câncer renal em pacientes com hipertensão (ALCALA, 2022), doença renal crônica (SHEBL, 2012) e *Diabetes mellitus*, principalmente em mulheres (JOH, 2011).

O câncer renal pode ser hereditário ou esporádico, sendo o primeiro responsável por 5-8% dos casos associadas com uma série de síndromes de câncer renal hereditárias: Von Hippel Lindau (VHL), Birt Hogg Dube (BHD), Esclerose Tuberosa, Câncer Renal Hereditário Papilar, entre outros (GAUR, 2017). Em nosso estudo, apenas 12 (9,2%) pacientes tinham parentes de primeiro grau com diagnóstico de câncer e nenhuma síndrome genética foi descrita.

Atualmente, mais de 50% dos CCR são descobertos acidentalmente (BAHADORAM, 2022). A tríade clássica de sintomas (dor lombar, hematúria e massa palpável) é encontrada em apenas 5-10% dos casos (NG,2008). Além disso, os pacientes podem apresentar dor abdominal, febre, hematúria, perda de peso, fadiga devido a anemia ou outros sintomas causados pela disseminação metastática, como

dor óssea e tosse. Em todos os estágios, o CCR pode produzir produtos pseudo-hormonais ou pseudocitocinas biologicamente ativos, levando a síndromes paraneoplásicas clínicas, como hipertensão, anemia, caquexia, perda de peso, febre, policitemia, hipoglicemia, hipercalemia, distúrbios da função hepática e neuropatia, sem qualquer associação com metástase (IKUEROWO, 2019). Semelhante aos dados relatados na literatura, a maioria dos pacientes avaliados neste estudo não apresentavam sintomas (74%), sendo o diagnóstico feito através de algum exame de imagem realizado por algum outro motivo. De maneira interessante, a presença de sintomas mostrou associação significativa com menor sobrevida, sugerindo doença mais avançadas nesses pacientes.

Quanto ao subtipo histopatológico, nossa coorte apresentou prevalência muito similar ao descrito na literatura, com 77,9% de CCRcc, 17,6% de CCRp e 4,6% de CCRcr (LEIBOVICH,2010). Sobre os parâmetros relacionados com a agressividade da doença, podem-se ser citados o grau nuclear de Fuhrman, necrose tumoral e presença de invasão angiolinfática como fatores importantes para o prognóstico do câncer renal (AJCC,2017). Em no nosso estudo, 55,7% dos pacientes apresentavam necrose tumoral e 15,3% invasão angiolinfática. Na análise de sobrevida, pacientes com tumores Fuhrman III ou IV, que apresentavam necrose e invasão angiolinfática tiveram menor sobrevida geral.

Em relação ao estadiamento TNM, a maioria dos nossos casos era T1 ou T2, seis pacientes apresentaram linfonodos positivos (N1) e apenas 12 (9,2%) tinham metástase. A baixa prevalência de metástase diverge da literatura, a qual descreve que cerca de 30% dos pacientes com CCR apresentam metástase ao diagnóstico (CHOUEIRI,2017) e 15% apresentarão metástase à distância no seguimento (DABESTANI,2016). Esse cenário pode estar relacionado ao diagnóstico precoce, realizado através de exames de imagem com achados incidentais. No entanto, o CCR continua sendo o mais letal dentre os cânceres urológicos, com uma incidência de 431.000 novos casos e uma taxa de mortalidade em torno de 40% (SUNG, 2021). Essa taxa tem se mostrado estável ou em declínio na maioria dos países, com exceção do Brasil, Croácia, Grécia, Irlanda, Portugal e Eslovênia onde observa-se aumento da mortalidade. O motivo ainda é incerto, mas acredita-se que este aumento esteja relacionado às diferenças étnicas, diagnóstico tardio e acesso limitado a terapias-alvo (SCELO, 2018b). Em nossa casuística, apenas 18 pacientes foram à

óbito, o que representa 14% dos casos, confirmando a predominância de casos com bom prognóstico em nossa coorte.

O tratamento cirúrgico, seja a nefrectomia radical ou a nefrectomia parcial, é o tratamento mais utilizado e mais eficaz para o câncer renal localizado (PIERORAZIO, 2016). Em nosso estudo, 77% dos pacientes foram submetidos à nefrectomia radical e 21% à nefrectomia parcial. É importante ressaltar que nossa casuística incluiu casos desde o ano 2000, quando a nefrectomia parcial ainda não era amplamente realizada para o câncer renal. Apesar da dificuldade técnica para realização de nefrectomia parcial, atualmente, a taxa de nefrectomia parcial é maior e o HC-UFTM é referência para tratamento cirúrgico de casos mais complexos.

Muitos estudos têm relacionado marcadores moleculares com características e agressividade do CCR. No entanto, a aplicação dos perfis moleculares ainda não é realidade na prática clínica e diagnóstica. Portanto, baseado na consistência dos dados sobre as alterações de metabolismo celular, é pertinente investigar biomarcadores associados com vias metabólicas e por métodos que possam ser utilizados em qualquer serviço de diagnóstico, a exemplo da imuno-histoquímica (RICKETTS, 2018; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK ANALYSIS WORKING GROUP, 2013; LINEHAN, 2019).

Neste contexto, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) é uma enzima envolvida na via catalítica da pentose fosfato (PPP), que está intimamente relacionada ao metabolismo energético. Além disso, essa via, que sempre fica desordenada nas neoplasias, foi reconhecida por gerar agentes redutores e ribose 5-fosfato para manutenção da homeostase redox das células cancerígenas e da biossíntese de nucleotídeos (ZHANG, 2014). A G6PD desempenha papel crucial em muitos tipos de câncer, mas os mecanismos moleculares específicos ainda permanecem obscuros. Seu potencial papel oncogênico foi investigado em vários tumores com base no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). A G6PD está altamente expressa em vários tecidos cancerosos (carcinoma hepatocelular, glioma e câncer de mama) em comparação com tecidos normais e foi, significativamente, associada com pior prognóstico do carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais de células claras e câncer de mama (LIU, 2023).

Lucarelli e colaboradores (2015) relataram níveis elevados de G6PD e aumento de atividade da enzima em amostras de câncer renal comparado a tecidos normais

(LUCARELLI, 2015). Nós investigamos a imunexpressão de G6PD em 121 casos de CCR e, apesar da maioria apresentar expressão negativa, observou-se diferença na porcentagem de células marcadas entre os subtipos histopatológicos de CCR. Os carcinomas papilíferos e cromófobos apresentaram maior porcentagem de células marcadas do que o carcinoma de células claras, sendo o escore de expressão, significativamente mais elevado no tumor papilífero do que no de células claras. Isso indica que a G6PD pode ser um marcador mais específico para o subtipo papilífero, o que precisa ser validado em mais estudos. No entanto, a maioria das pesquisas envolvendo G6PD e câncer renal estudaram carcinoma de células claras e não os outros subtipos (ZHANG, 2017; ZHANG, 2020).

De maneira interessante, observamos associação entre o tamanho do tumor e grau de Fuhrman com a porcentagem de células marcadas com G6PD. Nossos resultados são, de certa forma, semelhantes com os de Zhang e colaboradores (2017), que encontraram maior expressão e escore de G6PD nos graus de Fuhrman 3 e 4. Em relação ao diâmetro do tumor, houve diferença significativa entre os estágios tumorais (T), assim como a presença de linfonodos e estadiamento tumoral, associando o pior prognóstico com a alta expressão de G6PD (ZHANG, 2017). Não conseguimos demonstrar essa diferença no nosso estudo, talvez pelo baixo número de metástase e linfonodos na nossa amostra.

Já a necrose tumoral é um preditor independente de sobrevida câncer específica em pacientes com CCRcc e CCRcr (CHEVILLE, 2003; AMIN, 2008). A classificação baseada na OMS/ISUP, ao incorporar necrose tumoral, forneceu informações prognósticas adicionais, particularmente, em pacientes com CCRcc, cuja sobrevida câncer específica foi menor para pacientes, cujos tumores apresentavam necrose (DELAHUNT, 2013). Em nosso estudo, a necrose tumoral apresentou tendência de associação com maior porcentagem de células imunomarcadas e maior escore de expressão de G6PD, ao avaliar todos os subtipos histológicos. Mas mostrou associação significativa, quando avaliamos apenas o tipo células claras.

Um segundo marcador avaliado em nossa coorte foi a NADK, uma enzima que catalisa a fosforilação de NAD⁺ em NADP⁺, que por sua vez é reduzido a NADPH pela G6PD e pelas enzimas málicas. O NADPH é um importante cofator para vias metabólicas e biossintéticas. A demanda por NADPH é, particularmente, elevada nas células cancerígenas em proliferação, onde atua na síntese de nucleotídeos,

proteínas e ácidos graxos. Além disso, o NADPH é essencial para neutralização dos níveis perigosamente elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerados pelo aumento da atividade metabólica. Dado o seu papel fundamental no metabolismo e regulação das EROs, não é surpreendente que vários estudos, incluindo ensaios *in vitro* e *in vivo*, tenham identificado o NADK como um potencial alvo terapêutico para o tratamento do câncer (TEDESCHI, 2016).

Estudos recentes reforçam a importância da NADK e sua associação com o desenvolvimento e progressão de alguns tipos de cânceres. Schild e colaboradores (2021) mostraram que o aumento da atividade do NADK é uma adaptação importante, impulsionada pela sinalização oncogênica em adenocarcinoma pancreático ductal (SCHILD, 2021). Iyer e colaboradores (2023) observaram que NADK é regulado positivamente em células de câncer de mama metastático, permitindo a produção *de novo* de NADP (H) e a expansão dos *pools* de NADP (H), aumentando assim a capacidade metastática dessas células (IYER, 2023). Zeng e colaboradores, também em 2023, demonstraram que a expressão de NADK elevada está associada com metástase linfonodal, estágio tumoral mais avançado e menor sobrevida em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células (ZENG, 2023). Através de imunohistoquímica em amostras de adenocarcinoma de pulmão, foi relatada maior expressão de NADK em tecidos tumorais em comparação a tecidos não cancerosos. Além disso, pacientes com alta expressão de NADK apresentaram menor grau de diferenciação tumoral, menor taxa de sobrevida em 5 anos, e foram mais propensos a metástases linfonodais (MENG, 2024).

Nossos dados com CCR mostraram que tumores com graus mais elevados de Fuhrman apresentam maior porcentagem de células imunomarcadas e maior escore de expressão para NADK. Considerando a baixa taxa de óbitos em nossa casuística e a perda do seguimento, comum em nossa instituição, não foi possível observar associação significativa com sobrevida. No entanto, a intensidade da expressão e porcentagem de células marcadas foi maior nos casos de CCRp e CCRcr, havendo diferença no escore de expressão da NADK entre os subtipos papilífero e células claras. Portanto, semelhante ao perfil da G6PD, o marcador NADK parece ser mais específico para o subtipo papilífero. No entanto, a associação entre câncer renal e NADK ainda não foi estudada, sendo nosso estudo pioneiro neste tipo de investigação.

De maneira interessante, G6PD e NADK estão intimamente relacionadas no metabolismo celular e nossos resultados demonstraram correlação positiva significativa entre o escore das duas enzimas estudadas. Recentemente, Zhang e colaboradores (2022) investigaram como células de câncer de pâncreas respondem ao estresse oxidativo. Os pesquisadores observaram que, embora NADK1 e NADK2 contribuam para os níveis basais de NADP⁺ e NADPH, a NADK1 é o principal responsável pelo aumento e manutenção da produção de NADP(H), sob condições de estresse oxidativo. De maneira geral, quando as células adquirem perfil metastático e estão sob estresse oxidativo, há aumento dos níveis de G6PD, que se liga diretamente e estimula a atividade de NADK1 (ZHANG, 2022).

Em 2015, Tedeschi e colaboradores identificaram uma nova abordagem anticâncer: diminuindo os níveis de NADPH através da inibição da NADK e G6PD usando tionicotinamida. O tratamento de células cancerosas de colo retal e linfoma reduziu os níveis de NADPH, comprometeu as capacidades biossintéticas e de defesa antioxidante, inibindo o crescimento celular. Como resultado, as células tumorais em proliferação, já estressadas por altos níveis de EROs, não conseguiram se proteger de um novo aumento das EROs geradas pelos quimioterápicos e, conseqüentemente, sofreram apoptose. Confirmando, assim, a relação dessas duas enzimas no metabolismo da célula cancerígena (TEDESCHI, 2015).

7 CONCLUSÃO

A análise da expressão proteica por imuno-histoquímica revelou que as enzimas G6PD e NADK apresentam maior expressão em carcinoma de células renais subtipo papilífero, quando comparado ao subtipo de células claras. Ambos os marcadores mostraram maior expressão em tumores com graus mais elevados de Fuhrman.

Houve maior proporção de casos com >50% de células marcadas para G6PD em tumores maiores do que 7 cm. Enquanto na análise do subgrupo células claras, o escore de expressão do G6PD se mostrou mais elevado em tumores maiores.

O escore de expressão da G6PD também apresentou tendência de associação com presença de necrose tumoral. Esta associação foi significativa, apenas quando analisamos o subtipo células claras de maneira separada.

Quanto a relação das duas enzimas no metabolismo celular, o estudo demonstrou uma correlação positiva significativa entre os escores de expressão de G6PD e NADK.

REFERÊNCIAS

- ALCALA, Karine et al. The relationship between blood pressure and risk of renal cell carcinoma. **International journal of epidemiology**, v. 51, n. 4, p. 1317-1327, 2022.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Key Statistics About Kidney Cancer**. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/kidney-cancer/about/key-statistics.html>. Acesso em: 21/12/2021.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE FOR CANCER. **AJCC Cancer Staging Manual 8**. ed. Springer, 2017
- AMIN, Mahul B. et al. Chromophobe renal cell carcinoma: histomorphologic characteristics and evaluation of conventional pathologic prognostic parameters in 145 cases. **The American journal of surgical pathology**, v. 32, n. 12, p. 1822-1834, 2008.
- Atualizações em Nefropatologia**. [livro eletrônico.] / organização Juliana Reis Machado e Silva, Aline Cristina Souza da Silva, Marlene Antônia dos Reis – 1. ed. – João Pessoa, PB: Editora Creative, 2022.
- BAGNARDI, Vincenzo et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose–response meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 112, n. 3, p. 580-593, 2015.
- BAHADORAM, Sara et al. Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment. **G Ital Nefrol**, v. 39, n. 3, p. 1, 2022.
- CAI, Tianchi et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and NADPH oxidase 4 control STAT3 activity in melanoma cells through a pathway involving reactive oxygen species, c-SRC and SHP2. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 5, p. 1610, 2015.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK ANALYSIS WORKING GROUP: BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE CREIGHTON CHAD J. 1 2 MORGAN MARGARET 1 GUNARATNE PREETHI H. 1 3 WHEELER DAVID A. 1 GIBBS RICHARD A. 1 et al. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 43-49, 2013.
- CAMPBELL, Steven C. et al. Guideline for management of the clinical T1 renal mass. **The Journal of urology**, v. 182, n. 4, p. 1271-1279, 2009.
- CAO, Xiaoyan et al. Density functional studies of coenzyme NADPH and its oxidized form NADP+: structures, UV–Vis spectra, and the oxidation mechanism of NADPH. **Journal of Computational Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 305-316, 2020.
- CAPITANIO, Umberto et al. Epidemiology of renal cell carcinoma. **European urology**, v. 75, n. 1, p. 74-84, 2019.
- CHAN, Barden; VANDERLAAN, Paul A.; SUKHATME, Vikas P. 6-Phosphogluconate dehydrogenase regulates tumor cell migration in vitro by regulating receptor tyrosine kinase c-Met. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 439, n. 2, p. 247-251, 2013.

- CHEN, Yi-Jing et al. An introduction of an easy-operating and economical technique for tissue microarray preparation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 73, n. 7, p. 403-407, 2020.
- CHEN, Ze et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 152, p. 116-141, 2020.
- CHEVILLE, John C. et al. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. **The American journal of surgical pathology**, v. 27, n. 5, p. 612-624, 2003.
- CHIARUGI, Alberto et al. The NAD metabolome—a key determinant of cancer cell biology. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 11, p. 741-752, 2012.
- CHOUERI, Toni K.; MOTZER, Robert J. Systemic therapy for metastatic renal-cell carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 4, p. 354-366, 2017.
- COHEN, P.; ROSEMEYER, M. A. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. **European journal of biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 8-15, 1969.
- DABESTANI, Saeed et al. Renal cell carcinoma recurrences and metastases in primary non-metastatic patients: a population-based study. **World journal of urology**, v. 34, p. 1081-1086, 2016.
- DELAHUNT, Brett et al. A novel grading system for clear cell renal cell carcinoma incorporating tumor necrosis. **The American journal of surgical pathology**, v. 37, n. 3, p. 311-322, 2013.
- FAN, Jing et al. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. **Nature**, v. 510, n. 7504, p. 298-302, 2014.
- FENG, Qi et al. Targeting G6PD reverses paclitaxel resistance in ovarian cancer by suppressing GSTP1. **Biochemical Pharmacology**, v. 178, p. 114092, 2020.
- FITZGERALD, Kelly N.; LEE, Chung-Han. Personalizing first-line management of metastatic renal cell carcinoma: leveraging current and novel therapeutic options. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 20, n. 13, 2022.
- FUHRMAN, Susan A.; LASKY, Larry C.; LIMAS, Catherine. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **The American journal of surgical pathology**, v. 6, n. 7, p. 655-664, 1982.
- GAUR, Sonia; TURKBAY, Baris; CHOYKE, Peter. Hereditary renal tumor syndromes: update on diagnosis and management. In: **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**. WB Saunders, 2017. p. 59-71.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HE, Chao et al. Downregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by microRNA-1 inhibits the growth of pituitary tumor cells. **Oncology Reports**, v. 40, n. 6, p. 3533-3542, 2018.

HU, Tao et al. Elevated glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in the cervical cancer cases is associated with the cancerigenic event of high-risk human papillomaviruses. **Experimental biology and medicine**, v. 240, n. 10, p. 1287-1297, 2015.

IKUEROWO, S. O. et al. Paraneoplastic syndromes and oncological outcomes in renal cancer. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 22, n. 9, p. 1271-1275, 2019.

ILTER, Didem et al. NADK-mediated de novo NADP (H) synthesis is a metabolic adaptation essential for breast cancer metastasis. **Redox Biology**, v. 61, p. 102627, 2023.

INAMURA, Kentaro. Renal cell tumors: understanding their molecular pathological epidemiology and the 2016 WHO classification. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, p. 2195, 2017.

INSTITUTO ONCOGUIA. **Inca envia ao Oncoguia dados inéditos sobre incidência de câncer de rim**. Disponível em:

<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/inca-envia-ao-oncoguia-dados-ineditos-sobre-incidencia-de-cancer-de-rim/11958/8/>. 2018. Acesso em: 22/12/2021.

JOH, Hee-Kyung; WILLETT, Walter C.; CHO, Eunyoung. Type 2 diabetes and the risk of renal cell cancer in women. **Diabetes care**, v. 34, n. 7, p. 1552-1556, 2011.

JU, Huai-Qiang et al. Regulation of the Nampt-mediated NAD salvage pathway and its therapeutic implications in pancreatic cancer. **Cancer letters**, v. 379, n. 1, p. 1-11, 2016.

KANE, Christopher J. et al. Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. **Cancer**, v. 113, n. 1, p. 78-83, 2008.

KATSYUBA, Elena et al. NAD⁺ homeostasis in health and disease. **Nature metabolism**, v. 2, n. 1, p. 9-31, 2020.

KAWAI, Shigeyuki; MURATA, Kousaku. Structure and function of NAD kinase and NADP phosphatase: key enzymes that regulate the intracellular balance of NAD (H) and NADP (H). **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 72, n. 4, p. 919-930, 2008.

KIM, Kyu Ho et al. In-house manual construction of high-density and high-quality tissue microarrays by using homemade recipient agarose-paraffin blocks. **Korean Journal of Pathology**, v. 47, n. 3, p. 238, 2013.

KORNBERG, Arthur; PRICER JR, W. E. On the structure of triphosphopyridine nucleotide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 186, n. 2, p. 557-567, 1950.

KUO, Wei-ying; LIN, Jia-yu; TANG, Tang K. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. **International Journal of Cancer**, v. 85, n. 6, p. 857-864, 2000.

LEIBOVICH, Bradley C. et al. Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma. **The Journal of urology**, v. 183, n. 4, p. 1309-1316, 2010.-1316, 2010.

LERNER, Felicitas et al. Structural and functional characterization of human NAD kinase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 288, n. 1, p. 69-74, 2001.

LI, Danyi et al. A new G6PD knockdown tumor-cell line with reduced proliferation and increased susceptibility to oxidative stress. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 24, n. 1, p. 81-90, 2009.

LINEHAN, W. Marston; RICKETTS, Christopher J. The Cancer Genome Atlas of renal cell carcinoma: findings and clinical implications. **Nature Reviews Urology**, v. 16, n. 9, p. 539-552, 2019.

LIU, Bin et al. Pan-cancer analysis of G6PD carcinogenesis in human tumors. **Carcinogenesis**, p. bgad043, 2023.

LIU, Ling et al. Malic enzyme tracers reveal hypoxia-induced switch in adipocyte NADPH pathway usage. **Nature chemical biology**, v. 12, n. 5, p. 345-352, 2016.

LIU, Xiaoqiu et al. Dose-response relationships between cigarette smoking and kidney cancer: a systematic review and meta-analysis. **Critical Reviews in Oncology/hematology**, v. 142, p. 86-93, 2019.

LU, Ming et al. Elevated G6PD expression contributes to migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells by inducing epithelial-mesenchymal transition. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 50, n. 4, p. 370-380, 2018.

LUCARELLI, Giuseppe et al. Metabolomic profile of glycolysis and the pentose phosphate pathway identifies the central role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in clear cell-renal cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 13371, 2015.

MACLEOD, Liam C. et al. Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study. **The Journal of urology**, v. 190, n. 5, p. 1657-1661, 2013.

MENG, Xiangpeng et al. Knockdown of NADK promotes LUAD ferroptosis via NADPH/FSP1 axis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 150, n. 5, p. 228, 2024.

MCGUINNESS, E. T.; BUTLER, J. R. NAD⁺ kinase—a review. **International Journal of Biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 1985.

MOCH, Holger 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. 604-614, 2000.

MOCH, Holger et al. The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—part A: renal, penile, and testicular tumours. **European urology**, v. 70, n. 1, p. 93-105, 2016.

NAGASHIO, Ryo et al. Prognostic significance of G6PD expression and localization in lung adenocarcinoma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 1, p. 38-46, 2019.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Artmed Editora, 2019.

NG, Chaan S. et al. Renal cell carcinoma: diagnosis, staging, and surveillance. **American Journal of Roentgenology**, v. 191, n. 4, p. 1220-1232, 2008.

NOGUEIRA, Veronique; HAY, Nissim. Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 16, p. 4309-4314, 2013.

OHASHI, Kazuto; KAWAI, Shigeyuki; MURATA, Kousaku. Identification and characterization of a human mitochondrial NAD kinase. **Nature communications**, v. 3, n. 1, p. 1248, 2012.

PANTUCK, Allan J. et al. Incidental renal tumors. **Urology**, v. 56, n. 2, p. 190-196, 2000.

PATARD, Jean-Jacques et al. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. **European urology**, v. 44, n. 2, p. 226-232, 2003.

PIERORAZIO, Phillip M. et al. Management of renal masses and localized renal cancer: systematic review and meta-analysis. **The Journal of urology**, v. 196, n. 4, p. 989-999, 2016.

PIETROBON, Violena. Cancer metabolism. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-2, 2021.

PIRES, Andréa Rodrigues Cordovil; ANDREIUOLO, Felipe da Matta; DE SOUZA, Simone Rabello. TMA for all: a new method for the construction of tissue microarrays without recipient paraffin block using custom-built needles. **Diagnostic Pathology**, v. 1, p. 1-5, 2006.

POLIMENI, Manuela et al. Modulation of doxorubicin resistance by the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Biochemical Journal**, v. 439, n. 1, p. 141-149, 2011.)

PRAMONO, Alvinsyah Adhityo et al. NAD-and NADPH-contributing enzymes as therapeutic targets in cancer: an overview. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 358, 2020.

PU, Haihong et al. Overexpression of G6PD is associated with high risks of recurrent metastasis and poor progression-free survival in primary breast carcinoma. **World journal of surgical oncology**, v. 13, p. 1-7, 2015.

RICKETTS, Christopher J. et al. The cancer genome atlas comprehensive molecular characterization of renal cell carcinoma. **Cell reports**, v. 23, n. 1, p. 313-326. e5, 2018.

SCELO, Ghislaine et al. Variability of sex disparities in cancer incidence over 30 years: the striking case of kidney cancer. **European Urology Focus**, v. 4, n. 4, p. 586-590, 2018a.

SCELO, Ghislaine; LAROSE, Tricia L. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 36, p. 3574, 2018b.

SCHILD, Tanya et al. NADK is activated by oncogenic signaling to sustain pancreatic ductal adenocarcinoma. **Cell Reports**, v. 35, n. 11, 2021.

SHEBL, Fatma M. et al. Cancer risk among elderly persons with end-stage renal disease: a population-based case–control study. **BMC nephrology**, v. 13, p. 1-8, 2012.

SONG, Jiaqi et al. The multiple roles of glucose-6-phosphate dehydrogenase in tumorigenesis and cancer chemoresistance. **Life**, v. 12, n. 2, p. 271, 2022.

SPAANS, Sebastiaan K. et al. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 742, 2015.

SUFRIN, G. et al. Paraneoplastic and serologic syndromes of renal adenocarcinoma. In: **Seminars in urology**. 1989. p. 158-171.

SUNG, Hyuna et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAO, Rongkun et al. Genetically encoded fluorescent sensors reveal dynamic regulation of NADPH metabolism. **Nature methods**, v. 14, n. 7, p. 720-728, 2017.

TEDESCHI, Philip M. et al. Suppression of cytosolic NADPH pool by thionicotinamide increases oxidative stress and synergizes with chemotherapy. **Molecular pharmacology**, v. 88, n. 4, p. 720-727, 2015.

TEDESCHI, Philip M. et al. NAD⁺ kinase as a therapeutic target in cancer. **Clinical cancer research**, v. 22, n. 21, p. 5189-5195, 2016.

TSOUKO, E. et al. Regulation of the pentose phosphate pathway by an androgen receptor–mTOR-mediated mechanism and its role in prostate cancer cell growth. **Oncogenesis**, v. 3, n. 5, p. e103-e103, 2014.

VANDER HEIDEN, Matthew G.; CANTLEY, Lewis C.; THOMPSON, Craig B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009.

VOLPE, Alessandro et al. Contemporary management of small renal masses. **European urology**, v. 60, n. 3, p. 501-515, 2011.

VOLPE, Alessandro; PATARD, Jean Jacques. Prognostic factors in renal cell carcinoma. **World journal of urology**, v. 28, p. 319-327, 2010.

WANG, Jixu et al. Overexpression of G6PD is associated with poor clinical outcome in gastric cancer. **Tumor Biology**, v. 33, p. 95-101, 2012.

WANG, Xiaolin et al. Zoledronic acid inhibits the pentose phosphate pathway through attenuating the Ras-TAp73-G6PD axis in bladder cancer cells. **Molecular medicine reports**, v. 12, n. 3, p. 4620-4625, 2015.

XIAO, Wusheng et al. NAD (H) and NADP (H) redox couples and cellular energy metabolism. **Antioxidants & redox signaling**, v. 28, n. 3, p. 251-272, 2018.

YAMAWAKI, Kaoru et al. Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin chemoresistance. **Cancer letters**, v. 521, p. 29-38, 2021.

YI, Huan et al. Exosomes mediated pentose phosphate pathway in ovarian cancer metastasis: a proteomics analysis. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 12, p. 15719, 2015.

YING, Weihai. NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. **Antioxidants & redox signaling**, v. 10, n. 2, p. 179-206, 2008.

ZENG, Zimei et al. Nicotinamide adenine dinucleotide kinase promotes lymph node metastasis of NSCLC via activating ID1 expression through BMP pathway. **International Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3184, 2023.

ZHANG, Chunhua et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a biomarker and potential therapeutic target for cancer. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 14, n. 2, p. 280-289, 2014.

ZHANG, Qiao et al. G6PD facilitates clear cell renal cell carcinoma invasion by enhancing MMP2 expression through ROS-MAPK axis pathway. **International journal of oncology**, v. 57, n. 1, p. 197-212, 2020.

ZHANG, Qiao et al. Overexpression of G6PD represents a potential prognostic factor in clear cell renal cell carcinoma. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 4, p. 665, 2017.

ZHANG, Ren. MNADK, a long-awaited human mitochondrion-localized NAD kinase. **Journal of cellular physiology**, v. 230, n. 8, p. 1697-1701, 2015.

ZHANG, Yang et al. G6PD-mediated increase in de novo NADP⁺ biosynthesis promotes antioxidant defense and tumor metastasis. **Science Advances**, v. 8, n. 29, p. eabo0404, 2022.

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ENZIMAS REGULADORAS DE NADPH EM CÂNCER RENAL

Pesquisador: Régia Caroline Peixoto Lira Fusco

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 45591221.8.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triângulo Mineiro - MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.981.821

Apresentação do Projeto:

O projeto está sendo reapresentado com o objetivo de atender pendência(s) apontada(s) no parecer nº 4.919.673.

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO, de 13/09/2021) e do Projeto Detalhado (PROJETO_CEP_versao2.docx, de 01/08/2021).

Segundo os pesquisadores:

INTRODUÇÃO:

"O câncer renal está entre os 10 tipos de câncer mais comuns no mundo, correspondendo a cerca de 3% de todos os cânceres diagnosticados. A estimativa é de aumento significativo na incidência destes tumores, sobretudo em países como o Brasil e Equador. Sendo o tabagismo, obesidade e hipertensão considerados os principais fatores de risco (WONG et al., 2017).

O carcinoma renal possui mais de 10 subtipos histopatológicos/moleculares. O carcinoma renal de células claras é tipo mais comum (> 75% dos casos), seguido dos tipos Papilar (~15%) e Cromóforo (~5%). Cerca de 30% dos casos apresentam metástase no diagnóstico e outros 30%

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 4.981.821

Outros	DECLARACAO_PROPPG_UFTM_BIOB ANCO.pdf	13/09/2021 10:43:47	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_versao2.docx	01/08/2021 08:47:33	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Outros	TERMO_CIENCIA_AUTORIZACAO_PATOLOGIA_HC_JUL2021assinado.pdf	07/07/2021 11:48:36	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Outros	Memorando_autorizacao_GEPHC.pdf	07/07/2021 11:47:55	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Outros	RESPOSTA_PARECER_N_4759735.pdf	07/07/2021 11:47:25	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_versao2.pdf	07/07/2021 11:46:40	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Outros	PEDIDO_DISPENSA_TCLE.pdf	15/04/2021 15:46:29	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_compromisso_Inst_executora_FapemigUniversal.pdf	15/04/2021 14:55:13	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP.docx	15/04/2021 14:54:11	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoCEPRegia.pdf	15/04/2021 14:53:34	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 17 de Setembro de 2021

Assinado por:

**Daniel Fernando Bovolenta Ovigli
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
TRIÂNGULO MINEIRO - UFTM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ENZIMAS REGULADORAS DE NADPH EM CÂNCER RENAL

Pesquisador: Régia Caroline Peixoto Lira Fusco

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 45591221.8.0000.5154

Instituição Proponente: Universidade Federal do Triângulo Mineiro - MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.858.873

Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de emenda submetida nos seguintes termos:

"Solicito a inserção de dois novos alunos no projeto intitulado Enzimas reguladoras de NADPH em câncer renal, CAAE nº 45591221.8.0000.5154, parecer de aprovação nº 4.981.821. Ambos são alunos de pós-graduação e irão desenvolver objetivos que fazem parte da proposta aprovada. Não constam alterações em relação ao projeto originalmente aprovado. Alunos a serem incluídos: Daniel Pinheiro Ferreira, portador do CPF 297884118-43 e Rafaela Viviane Neves Silva, portadora do CPF 136529356-40. Segue em anexo o formulário do CEP-UFTM com a lista dos pesquisadores envolvidos atualizada (fonte cor vermelha, página 7)".

Objetivo da Pesquisa:

Não constam alterações em relação ao protocolo originalmente aprovado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não constam alterações em relação ao protocolo originalmente aprovado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de solicitação de emenda submetida nos seguintes termos:

"Solicito a inserção de dois novos alunos no projeto intitulado Enzimas reguladoras de NADPH em

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia **CEP:** 38.025-440
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 **E-mail:** cep@uftm.edu.br



Continuação do Parecer: 5.858.873

/ Brochura Investigador	PROJETO_CEP_versao2.docx	08:47:33	Peixoto Lira Fusco	Aceito
Outros	TERMO_Ciencia_Autorizacao_Patologia_HC_JUL2021assinado.pdf	07/07/2021 11:48:36	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Outros	Memorando_autorizacao_GEPHC.pdf	07/07/2021 11:47:55	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Outros	RESPOSTA_PARECER_N_4759735.pdf	07/07/2021 11:47:25	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP_versao2.pdf	07/07/2021 11:46:40	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Outros	PEDIDO_DISPENSA_TCLE.pdf	15/04/2021 15:46:29	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_compromisso_Inst_executora_FapemigUniversal.pdf	15/04/2021 14:55:13	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEP.docx	15/04/2021 14:54:11	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoCEPRégia.pdf	15/04/2021 14:53:34	Régia Caroline Peixoto Lira Fusco	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERABA, 20 de Janeiro de 2023

Assinado por:
Daniel Fernando Bovolenta Ovigli
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 159, Casa das Comissões
Bairro: Abadia CEP: 38.025-440
UF: MG Município: UBERABA
Telefone: (34)3700-6803 E-mail: cep@uftm.edu.br

Anexo B - Confecção dos *tissues microarrays* - TMA

- 1- Cortar o molde de coreldraw e demarcar os pinos na fita adesiva;
- 2- Colocar os blocos doadores na estufa pôr no mínimo 5 minutos de 4 em 4;
- 3- Coletar áreas demarcadas do bloco ainda morno;
- 4- Com auxílio de uma pinça pegar o material coletado e posicioná-lo acima do seu local pré-estipulado no mapa de localização;
- 5- Após posicionar todos os fragmentos coletados, colocar molde para inserção da parafina líquida;
- 6- Deixar a parafina esfriar por 40 minutos;
- 7- Desmoldar os blocos e dar banho de parafina;
- 8- Cortar no micrótomo 3 μ , utilizando lâminas com silano.

Anexo C - Protocolo de imuno-histoquímica

1. Raspar o excesso de parafina (costas da lâmina) e deixar 5 minutos na estufa;
2. Desparafinizar os cortes em xilol por no mínimo 25 minutos;
3. Passar as lâminas em soluções de álcool absoluto, 90%, 80% e 70%, água corrente e água destilada;
4. Recuperação antigênica: Panela Pascal (Tampão CITRATO 1:10 - diluído em água destilada);
5. Destampar os tubetes e deixar as lâminas esfriarem no tampão por 25 minutos em temperatura ambiente (TA);
6. Escorrer o tampão e lavar as lâminas com água destilada 6x e 1x com tampão PBS uso;
7. Enxugar em volta do corte e colocar as lâminas em uma cuba escura e úmida;
8. Passar a caneta (Dako Pen) em volta do corte;
9. Bloqueio da peroxidase (reagente kit EasyPath): cobrir o corte. Incubar por 30 minutos TA;
10. Lavar 2x de 5 minutos cada com PBS uso;
11. Enxugar em volta do corte;
12. Bloqueio das proteínas (reagente kit EasyPath): cobrir o corte. Incubar por 25 minutos TA;
13. Não lavar;
14. Enxugar em volta do corte;
15. Incubar com anticorpo primário (Anti-G6PD monoclonal de rato, sc-373886, diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc./ Anti-NADK policlonal de coelho, FNab05536, diluição 1:100, FineTest), diluir em PBS/BSA2% (4mL PBS uso + 0,08g albumina bovina) - Overnight na geladeira;
16. Lavar 2x de 5 minutos cada com PBS uso;
17. Enxugar em volta do corte;
18. Incubar com Polímero (reagente kit EasyPath): cobrir o corte. Incubar por 1 hora TA;
19. Lavar 2x de 5 minutos cada com PBS uso;
20. Enxugar em volta do corte;

21. Revelar com DAB-DAKO (1mL substrato + 1 gota cromógeno) por 3 minutos TA.
Parar a reação com água corrente;

22. Contra corar com Hematoxilina por 30 segundos;

23. Lavar em água corrente por 2 minutos

24. Desidratar em álcool absoluto, diafanizar em xilol e montar com lamínula e entelan.

Controle positivo G6PD: Testículo humano.

Controle positivo NADK: Rim humano.