UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

SANTIAGO ANDRES VILELLA ARIAS

**Estudo de candidatos a biomarcadores
moleculares de prognóstico
em carcinoma renal de células claras**

**Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

30/10/2013

SANTIAGO ANDRES VILELLA ARIAS

**Estudo de candidatos a biomarcadores moleculares
de prognóstico em carcinoma renal de células claras**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica).*

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Dr. Eduardo Moraes Rego Reis

São Paulo

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Vilella Arias, Santiago Andres

V711v Estudo de candidatos a biomarcadores moleculares de
prognóstico em carcinoma renal de células claras. / Santiago
Andres Vilella Arias. -- São Paulo, 2013.
122p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador: Reis, Eduardo Moraes Rego

1. Carcinoma 2. Câncer : Diagnóstico 3. Anatomia patológica
4. Reação de imunohistoquímica : Medicina I. T. II Reis, Eduardo
Moraes Rego, orientador.

616.994 CDD

AGRADECIMENTOS

Um dos mais importantes agradecimentos de todos é para o Brasil, país incrível e de pessoas maravilhosas, que me acolheu como um dos seus, desde os meus primeiros dias que andei por estas terras, me brindando (e o continua fazendo) uma das experiências mais importantes que já aconteceram na minha vida, que com muito orgulho e prazer, farei questão de lembrar para sempre não só pra mim, também para meus amigos e seres queridos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Reis, quem não apenas me deu a oportunidade de trabalhar no seu laboratório desenvolvendo esta tese de doutorado, assim como também colaborou muito com meu aprendizado e amadurecimento pessoal como cientista.

Ao Prof. Dr. Sergio Verjovski-Almeida, um grande exemplo de pesquisador comprometido com a ciência, que também contribuiu com a minha formação, colaborando com ideias, sugestões e estando sempre presente para prestar uma ajuda quando as coisas pareciam ficar complicadas.

Aos Profs. Dr. Fernando Soares chefe da anatomia patológica, ao Dr. Gustavo Guimarães chefe do Núcleo de Urologia do Hospital A.C. Camargo, assim como também ao Dr. Stênio Zequi, Dr. Rafael Malagoli, e ao Dr. Walter Costa, pesquisadores da mesma instituição, pela participação como colaboradores neste trabalho.

A turma Argentina em São Paulo, Jorge Ruiz e Silvina Bustos, meus velhos amigos desde os tempos de Faculdade, que vem compartilhando comigo inumeráveis bons momentos.

A todos meus “novos” grandes amigos, pessoas maravilhosas que tive a sorte de conhecer e conviver durante estes inesquecíveis anos de Doutorado...

Dr. Ângela Fachel, a minha co-orientadora dos primeiros anos no laboratório (e atual colaboradora), me ensinando com paciência e didática incrível, a técnica que tem-se convertido na base da minha formação.

Dra. Lauren Camargo, amiga incondicional e de presença firme com a sua contagiante alegria, minha grande dama de honra e “senhora dos anéis”.

Dra Ana Carolina Tahira (Tahirita) pelos desabafos mútuos ao assunto em comum e os inumeráveis cafés que renderam conversas incríveis acadêmicas e não acadêmicas.

Ao Murilo Sena, quem vem transitando junto comigo desde o começo até os últimos dias do depósito da tese, este longo caminho que encerra uma etapa importante nas nossas vidas.

Aos amigos que foram parte e aos que continuam estando presente no quadrilátero R209, o mais trabalhador, mais divertido e legal do laboratório: Mariana Carvalho, e Yuri Moreira.

A todos os membros (e ex-membros) do laboratório do Prof. Sergio Verjovski e do Prof. Eduardo Reis, onde existe um importante ambiente colaborativo e profissional, assim como uma integração e amizade de alto nível tornando-nos todos parte de uma grande família: Dra. Giulliana Tessarin, Dr. Felipe Beckedorff, Dr. Kleber Parreira (pessoa excepcional de incrível cultura e de boas conversas), Dra Ana Carolina Ayupe, Carlos de Ocesano, Vinicius Maracajá-Coutinho, Letícia Anderson (vocalista oficial da música “Santiago Querido”), Dinar Yunusov, Lucas Ferreira e Otto Cerqueira (Ottoto, grande colega e atual colaborador).

Às ex-alunas de iniciação científica do laboratório que têm colaborado no meu trabalho e principalmente com as quais aprendi a ensinar ciência: Carolina Valenzuela e Cinthia Ramos.

À Ana Paula Vidal, a secretária mais eficiente do mundo, que dia a dia resolve e facilita nossas vidas nos assuntos burocráticos e administrativos. Aos técnicos do laboratório Renato Alvarenga (ex-técnico), Jefferson dos Santos e Bianca Dazzani, pela amizade e apoio constante.

Desejo que sigam comigo durante toda a vida!

A minha noiva (futura esposa e mãe de Xico Manê), e mais do que isso, para minha insubstituível amiga, companheira e paixão da vida, Maria Emília Zenteno, quem sem duvidar por um momento também preparou as suas malas e veio junto comigo a construir este sonho, que nos permitiu crescer e amadurecer, batalhando sempre juntos nesta longa estrada.

A meus pais, que contribuíram com a minha educação ética/moral/social e escolar desde os primeiros anos de vida sem os quais eu não estaria atualmente onde me encontro e por tanto, tudo isto não teria sido possível.

A Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Química (IQ) por terem me aceitado a formar parte de uma das instituições mais importantes de ensino e pesquisa, sendo a partir de hoje também parte da sua história.

Muito obrigado às agencias de fomento FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro.

*Jogue seus sonhos ao espaço como uma pipa, e você nunca saberá o que lhe trará de volta;
uma nova vida, novos amigos, um novo país.*

Adaptado de, Anaïs Nin (1903 – 1977)

...Cada um de nós deve procurar a sua própria verdade...

Adaptado de, Francisco Manuel
(<http://voltairea.blogspot.com.br/2010/10/ausencias-y-regreso-de-las-filosofias.html>)

RESUMO

Vilella-Arias S. A. **Estudo de candidatos a biomarcadores moleculares de prognóstico em carcinoma renal de células claras.** 2013. 122p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O carcinoma de células renais (CCR) é o tumor mais agressivo que afeta o rim de pessoas adultas. O CCR é uma doença heterogênea, com diferentes alterações moleculares e variados padrões histológicos e clínicos que apresentam evolução diferente. Atualmente apenas variáveis anatomopatológicas clássicas são utilizadas para determinar o prognóstico dos pacientes. Utilizando uma plataforma de microarranjos de DNA, nosso grupo identificou em um trabalho anterior um conjunto de genes que se encontram diferencialmente expressos em tumores de rim. Neste estudo, nove candidatos foram selecionados para avaliação como marcadores de prognóstico no CCR. Foi confirmada a alteração na expressão dos genes *ARNTL*, *ACTN4* e *EPAS1* ($p < 0,05$) em amostras tumorais de CCR através de PCR em tempo real. Adicionalmente, foi observada a alteração da expressão dos genes *ARNTL*, *EPAS1* e *CASP7* em linhagens celulares imortalizadas derivadas de tumores renais, recapitulando portanto, as alterações observadas nos tumores obtidos de pacientes. Posteriormente investigamos o padrão de expressão proteica destes candidatos por imunohistoquímica utilizando microarranjos de tecidos. Foi detectada a diminuição significativa ($p < 0,05$) da expressão das proteínas ACTN4, ARNTL, CASP7 e EPAS1 em tumores de pacientes com CCR relativamente ao tecido renal não tumoral. Além disso, foi possível determinar valores de imunomarcção capazes de estratificar pacientes com CCR em diferentes grupos de risco quanto à sobrevida câncer-específica, que adicionalmente apresentaram associação significativa com parâmetros anatomopatológicos utilizados na clínica. As imunomarcções de ACTN4, ARNTL, e EPAS1 se mostraram parâmetros independentes de prognóstico de sobrevida dos pacientes. A imunomarcção de CASP7 foi capaz de identificar subgrupos de pacientes com pior prognóstico dentro de um conjunto de pacientes de baixo risco em função do estadio clínico, além de identificar pacientes com menor risco de morte pelo câncer entre aqueles apresentaram recorrência em até 5 após a cirurgia. O conjunto de resultados obtidos aponta para um novo conjunto de biomarcadores moleculares com potencial relevância para auxiliar no prognóstico de pacientes com carcinoma de células renais.

Palavras-chave: Carcinoma de células renais, Microarranjo de tecidos, Biomarcadores, CASP7, ACTN4

ABSTRACT

Vilella-Arias S. A. **Study of molecular biomarker candidates for prognosis in clear cell renal carcinoma.** 2013. 122p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The renal cell carcinoma (RCC) is the most aggressive tumor that affects the kidney in adult people. The RCC is a heterogeneous disease, with many different molecular alterations and varied histological and clinical patterns with different outcome. Currently, only classic anatomopathological variables are used to determine patients' prognosis. Using a DNA microarray platform, our group identified in a previous work a set of genes differentially expressed in renal tumors. In this study, nine candidates were selected for evaluation as prognostic biomarkers in RCC. Alteration of the gene expression in RCC tumor samples was confirmed for *ARNTL*, *ACTN4* and *EPAS1* ($p < 0.05$) by real time PCR. Additionally, gene expression changes of *ARNTL*, *EPAS1* and *CASP7* were also observed in immortalized cell lines derived from renal tumors, recapitulating the expression changes detected in the patients' tumors. Next, we used tissue microarrays to investigate the protein expression of the selected candidates by immunohistochemistry. Expression of the proteins ACTN4, ARNTL, CASP7 and EPAS1 was detected as significantly downregulated ($p < 0.05$) in patients' tumors relative to non-tumor renal tissue. Furthermore, immunostaining patterns of the selected candidates were able to stratify patients with RCC in different risk groups according to cancer-specific survival, which also showed significant associations with anatomopathological parameters used in the clinics. ACTN4, ARNTL and EPAS1 immunostaining resulted as independent prognostic parameters of patient survival. CASP7 immunostaining was able to identify subgroups of patients with worse prognosis in a set of low risk patients as determined by their clinical stage, and also identified patients with lower risk of death from cancer amongst patients that relapsed within 5 years after surgery. Overall, these results point to a new set of molecular biomarkers with potential relevance to help in the prognosis of patients with renal cell carcinoma.

Key-word: Renal cell carcinoma, Tissue microarrays, Biomarkers, CASP7, ACTN4

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Exemplos dos diferentes graus de marcação observados nas amostras de CCR presentes no TMA	44
Figura 2. Diferentes graus de marcação observados nas amostras não tumorais presentes no TMA	44
Figura 3. Expressão de <i>ARNTL</i> em amostras clínicas de rim por qPCR	49
Figura 4. Expressão dos genes <i>ACTN4</i> e <i>EPAS1</i> em amostras clínicas de rim por qPCR.....	50
Figura 5. Expressão dos genes <i>CASP7</i> e <i>VRK2</i> em amostras clínicas de rim por qPCR.....	51
Figura 6. Expressão dos genes candidatos em linhagens celulares de rim por qPCR.....	53
Figura 7. Expressão relativa de <i>ACTN4</i> nas amostras tumorais e não tumorais de rim detectadas na lâmina de TMA.....	55
Figura 8. Curvas de sobrevida de pacientes com CCRcc em função do padrão de imunomarcação de <i>ACTN4</i>	58
Figura 9. Expressão relativa de <i>ARNTL</i> no conjunto total de amostras tumorais e não tumorais de rim detectadas na lâmina de TMA.....	61
Figura 10. Expressão relativa de <i>ARNTL</i> no subconjunto de 34 amostras pareadas tumor/não tumor provenientes do mesmo paciente, contidas na nossa lâmina de TMA.....	61
Figura 11. Curvas de sobrevida de pacientes com CCRcc em função do padrão de imunomarcação de <i>ARNTL</i>	63
Figura 12. Distribuição dos valores de positividade nas populações de pacientes CCRcc determinados pelo <i>X-tile</i>	65
Figura 13. Expressão relativa de <i>EPAS1</i> no conjunto total de amostras tumorais e não tumorais de rim detectadas na lâmina de TMA.....	67
Figura 14. Expressão relativa de <i>ARNTL</i> no subconjunto de 34 amostras pareadas tumor/não tumor provenientes do mesmo paciente, contidas na nossa lâmina de TMA.....	68
Figura 15. Curvas de sobrevida de pacientes com CCRcc em função do padrão de imunomarcação de <i>EPAS1</i>	69

Figura 16. Distribuição dos valores de positividade nas populações de pacientes CCRcc determinados pelo <i>X-tile</i>	71
Figura 17. Exemplos de padrões de imunomarcção de CASP7 obtidos nos experimentos de IHQ na lâmina de TMA (A-E)	74
Figura 18. Expressão de CASP7 no subconjunto de amostras pareadas tumorais e não tumorais de CCRcc detectadas na lâmina de TMA.....	75
Figura 19. Curvas de sobrevida de pacientes com CCRcc em função do padrão de imunomarcção de CASP7.....	78
Figura 20. Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes CCRcc com baixo/alto grau Fhurman ou estadio clínico, estratificados pela marcação com CASP7.....	80
Figura 21. Análise de Kaplan-Meier dos pacientes CCRcc que apresentaram ou não recorrência em até 5 anos após a cirurgia.	81
Figura 22. Imagens representativas dos experimentos de IHQ utilizando o anticorpo anti-CASP7 em amostras completas de CCRcc	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes escolhidos para validação.....	31
Tabela 2. Informações clínicas e patológicas dos pacientes com CCR cujas amostras foram analisadas nos experimentos de qPCR.	32
Tabela 3. Lista dos <i>primers</i> utilizados nos experimentos de PCR em Tempo Real.	37
Tabela 4. Informações epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas das amostras provenientes de pacientes com RCC, depositadas nas lâminas de TMA.	40
Tabela 5. Método de recuperação antigênica e padronização da diluição dos anticorpo.....	42
Tabela 6. Associação entre a variável de imunomarcção para ACTN4 e parâmetros clinicopatológicos em amostras de CCRcc presentes na lâmina de TMA.	57
Tabela 7. Análise univariada e multivariada para determinar associação entre a imunomarcção de ACTN4 e os parâmetros clinicopatológicos com a sobrevida câncer-específica de pacientes com CCRcc	59
Tabela 8. Análise univariada e multivariada para determinar associação entre a imunomarcção de ARNTL e os parâmetros clinicopatológicos com a sobrevida câncer-específica de pacientes com CCRcc	64
Tabela 9. Associação entre a variável de imunomarcção para ARNTL e parâmetros clinicopatológicos em amostras de CCRcc presentes na lâmina de TMA.	66
Tabela 10. Análise univariada e multivariada para determinar associação entre a imunomarcção de EPAS1 e os parâmetros clinicopatológicos com a sobrevida câncer-específica de pacientes com CCRcc	70
Tabela 11. Associação entre a variável de imunomarcção para EPAS1 e parâmetros clinicopatológicos em amostras de CCRcc presentes na lâmina de TMA.	72
Tabela 12. <i>Scores</i> visuais obtidos nas amostras de CCR determinado pela imunomarcção de CASP7.....	74
Tabela 13. Associação entre a variável de imunomarcção para CASP7 e parâmetros clinicopatológicos em amostras de CCRcc presentes na lâmina de TMA	77

Tabela 14. Análise univariada e multivariada para determinar associação entre a imunomarcagem de CASP7 e os parâmetros clinicopatológicos com a sobrevida câncer-específica de pacientes com CCRcc79

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTN4: Alfa-actinina 4

ARNTL: *Aryl-hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like*

CASP7: *Cysteine-aspartic acid protease 7 (CASPASE 7)*

CCR: Carcinoma de Célula Renal

CCRcc: Carcinoma de Célula Renal subtipo célula clara

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group performance status*

EPAS1: *Endothelial Pas Domain Protein-1*

EST: *Expressed Sequence Tag*

FDA: *Food and Drug Administration*

HE: Hematoxilina-Eosina

IHQ: Imunohistoquímica

INCA: Instituto Nacional do Câncer

KM: Kaplan-Meier

OMS: Organização Mundial de Saúde

pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da DNA Polimerase (*polymerase chain reaction*)

qPCR: PCR quantitativo em tempo real

TMA: *Tissue microarrays*

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	16
I.1. Carcinoma de células renais	16
I.2. Etiologia do CCR e fatores de risco	17
I.3. Diagnóstico dos tumores renais	18
I.4. Classificação dos subtipos histológicos de CCR	19
I.5. Fatores prognósticos clássicos do CCR	21
I.6. Tratamentos dos tumores renais	23
I.7. Marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico do câncer de rim	25
I.8. Pesquisa molecular utilizando microarranjos de tecido	27
II. OBJETIVOS.....	30
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
III.1. Seleção de genes diferencialmente expressos no CCR	31
III.2. Amostras Clínicas de Rim utilizadas nos experimentos de qPCR	31
III.3. Linhagens Celulares	33
III.4. Extração e purificação de RNA total	34
III.5. Avaliação do rendimento, pureza e integridade do RNA	35
III.6. Síntese de cDNA.....	35
III.7. PCR em tempo real: Análises e Estatística.....	36
III.8. Lâminas de <i>Tissue-MicroArrays</i> contendo amostras clínicas de rim.....	38
III.9. Lâminas contando arranjos de Tecido: Casuística.....	39
III.10. Detecção de proteínas em lâminas de TMA por imunohistoquímica	42
III.11. Análise visual das lâminas de TMA	43
III.12. Análise quantitativa automatizada utilizando o ACIS III.....	45
III.13. Análise quantitativa automatizada utilizando o APERIO	45
III.14. Determinação dos grupos de pacientes utilizando o programa <i>X-tile</i>	46
III.15. Análises estatísticas dos dados de imunomarcacão obtidos com TMAs.	46
IV. RESULTADOS.....	49
IV.1. Validação da expressão gênica de biomarcadores candidatos de CCR por PCR Tempo Real.	49
IV.2. Determinação da expressão dos biomarcadores candidatos de CCR em linhagens celulares de rim.	52
IV.3. Expressão dos biomarcadores candidatos em amostras de CCR por imunohistoquímica em microarranjos de tecido	54
IV.4. Caracterização do ACTN4 como marcador de prognóstico no CCR.....	55
IV.4.1. Determinação da expressão proteica de ACTN4 por imunohistoquímica.	55
IV.4.2. Associação da expressão de ACTN4 com variáveis clinicopatológicas nos pacientes com CCRcc.....	56
IV.4.3. Avaliação do valor prognóstico da imunomarcacão da proteína ACTN4 nos pacientes com CCRcc.	58
IV.5. Avaliação de ARNTL como marcador de prognóstico no CCR.....	60
IV.5.1. Determinação da expressão proteica de ARNTL por imunohistoquímica.	60
IV.5.2. Avaliação do valor prognóstico da proteína ARNTL nos pacientes com CCRcc.	62

IV.5.3. Associação da imunomarcção de ARNTL com variáveis clinicopatológicas nos pacientes com CCRcc	65
IV.6. Caracterização de EPAS1 como marcador de prognóstico no CCR.....	67
IV.6.1. Determinação da expressão proteica de EPAS1 por imunohistoquímica.....	67
IV.6.2. Avaliação do valor prognóstico da proteína EPAS1 nos pacientes com CCRcc.....	68
IV.5.3. Associação da expressão de EPAS1 com variáveis clinicopatológicas nos pacientes com CCRcc.....	71
IV.7. Caracterização de CASP7 como marcador de prognóstico no CCR.....	73
IV.7.1. Determinação da expressão proteica de CASP7 por imunohistoquímica.....	73
IV.7.2. Associação da expressão de CASP7 com variáveis clinicopatológicas nos pacientes com CCR	76
IV.7.3. Avaliação do valor prognóstico da proteína CASP7 nos pacientes com CCRcc.	78
V. DISCUSSÃO.....	84
V.1. Validação de candidatos a biomarcadores de CCR por qPCR.	84
V.2. Avaliação da expressão proteica dos biomarcadores candidatos em amostras de pacientes com CCR utilizando microarranjos de tecido.	88
V.2.1. ACTN4	93
V.2.2. ARNTL	96
V.2.3. EPAS1	98
V.2.4. CASP7	102
V.3. Considerações finais	105
VI. CONCLUSÃO	107
VII. REFERÊNCIAS.....	109
ANEXO I - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.	123
ANEXO II - Súmula Curricular	124
ANEXO III - Artigo Publicado	127

I. INTRODUÇÃO

O câncer representa um grande problema na saúde pública, não só nos países desenvolvidos, mas também nos países em vias de desenvolvimento. As mais recentes estimativas mundiais divulgadas pelo GLOBOCAN 2008 apontam que ocorreram 12,7 milhões de casos novos de câncer no mundo provocando 7,6 milhões de óbitos, onde 63% das mortes ocorreram em países em desenvolvimento (BOYLE; LEVIN, 2008; FERLAY *et al.*, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que para o ano 2030 podem ocorrer 27 milhões de casos de câncer causando 17 milhões de mortes (BOYLE; LEVIN, 2008). Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil as estimativas para o ano de 2012 válidas também para o ano de 2013, apontam que ocorrerão aproximadamente 520 mil novos casos de câncer no país (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2011).

I.1. Carcinoma de células renais

O termo Carcinoma de Célula Renal (CCR) designa as neoplasias parenquimatosas renais de origem epitelial com potencial maligno e que representam em media 90% de todas as neoplasias que ocorrem no rim de pessoas adultas (EBLE *et al.*, 2004; FERLAY *et al.*, 2010; RINI *et al.*, 2009). Aproximadamente 3% das mortes causadas pelo câncer são devido ao carcinoma de células renais (EBLE *et al.*, 2004; FERLAY *et al.*, 2010; RINI *et al.*, 2009). Entre as neoplasias urológicas é a terceira mais frequente, porém, é a primeira em mortalidade. O CCR é o sétimo câncer mais comum entre os pacientes de sexo masculino e o nono entre as mulheres, estimando-se uma incidência mundial de aproximadamente 209 mil novos casos de CCR por ano, ocasionando 102 mil mortes (EBLE *et al.*, 2004; RINI *et al.*, 2009). No Brasil, esta doença não se encontra entre os 10 tipos de câncer mais prevalentes e os dados epidemiológicos relativos ao CCR são escassos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2011; NARDI *et al.*, 2010). Registros regionais apresentam uma prevalência da

doença de aproximadamente 1,2%, com 2.760 casos novos somente na cidade de São Paulo (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2010; NARDI *et al.*, 2010). Embora a incidência seja baixa, a maior preocupação reside em que o prognóstico dos pacientes é diretamente relacionado ao estadio em que a doença é diagnosticada. Pacientes diagnosticados precocemente com a doença tem uma chance de sobrevida de 90% no período de cinco anos, mas a sobrevida diminui ao 20-30% com RCC avançado (KANE *et al.*, 2008; KOPPER; TIMAR, 2006; LANE, 2013). No mundo, cerca de 30% dos pacientes possuem metástase quando a doença é diagnosticada. Dos restantes, 30 a 50% dos pacientes irão desenvolver metástase no curso da doença, com uma taxa de sobrevida de até 10% em cinco anos (BANKS *et al.*, 2007; LANE, 2013). Diferente dos dados mundiais, no Brasil a incidência de pacientes que apresentaram metástase ao diagnóstico foi de 9,5% (NARDI *et al.*, 2010).

I.2. Etiologia do CCR e fatores de risco

O carcinoma renal tem uma prevalência duas vezes maior nos homens do que nas mulheres e as manifestações em geral são tardias, se apresentando aproximadamente na sexta a sétima década de vida (RINI *et al.*, 2009). Entre os principais fatores de risco estão o tabagismo, a hipertensão e obesidade, os quais predispõem os pacientes a contrair a doença de forma dose dependente (EBLE *et al.*, 2004; NAVAI; WOOD, 2012). No Brasil é observada uma prevalência de 46% dos pacientes com hipertensão e 18% dos pacientes com obesidade (NARDI *et al.*, 2010). O tabagismo continua sendo a principal causa do surgimento da doença no mundo, presente em aproximadamente 39% dos pacientes homens com CCR esporádico (EBLE *et al.*, 2004). A preocupação não apenas reside na sua alta correlação dose dependente, mas também no aumento de risco da doença em fumantes passivos (NAVAI; WOOD, 2012; RINI *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm demonstrado que fatores ocupacionais associados à exposição industrial a determinados compostos (arsênico, pesticidas e benzeno) também tem influencia

no surgimento do CCR (EBLE *et al.*, 2004; NAVAÍ; WOOD, 2012). A associação com um risco moderado de contrair a doença também foi observado na exposição a substâncias tais como ácidos inorgânicos, ozônio, combustível aeronáutico e luz ultravioleta (NAVAÍ; WOOD, 2012).

Aproximadamente 95% dos tumores renais são de origem esporádica. Fatores genéticos hereditários e familiares que predis põem ao surgimento da neoplasia renal estão presentes em apenas 4% dos tumores renais, existindo várias síndromes associadas à predisposição do tumor tais como a doença autossômica dominante de von Hippel-Lindau, produto da alteração no gene VHL (EBLE *et al.*, 2004; LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2009). O VHL é um importante gene supressor de tumor cuja inativação por mutação ou deleção, provoca o ganho do fenótipo tumoral. Aproximadamente 90% dos tumores esporádicos apresentam inativação em um dos alelos deste gene (conhecido como perda de heterozigose), devida à deleção da região cromossômica 3p (RINI *et al.*, 2009). O segundo alelo de VHL posteriormente pode ser inativado em um segundo evento de mutação (presente em 50% dos casos de CCR) ou silenciado por metilação (5-10% dos casos) (RINI *et al.*, 2009).

I.3. Diagnóstico dos tumores renais

Nos estadios iniciais, a doença é assintomática e não apresenta manifestações clínicas até atingir um estadio avançado (KOPPER; TIMAR, 2006). Hematúria, dor na região lombar e crescimento de uma massa palpável no flanco constituem a clássica tríades de sintomas e estão associados negativamente ao prognóstico dos pacientes (EBLE *et al.*, 2004; RINI *et al.*, 2009). Infelizmente, muitas vezes estes sinais são ignorados ou confundidos pelo paciente com sintomas de doenças não relacionadas ao câncer. Aproximadamente 40% dos pacientes mostram ausência destes sinais, apresentando sintomas sistêmicos como perda de peso, dor abdominal, anorexia e febre (EBLE *et al.*, 2004). Atualmente a tríade clássica raramente é observada como diagnóstico. No Brasil, estudos epidemiológicos mostraram que apenas 4,5%

dos pacientes foram diagnosticados utilizando estes sinais (NARDI *et al.*, 2010). O incremento no uso da tomografia computadorizada, imagem por ressonância magnética e ultrassonografia abdominal têm contribuído enormemente no diagnóstico incidental e precoce da doença (EBLE *et al.*, 2004; KANE *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2002; NARDI *et al.*, 2010). Hoje é possível diagnosticar entre 40-60% dos tumores incidentalmente, o que vem favorecendo o aumento da sobrevida câncer-específica dos pacientes comparados aos tumores não diagnosticados incidentalmente (FICARRA *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2002). Lamentavelmente a incidência do câncer renal tem apresentado um aumento de 2% ao ano e embora um número de casos seja detectado incidentalmente, a mortalidade por causa do RCC tem aumentado, assim como o número de pacientes com tumores avançados e metastáticos ao diagnóstico (GARCIA; RINI, 2007; KANE *et al.*, 2008; RINI *et al.*, 2009). Além disso, até o momento não existem exames laboratoriais que identifiquem marcadores moleculares relacionados com a presença de câncer de rim.

I.4. Classificação dos subtipos histológicos de CCR

O CCR se apresenta como uma doença heterogênea, associada com diferentes alterações moleculares e variados padrões histológicos e clínicos (JONASCH *et al.*, 2012). Usualmente, se classifica o carcinoma de células renais com referência as características histológicas dos diferentes subtipos (área de continuo estudo e de rápido crescimento) observando-se novas categorias desde as primeiras descrições de Heidelberg (KOVACS *et al.*, 1997). A classificação da Organização Mundial de Saúde de 2004 utilizada neste trabalho (EBLE *et al.*, 2004) encontrasse baseada nas alterações clínico-patológicas e genéticas dos tumores (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2006). Atualmente é possível encontrar modificações na classificação da OMS de 2004, onde foram incluídas novas entidades e variantes morfológicas de tumores renais recentemente descritos, constituindo assim novas categorias (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2009).

O RCC do subtipo célula clara (CCRcc), corresponde ao subtipo histológico mais agressivo e de maior prevalência, constituindo aproximadamente 70 a 80% dos casos de CCR (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2009; LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2006; RINI *et al.*, 2009). Em seguida se encontram o CCR papilar (~10 a 15%), CCR de células cromóforas (entre 3 a 5%), CCR dos ductos coletores (~1%); além de outros subtipos de carcinomas renais menos frequentes, mas que apresentam características distintivas, patológicas, clínicas e moleculares (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2009; LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2006; RINI *et al.*, 2009). No Brasil, aproximadamente 75% dos casos diagnosticados com CCR pertencem ao subtipo de célula clara (NARDI *et al.*, 2010).

Qualquer dos subtipos histológicos pode sofrer alterações e apresentar elementos sarcomatóides, com grande atividade proliferativa e malignidade superior a qualquer dos outros subtipos histológicos, assim como uma alta prevalência de ocorrer metástase (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2009). Não existem evidências que as transformações sarcomatóides tenham a sua origem “de novo”, portanto na classificação da OMS 2004 não é considerada como uma entidade própria e sim apenas como uma progressão da tumorigênese (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2009).

As classificações do tumor em subtipos histológicos constituem uma importante ferramenta para rápida avaliação do prognóstico dos pacientes (LANE, 2013). Contudo, tumores com histologias similares ou aparentemente idênticas, podem apresentar prognósticos diferentes ou responder de formas diversas quando aplicadas as mesmas terapias, como consequências de diferenças ao nível molecular próprias de cada tumor. Diferentes grupos têm reportado na literatura estudos de pacientes com CCR, onde tumores pertencentes ao mesmo subtipo histológico apresentam diferenças na evolução clínica, que podem ser associadas às diferenças ao nível gênico como expressão, presença de mutações, deleções, SNPs, entre outros, e sugerido a necessidade de novas classificações ou reformulação dos

subtipos histológicos atualmente em uso (HAKIMI *et al.*, 2013; PENA-LLOPIS *et al.*, 2012; SATO *et al.*, 2013; 2013).

I.5. Fatores prognósticos clássicos do CCR

O CCR compreende um conjunto de neoplasias heterogêneas e de involução incerta. A identificação correta dos fatores prognósticos é essencial para que todos os pacientes recebam uma terapia apropriada para o seu caso particular. Há décadas, parâmetros anatômicos, clínicos e histológicos continuam sendo amplamente estudados e utilizados na prática clínica (LANE, 2013; VOLPE; PATARD, 2010).

Um dos parâmetros morfológicos patológicos que apresenta melhores resultados e por tanto, corresponde a uma das variáveis mais utilizadas como fator prognóstico, é o grau TNM (FICARRA *et al.*, 2007). A classificação se baseia na observação do estadió patológico que compõe o tamanho tumoral (T: 0-4), a invasão dos linfonodos (N: 0-2) e pela presença ou não de metástase (M: 0-2) (SOBIN; WITTEKIND, 2002). A posterior combinação dos valores TMN é ordenada em quatro estádios patológicos (G: 1-4), onde estádios clínicos I e II são considerados como tumores localizados, enquanto que os estádios III e IV correspondem a tumores localmente avançados ou metastáticos. Pacientes com estádios clínicos baixos possuem melhor prognóstico comparados a pacientes com estádios clínicos avançados (FICARRA; SCHIPS; *et al.*, 2005; FRANK *et al.*, 2005). Contudo, estudos multi-institucionais demonstraram que o parâmetro TNM tem valor prognóstico apenas para tumores localizados e do subtipo histológico CCRcc (FICARRA; SCHIPS; *et al.*, 2005). A classificação TNM vem sendo continuamente estudada e revisada independentemente por vários grupos e centros, os quais incorporam nos seus estudos clínicos as novas evidências, assim como também propõem modificações da classificação atual, a fim de se achar uma estratificação prognóstica ótima para os pacientes com CCR (DELAHUNT, 2009; FICARRA *et al.*, 2007; LAM *et al.*, 2005). A classificação dos tumores empregada durante este trabalho

corresponde ao sistema TNM proposto pela União Internacional Contra o Câncer AJCC/UICC em 2002 (SOBIN; WITTEKIND, 2002). Atualmente a AJCC/UICC tem realizados algumas modificações que foram publicadas na sétima edição da classificação TNM, onde validações independentes tem demonstrado que os pontos críticos questionados nas versões anteriores ainda não foram resolvidos com utilizando à nova classificação (NOVARA *et al.*, 2010).

Um segundo parâmetro, conhecido como o grau nuclear ou grau Fuhrman, também é amplamente utilizado por se mostrar com valor preditivo na sobrevida câncer-específica independentemente do estadio patológico (ERDOGAN *et al.*, 2004; FICARRA; MARTIGNONI; *et al.*, 2005; SUN *et al.*, 2009). A classificação histológica é realizada pela inspeção no microscópio e os pacientes são divididos em quatro grupos definidos pelo grau de diferenciação das células tumorais. Graus nucleares de Fuhrman avançados (G: 3 ou 4) são classificados como de pior prognóstico comparado aos graus nucleares de Fuhrman 1 e 2. Dentre as principais críticas na determinação do grau nuclear de Fuhrman, encontra-se a simplificação dos grupos de pacientes em apenas duas ou três categorias de riscos, perdendo as vantagens para determinação das sobrevidas câncer-específicas utilizando pontos de cortes numa distribuição continua de riscos (FICARRA; MARTIGNONI; *et al.*, 2005). Além disso, o grau de Fuhrman pode ser aplicado unicamente nos pacientes com CCRcc, e alguns grupos tem mostrado que este parâmetro perde significância em análises multivariadas quando comparada a outras variáveis anatomopatológicas (DELAHUNT, 2009; SUN *et al.*, 2009).

Infelizmente, nenhum destes fatores ainda é capaz de prever com total segurança a evolução da doença. Tumores classificados com sendo do mesmo estadio clínico, subtipo histológico ou grau de Fuhrman, muitas vezes podem apresentam evoluções distintas (VOLPE; PATARD, 2010). Vários autores tem proposto a utilização de sistemas integrados de estadiamento utilizando modelos matemáticos ou instrumentos gráficos de cálculo

(monogramas) utilizados vários dos parâmetros anatômicos, histológicos e clínicos/patológicos com valor prognósticos independentes, a fim de determinar uma melhor classificação dos pacientes com CCR com resultados promissores, inclusive não se restringindo apenas ao subtipo histológico mais convencionais (DALL'OGGIO *et al.*, 2007; FRANK *et al.*, 2002; KARAKIEWICZ *et al.*, 2007; KATTAN *et al.*, 2001; LJUNGBERG, 2010; SORBELLINI *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2007).

Por fim, a forma de apresentação do tumor no diagnóstico tais como, a detecção incidental, o tamanho, a presença de metástase e inclusive parâmetros como o status do paciente também constituem importantes fatores prognósticos independentes que afetam a sobrevida dos pacientes com CCR (BEDKE *et al.*, 2008; KARAKIEWICZ *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2002; MOTZER *et al.*, 1999; ZISMAN *et al.*, 2001).

I.6. Tratamentos dos tumores renais

A opção de tratamento depende do estadio da doença. Sem embargo, a remoção cirúrgica do tumor continua sendo o tratamento primário da doença, inclusive em pacientes que apresentam metástases ao diagnóstico (COHEN; MCGOVERN, 2005; RINI *et al.*, 2009). A nefrectomia parcial é realizada em pacientes que apresentam tumores pequenos (< 4cm de diâmetro), onde apenas a remoção cirúrgica do tumor permite preservar parcialmente o parênquima renal, tentando evitar o aparecimento de complicações pós-cirúrgicas tais como a insuficiência renal crônica. A nefrectomia radical (remoção completa do rim) usualmente é realizada em pacientes com tumores avançados, determinados pelo tamanho, localização do tumor no rim, o estadio TNM assim como outras considerações anatómicas.

Técnicas modernas de nefrectomia por laparoscopia têm sido utilizadas favoravelmente a través de uma intervenção menos invasiva, acompanhada de um menor tempo de hospitalização e uma recuperação pós-operatória mais rápida dos pacientes (COHEN; MCGOVERN, 2005). Outros procedimentos poupadores de néfrons, principalmente a

crioterapia e radiofrequência, foram incorporados no tratamento, embora ainda não fossem observados resultados completamente efetivos para tratamentos ao longo prazo existindo uma alta taxa de recorrência do tumor (COHEN; MCGOVERN, 2005; RINI *et al.*, 2009).

Nefrectomias praticadas em pacientes que se encontram nos estádios clínicos I e II tem uma grande taxa de sucesso e muitas vezes os pacientes são considerados totalmente curados. Mas, estas terapias apenas são consideradas apenas como paliativas quando se trata de pacientes com CCR que apresentam metástase à distância. Além disso, os CCRs avançados e metastáticos se apresentam notavelmente resistentes aos tratamentos quimioterápicos convencionais, respondendo de forma invariável tornando a doença numa condição incurável (COSTA; DRABKIN, 2007; MILOWSKY; NANUS, 2003).

A radioterapia e quimioterapia também vêm se mostrando ineficazes e as imunoterapias não tem produzido respostas longas e superiores a 20%. A utilização de interleucina-2 e/ou interferon-alfa atualmente constituem os tratamentos quimioterápicos convencionais utilizados em pacientes com metástase (GARCIA; RINI, 2007; RINI *et al.*, 2009). Embora estes agentes venham sendo utilizando por mais de 20 anos, a suas eficácias continuam sendo controversias, ocasionalmente resultando na regressão espontânea do tumor e a completa eliminação da metástase (COHEN; MCGOVERN, 2005; GARCIA; RINI, 2007; RINI *et al.*, 2009).

Por fim, o atual conhecimento das vias envolvidas na biologia do CCR, tem permitido o desenvolvimento de novas drogas cujos alvos são aqueles genes que se encontram diferencialmente expressos no tumor renal. Vários anticorpos monoclonais e drogas que bloqueiam as vias desreguladas no CCR já estão sendo testadas em diversos ensaios clínicos, com alguns resultados alentadores (GARCIA; RINI, 2007; JONASCH *et al.*, 2012; RINI, 2010; SINGER *et al.*, 2011). Por exemplo, o FDA (*Food and Drug Administration*) órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle de novos medicamentos, tem

aprovado pelo menos seis agentes que tem como alvo direto a expressão aberrante do gene *VEGF* ou as vias de sinalização reguladas pela proteína mTOR (SINGER *et al.*, 2011).

I.7. Marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico do câncer de rim

A descoberta de novos marcadores de prognóstico que auxiliem na determinação dos riscos individuais decorrentes da presença de câncer, pode favorecer na melhor escolha do melhor tipo de tratamento a ser aplicado nos pacientes com CCR (LANE, 2013). As tradicionais classificações morfológicas utilizando os marcadores prognósticos robustos e independentes tais como: subtipo histológico, estadió clínico (incluindo o estadió TNM), grau Fuhrman e a presença de metástase ao diagnóstico, continuam sendo as variáveis clínicas e anatomopatológicas mais utilizadas pelos oncologistas como ferramentas para o aconselhamento clínico e determinação de prognósticos nos pacientes com CCR (FICARRA; MARTIGNONI; *et al.*, 2005; FICARRA; SCHIPS; *et al.*, 2005; LANE, 2013). Mas, ainda persistem algumas incertezas na definição dos riscos associados às classificações tradicionais, principalmente quando são observados pacientes que correspondem aos mesmos grupos de riscos respondendo de maneiras diferentes aos tratamentos ou apresentando prognósticos diferentes (BRANNON; RATHMELL, 2010).

Estudos realizados na área de pesquisa de biomarcadores no CCR têm demonstrado como a utilização destas variáveis pode contribuir para a determinação mais acurada dos riscos associados à doença (RILEY *et al.*, 2009; SRIGLEY *et al.*, 1997; VOLPE; PATARD, 2010). Foi também observado como a combinação de vários marcadores moleculares permite identificar diferentes grupos de riscos nos pacientes com CCR inclusive com maior valor prognóstico comparada as variáveis anatomopatológicas clássicas (KIM, H. L. *et al.*, 2004; KLATTE *et al.*, 2009; LANE, 2013). Para isto, é fundamental que os candidatos a novos biomarcadores se mostrem clinicamente relevantes, apresentem correlações com as outras

variáveis associadas à sobrevida e constituam parâmetros significativamente independentes em modelos multivariados de regressão (RILEY *et al.*, 2009; SRIGLEY *et al.*, 1997).

A utilização das plataformas de microarranjos de DNA tem contribuído enormemente com a identificação de genes diferencialmente expressos em CCR, fornecendo assim novas pistas sobre as alterações moleculares associadas à malignidade da transformação do tecido renal, além de documentar grandes quantidades de potencialmente novos biomarcadores de diagnóstico, prognóstico ou alvos de importância terapêutica (BOER *et al.*, 2001; HIROTA *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2005; LIOU *et al.*, 2004; SKUBITZ; SKUBITZ, 2002; SKUBITZ *et al.*, 2006; TAKAHASHI, M. *et al.*, 2001). Em 2008, o nosso laboratório comparou perfis de expressão gênica de amostras provenientes de pacientes com CCR, em especial do subtipo célula clara, utilizando uma plataforma de microarranjos de DNA com 4 mil elementos (BRITO *et al.*, 2008). A análise realizada com 12 amostras pareadas de carcinoma de célula renal (6 amostras do tipo CCRcc e 6 amostras de outros subtipos histológicos) conduziu à identificação de um conjunto de 64 genes diferencialmente expressos em CCRcc em comparação a de tecido adjacente histologicamente normal (BRITO *et al.*, 2008). Vinte e cinco dos transcritos identificados se apresentaram também diferencialmente expressos em outros subtipos histológicos do CCR, independentemente do estado de diferenciação do tumor ou subtipo histológico, constituindo possíveis marcadores moleculares para diagnóstico e prognóstico em câncer de rim.

Apesar de existir na literatura um grande volume de informação acerca dos genes diferencialmente expressos, é possível observar pouca sobreposição entre os resultados, devida principalmente à própria heterogeneidade do tumor. Além disso, muitos destes estudos ainda precisam ser confirmados em experimentos de validação não apenas ao nível de expressão gênica, como também avaliação da expressão proteica utilizando conjuntos independentes de amostras (BRANNON; RATHMELL, 2010).

Entre os principais marcadores genéticos e moleculares de prognóstico ou diagnóstico já estudados nos pacientes com RCC, destacam-se aqueles relacionados à proliferação celular (Ki-67, MIB-1), ao controle do ciclo celular (p53, Akt, Bcl-2, PTEN, p27, p21), adesão celular (E-caderina, EpCAM, caderina-6), hipóxia (CA-IX, HIF, VEGF) e além de vimentina, CD 44, gelsolina e VEGFR (GODLEY; KIM, 2002; LAM *et al.*, 2005). Mas, até agora nenhum desses candidatos teve seu potencial uso aplicado na rotina clínica (SRIGLEY *et al.*, 1997). Além disso, a baixa prevalência dos marcadores moleculares já identificados sugere a existência de conjuntos de genes ainda não descritos como alterados em CCR. Nesse contexto, é imperativa a identificação de novos genes com expressão alterada em CCR que possam ser confirmados em diferentes conjuntos de amostras, constituindo assim em potenciais novos marcadores de malignidade (JONES; LIBERMANN, 2007).

I.8. Pesquisa molecular utilizando microarranjos de tecido

Por mais de um século, as amostras de tecido vem sendo preservadas em formalina e embebidas em parafina, para sua posterior inspeção por microscópica após dissecação com micrótomo (CAMP *et al.*, 2000). Devido a sua simples preparação, fácil estocagem e manutenção das estruturas teciduais por longos períodos de tempo, esta metodologia se há convertido numa ferramenta padrão importante na histologia. Com o posterior surgimento das marcações cromogênicas utilizando anticorpos específicos e a sua fácil aplicação nas lâminas geradas a partir das amostras embebidas em parafina, transformou rapidamente as técnicas de imunohistoquímica (IHQ) em importantes ferramentas para pesquisa e diagnóstico na anatomia patológica (RIMM, 2006). Isto permitiu uma rápida evolução das pesquisas na área de biomarcadores moleculares de diagnóstico ou prognóstico nos pacientes com câncer. A disponibilidade de utilizar as numerosas coleções de tecidos arquivados em blocos parafina tem permitido aos pesquisadores contar com centenas de seções histológicas para a realização de experimentos de IHQ utilizando anticorpos específicos anti-antígenos de interesse.

O surgimento da tecnologia que permite utilizar arranjos de tecidos (*tissue microarrays* – TMA) depositados em apenas uma única lâmina de microscópio, foi descrita pela primeira vez em 1987 (WAN *et al.*, 1987). Embora implementadas somente 10 anos após a geração dos dispositivos que permitiram obter reprodutivamente lâminas de boa qualidade (KONONEN *et al.*, 1998), a metodologia do TMA tem beneficiado enormemente na habilidade de se estudar centenas de amostras de tecido ao mesmo tempo (CAMP *et al.*, 2008). A técnica de TMA tem facilitado notavelmente processos extremamente laboriosos e às vezes tediosos tais como, a manipulação de um grande volume de lâminas que costumavam demorar semanas para completar os experimentos de IHQ, junto à inspeção posterior dos resultados de todas as amostras onde o patologista devia examinar individualmente as lâminas a fim de identificar somente as regiões correspondentes ao tumor e assim determinar os valores de imunomarcção correspondentes. Além disso, o TMA permite manipular simultaneamente todas as amostras em paralelo e de forma homogênea sob as mesmas condições, com uma simples preparação de anticorpo. As tecnologias de TMA permitem também confeccionar arranjos contendo coleções de amostras provenientes de vários tipos de tecidos tumorais e não tumorais ou de pacientes com diversos estádios clínicos do mesmo tumor, permitindo obter dados em paralelo de um grande número de amostras, e assim estabelecer a importância do candidato com valor diagnóstico, prognóstico ou terapêutico. Finalmente, também é possível analisar múltiplos marcadores genéticos e/ou proteicos na mesma amostra tecidual, com uma grande economia de matérias (amostras de tecido) e reagentes, através da coloração rotineira com hematoxilina-Eosina (HE), até ensaios de IHQ, hibridização *in situ* ou imunofluorescência (CAMP *et al.*, 2008; SCHRAML *et al.*, 1999).

Para confecção dos TMAs, primeiramente são recuperados os blocos de parafina a serem utilizados junto com as suas lâminas correspondentes coradas com HE. As lâminas são analisadas no microscópio para demarcação das áreas mais representativas do tumor.

Fragmentos cilindros contendo o tecido neoplásico, correspondentes as áreas demarcadas anteriormente, são coletados do bloco de parafina “doador” e transferidos para um único “bloco receptor”, podendo receber até 1000 amostras diferentes ou amostras em duplicata, obtidas de secções a diferentes profundidades dos blocos doadores. Posteriormente, o bloco receptor pode ser seccionado múltiplas vezes e dependendo da espessura do tecido original, é possível obter entre 200 a 300 lâminas de 3 a 5µm cada (KONONEN *et al.*, 1998; SCHRAMML *et al.*, 1999). Potencialmente, os blocos de parafina que contem tumores com diâmetros de pelo menos 10mm, podem ser utilizados em até dez mil análises diferentes, demonstrando a grande versatilidade que da técnica de TMA (SCHRAMML *et al.*, 1999).

Interrogar a expressão proteica utilizando a técnica de IHQ em larga escala em amostras parafinadas usando lâminas de TMA se converteu no passo lógico a seguir após a identificação e validação de genes candidatos como diferencialmente expressos, dado que esta metodologia permite acesso a um grande número de amostras com seguimento clínico conhecido e é facilmente transponível para a rotina de um laboratório de patologia molecular (LANE, 2013). Entre as vantagens de se procurar por novos biomarcadores utilizando lâminas de TMA estão, o tratamento homogêneo de todas as amostras em paralelo e a rápida avaliação de centenas de amostras contidas em uma única lâmina sem demandar um consumo de tempo elevado comparado a utilização de cortes provenientes do fragmento inteiro da peça tumoral. Além disso, durante a construção dos TMAs, o próprio patologista realiza uma prevalidação das amostras ao selecionando somente as áreas mais representativas do tumor que serão incluídas no bloco receptor (CAMP *et al.*, 2008). Por fim, depois de realizados os experimentos de IHQ nas lâminas de TMA, o potencia biomarcador pode rapidamente ser avaliado a fim de identificar quais *scores* de imunomarcação detectados pela inspeção visual ou utilizando métodos modernos de quantificação automatizada, permite determinar grupos de pacientes com prognósticos diferentes.

II. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi investigar o potencial marcador prognóstico de evolução clínica no câncer de rim de um conjunto de genes diferencialmente expressos no carcinoma de células renais, selecionado a partir de um estudo de expressão gênica em larga-escala previamente executado em nosso laboratório (BRITO *et al.*, 2008).

Para alcançar tal meta, os objetivos específicos são:

- Selecionar candidatos e validar a sua expressão diferencial em CCR através de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) em um conjunto independente de amostras de tecido de câncer de rim e tecido adjacente histologicamente não tumoral, assim como em linhagens celulares com diferentes graus de malignidade;
- Para os transcritos validados por qPCR, verificar a abundância relativa das respectivas proteínas em amostras clínicas de pacientes com câncer de rim através de experimentos de imunohistoquímica em lâminas de *tissue-microarrays*;
- Realizar análises estatísticas para correlacionar o nível de expressão das proteínas candidatas com parâmetros clinicopatológicos e avaliar o seu potencial prognóstico.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1. Seleção de genes diferencialmente expressos no CCR

A escolha dos genes para o desenvolvimento deste projeto obedeceu aos seguintes critérios: i) expressão alterada nos experimentos com microarranjos de DNA realizado em nosso laboratório (BRITO *et al.*, 2008); ii) possível participação em processos celulares envolvidos na patogênese e/ou progressão de tumores. Na Tabela 1 são apresentados os 9 genes selecionados e uma breve descrição da função celular exercida pela proteína codificada no *locus* gênico correspondente.

Tabela 1. Genes escolhidos para validação. Na tabela observam-se os genes selecionados para validação e as respectivas razões de expressão (log2) médias em amostras clínicas de CCR (T) relativamente ao tecido adjacente histologicamente normal pareado (N). Dados obtidos de (BRITO *et al.*, 2008).

<i>Locus</i>	<i>log2(T/N)</i>	<i>Descrição</i>
<i>ARNTL</i>	1,1	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i>
<i>CASP7</i>	-1,3	<i>Caspase 7</i>
<i>ACTN4</i>	-1,7	<i>Actinin alpha 4</i>
<i>VRK2</i>	-1,9	<i>Vaccinia related kinase 2</i>
<i>EPAS1</i>	-2,1	<i>Endothelial PAS domain protein 1</i>
<i>UQCRH</i>	-2,2	<i>Ubiquinol cytochrome c reductase hinge protein</i>
<i>CTSB</i>	-2,3	<i>Cathepsin B</i>
<i>MAP3K7IP1</i>	-2,4	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1</i>
<i>PRKAG1</i>	-2,8	<i>AMPK-gamma1</i>

III.2. Amostras Clínicas de Rim utilizadas nos experimentos de qPCR

O conjunto independente de amostras pareadas de tecido tumoral e não tumoral proveniente dos mesmos pacientes utilizados neste projeto correspondem a pacientes atendidos no Hospital do Instituto Nacional de Câncer - INCA, RJ, no serviço de Urologia, sob a chefia do Dr. Franz Campos. As amostras foram obtidas com consentimento informado dos pacientes e a sua utilização neste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética da Instituição colaboradora.

As amostras de tecido foram congeladas entre 5 e 10 minutos após a ressecção cirúrgica, sendo conservadas em nitrogênio líquido nos respectivos bancos de tecidos frescos. Quando necessário, as amostras tumorais foram submetidas à macrodissecção ainda congeladas, para remoção do tecido não tumoral adjacente e garantir que no mínimo 80% da peça contivesse tecido tumoral. Todas as amostras analisadas possuem um relatório anatomopatológico associado onde foi identificado o subtipo histológico. As informações clínicopatológicas disponíveis relativas às amostras estão apresentadas na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Informações clínicas e patológicas dos pacientes com CCR cujas amostras foram analisadas nos experimentos de qPCR.

Paciente N°	Gênero	Idade na data da Cirurgia	Tipo Histológico	Tumor (cm)	Grau Nuclear Fuhrman	T	N	M
17	M	44	Papilífero	4.2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
18	F	48	Papilífero	17	II	n.d.	X	n.d.
27	F	47	Cromófoba	7.2	II	n.d.	n.d.	n.d.
23	n.d.	n.d.	Sarcomatoide	8,5	n.d.	n.d.	0	0
45	n.d.	n.d.	Sarcomatoide	2,5	n.d.	T1	X	0
1	M	51	Célula Clara	18	III	3c	n.d.	n.d.
3	F	78	Célula Clara	6	IV	3c	n.d.	1
7	M	53	Célula Clara	8	III	2	1	1
8	F	71	Célula Clara	5	II	3a	n.d.	n.d.
9	M	39	Célula Clara	8	II	3a	0	n.d.
11	M	51	Célula Clara	7	III	1b	n.d.	n.d.
15	F	78	Célula Clara	10	IV	3	2	0
24	M	75	Célula Clara	15	IV	2	n.d.	n.d.
26	F	40	Célula Clara	7	II	3b	n.d.	n.d.
28	M	51	Célula Clara	5	III	1	n.d.	n.d.
29	M	75	Célula Clara	20	IV	3a	n.d.	1
30	F	51	Célula Clara	8.5	II	2	n.d.	n.d.

Paciente N°	Gênero	Idade na data da Cirurgia	Tipo Histológico	Tumor (cm)	Grau Nuclear Fuhrman	T	N	M
32	F	63	Célula Clara	13	II	2	n.d.	1
36	M	n.d.	Célula Clara	11	III	nd	nd	nd

n.d.: informação não disponível.

III.3. Linhagens Celulares

Foram utilizadas durante este trabalho quatro linhagens celulares imortalizadas de tecido renal para determinação da expressão gênica dos genes candidatos, em modelos celulares in vitro.

- Célula RC-142, linhagem celular derivada de tecido renal não tumoral (http://www.cell-lines-service.de/content/e143/e184/e1518/index_eng.html) Cell Lines Service – CLS, Alemanha.
- Células 769-P, linhagem de adenocarcinoma de rim do subtipo célula clara, (número ATCC®: CRL-1932™).
- Célula 786-O, linhagem de adenocarcinoma de rim do subtipo célula clara, (número ATCC®: CRL-1932™).
- Célula CAKI-1, linhagem celular metastática de pele derivada de um tumor primário de adenocarcinoma de rim, subtipo célula clara (número ATCC®: HTB-46™).

O meio básico utilizado para as linhagens 769-P e 786-O foi o RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) e para as linhagens celulares CAKI-1 e RC-124 foi utilizado o meio de cultura McCoy's 5a. Todos os meios de cultura foram suplementados com soro fetal bovino na concentração final de 10% (vol/vol) 4,5g/L de glicose, 1mM de piruvato de sódio, 1,5g/L de bicarbonato de sódio e antibióticos estreptomicina (100µg/mL) e penicilina (100U/mL). As linhagens celulares foram mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera de 95% de ar e 5% de dióxido carbono. Para a propagação das linhagens em cultura, as células foram repicadas quando atingiram 90% de confluência. Primeiramente foram lavadas duas

vezes com solução salina PBS estéril (*Phosphate Buffered Saline*, NaCl 140mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,5mM; pH 7,2) e subcultivadas com solução de tripsina/EDTA (2,5g/L) (Vitrocell). Os estoques celulares foram mantidos em reservatórios contendo nitrogênio líquido, nos respectivos meios de cultivo com adição da solução crioprotetora DMSO 10% (vol/vol) estéril.

III.4. Extração e purificação de RNA total

Para extração do RNA total das amostras de tecido renal tumoral/não tumoral, assim como também das linhagens celulares de rim, foi utilizado o método do tiocianato de guanidina fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). A solução monofásica do reagente comercial TRIzol® (Invitrogen) empregou-se seguindo as especificações fornecidas no protocolo do fabricante. As amostras de tecido renal congeladas em nitrogênio líquido, inicialmente foram pulverizadas em um almofariz até obtenção de um fino pó. O reagente TRIzol® foi adicionado na sequência seguindo a proporção de 1ml para cada 50mg de tecido. Para as linhagens celulares de rim coletadas das placas de cultura, foi adicionado 1ml de TRIzol® para cada 10⁷ células.

Após extração do RNA total, foi realizada a purificação em coluna de afinidade utilizando o KIT *RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare), seguindo as indicações fornecidas pelo fabricante. Para garantir a ausência de DNA genômico contaminante, foi incluindo um passo de tratamento com DNase I (GE Healthcare) por 30min, fornecido pelo próprio KIT de purificação. Finalmente as amostras foram eluídas em água DEPC (livre de RNases) e armazenadas a -80°C.

A ausência de DNA genômico copurificado nas amostras de RNA foi verificada pela ausência de amplificação em reação de PCR (40 ciclos) contendo 1µg de RNA total (sem transcrição reversa) utilizando um par de *primers* que amplificam o gene TUB (Tabela 3). O *kit* utilizando foi *GoTak® DNA Polymerase* (Promega) seguindo as especificações do

fabricante. Como controle positivo foi realizada a amplificação por PCR, em paralelo e utilizando o mesmo mix da reação, de uma amostra contendo 1µg de DNA genômico. Um controle negativo (reação sem amostra) foi realizado para verificação da ausência de contaminação com DNA nos reagentes. Os produtos da reação foram separados em um gel de agarose 1% em TAE e corados com brometo de etídio 0,5µg/mL.

III.5. Avaliação do rendimento, pureza e integridade do RNA

Para quantificação e avaliação da pureza do RNA total isolado, foi utilizado um espectrofotômetro de alta sensibilidade *NanoDrop-1000* (Thermo Scientific). A quantificação de RNA foi realizada pela medida da absorbância a 260nm. Proteínas e resíduos de fenol tem um pico de absorção no comprimento de onda de 280nm, enquanto contaminantes diversos (carboidratos, isotiocionato de guanidina, glicogênio) absorvem a 230nm. As amostras que apresentaram razões 260/280 e 230/260 próximas a “2” foram consideradas com um grau de pureza elevado, livres da presença de proteínas e contaminantes.

A integridade do RNA total foi avaliado utilizando o equipamento *2100 BioAnalyser* (Agilent Technologies). O aparelho realiza uma eletroforese capilar separando as moléculas de RNA em função do tamanho. A partir da abundância relativa e o padrão de degradação de diferentes espécies de rRNA (28S, 18S, 45S e 5S) o programa do instrumento atribui um valor de RIN (*RNA integrity number*) para a amostra de RNA. O valor de RIN pode variar de 0, para RNAs totalmente degradados, a 10, para RNAs de boa qualidade (SCHROEDER *et al.*, 2006). Amostras provenientes de tecido renal que apresentaram um valor de RIN menor que 7,5 e amostras de linhagens celulares com valores de RIN menor que 9,0 foram descartadas.

III.6. Síntese de cDNA

A transcrição reversa para síntese do cDNA foi realizada utilizando 1µg de RNA total, *primers* de oligonucleotídeos poli(dT)₃₀ na concentração de 100µM, a enzima e o tampão do

KIT *ImProm-II™ Reverse Transcription* (Promega). As condições da reação foram modificadas para melhorar a síntese do cDNA evitando ao máximo a transcrição reversa iniciada a partir de autoanelamento de RNAs com estrutura secundária. Para isto, foi realizada a desnaturação do RNA pela incubação a 85°C por 3 minutos seguida de 70°C por 5 minutos. Imediatamente depois, foi feita a síntese do cDNA a 50°C por uma hora, adicionando o *mix* que contem a enzima transcriptase reversa preaquecida por 5min a 50°C. A reação é finalizada com a inativação da enzima por 10 minutos a 80°C. Como controle negativo, para verificação da ausência de contaminação com DNA genômico foi feito em paralelo uma reação contendo todos os reagentes necessários com exceção da enzima, onde não se espera a amplificação de produtos nos experimentos de qPCR.

O produto final da reação de transcrição reversa foi diluído no fator de 1:8. Para os experimentos de qPCR, foram utilizados 5µl deste material para cada medida de amplificação.

III.7. PCR em tempo real: Análises e Estatística

A técnica de PCR quantitativo em tempo real utilizada neste trabalho, se baseia na detecção dos produtos amplificados com SYBR® Green (Applied Biosystems), e utilizou o equipamento Real Time PCR System 7500 (Applied Biosystems), seguindo as especificações contidas no protocolo fornecido pelo fabricante.

Os *primers* utilizados (Tabela 3) foram desenhados utilizando o programa *Primer Express* versão 2.0 (Applied Biosystems). Os principais parâmetros definidos para o desenho foram: tamanho dos fragmentos amplificados entre 100 e 120 pb, conteúdo CG entre 30% e 80% e temperatura de anelamento entre 58°C e 62°C. Para determinar a ausência da capacidade de formação de dímeros de *primers* ou estrutura secundária, foi utilizado o programa

OligoAnalyzer V3.1

(<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>). Para cada um dos

primers, foram feitas medidas em triplicatas e foi calculado o desvio padrão, para determinação de possíveis erros na pipetagem.

Tabela 3. Lista dos *primers* utilizados nos experimentos de PCR em Tempo Real.

Nome do Gene	Primers Forward	Primers Reverse
<i>ACTN4</i>	CGCTTCCTTCAAGGTCTTAGCA	GCGGGCGATGCAGTACTC
<i>ARNTL</i>	GCCGAATGATTGCTGAGGAA	GGAGGCGTACTCGTGATGTTC
<i>CASP7</i>	CACCTATCCTGCCCTCACATC	GCCTCACTGTCCCTTGCTCTT
<i>CTSB</i>	AGGACTGGATTGGCCAAACA	GTGGCTCACATGGCCTGTCT
<i>EPAS1</i>	TTTTTTGTTTAAGCTGACTCTTTGCT	CACGCTGTGCAACTTTCACA
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>TUB</i>	TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG	AGTGCCAGTGCGAACTTCATC
<i>HDAC5</i>	TGCAGCAAAAGCCCAACAT	AGACCAGCGGCGAACTTCT
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
<i>MAP3K7IP1</i>	GGGCTTCTTGGTGCTGATGT	AGTGTCAATCATCGCAGCAATC
<i>PRKAG1</i>	CTGGAAGCTCTGTGGGAATCA	CATACCTTCCCTAGCTCCCAGAT
<i>UQCRH</i>	ATGCGAGCAGTTGGAGAAATG	CTCCGTGCAATCCTCTTCTGT
<i>VRK2</i>	GAACAATGAAGCAGCTCAGGAA	GCTGATTTTTTGTGGGAAACTGT

A abundância dos candidatos selecionados nas linhagens celulares e nas amostras clínicas de tecido renal foi avaliada por qPCR utilizando o método de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Brevemente, o aparelho determina um valor de Ct (*threshold cycle*) para cada uma das amostras avaliadas. Este valor é definido como o número de ciclos necessários para que o sinal da fluorescência específica ultrapasse o limiar de fluorescência basal (*threshold*), e se localiza na região de crescimento exponencial da curva de amplificação. Os valores de Ct obtidos para o gene de interesse em cada condição são normalizados em relação a um gene referência com expressão constitutiva (*housekeeping gene*) avaliado nas mesmas amostras. Posteriormente, o valor de Ct normalizado (delta Ct) da amostra teste é relativizado ao valor de delta Ct da amostra controle, obtendo-se assim o delta-delta Ct. Finalmente, é calculando a potência $2^{-(\text{delta-delta Ct})}$ e as mudanças de expressão gênica são representadas em número de vezes (*Fold Change*) da abundância relativa do cDNA detectado em uma condição experimental em relação à outra.

Um pressuposto essencial para utilização da fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ no método de quantificação relativa é que a eficiência de amplificação dos gene alvo e do gene referência seja acima de 90%. Para verificar a eficiência de amplificação dos genes alvo e do gene endógeno, foi utilizado o programa *LinReg* PCR (RAMAKERS *et al.*, 2003) (Versão 7.5). Todos *primers* desenhados apresentaram eficiências de amplificações compatíveis com as exigidas pelo método.

Os testes D'Agostino & Pearson ou Shapiro-Wilk foram utilizados para determinar se as medidas de expressão obtidas por qPCR para cada gene nas diversas amostras seguem uma distribuição normal. Valores de $p \leq 0,05$ rejeitam a hipótese nula dos dados não possuírem uma distribuição normal. Quando os resultados apresentam uma distribuição normal, foram consideradas significativas diferenças de expressão que apresentassem um nível de significância de $p \leq 0.05$ em um teste t (*Student t-test*) bicaudal pareado, na comparação entre as amostras tumorais e não tumorais provenientes dos mesmos pacientes (1 réplica biológica, em triplicata). Para dados que não apresentaram uma distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon (bicaudal). Para os dados obtidos nas linhagens celulares de rim (medidas correspondentes a três réplicas biológicas), a estatística utilizada foi do teste t (*Student*) bicaudal heterocedástico (CRESSIE; WHITFORD, 1986), considerando significativas as diferenças com um valor de $p \leq 0.05$, comparando individualmente cada linhagem celular tumoral rim vs a linhagem celular não tumoral RC-124.

III.8. Lâminas de *Tissue-MicroArrays* contendo amostras clínicas de rim

As lâminas de TMA utilizados neste trabalho provem como parte de uma colaboração estabelecida com o Prof. Dr. Fernando Soares chefe da anatomia patológica e o Dr. Gustavo Cardoso Guimarães chefe do Núcleo de Urologia; do Hospital A.C. Camargo. Este projeto foi registrado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da instituição colaboradora com o número de processo N°116/12 (Anexo 1).

As amostras de tecido renal tumoral, assim como as amostras de tecido não tumoral proveniente da margem livre do tumor de pacientes que realizaram cirurgia de nefrectomia parcial/radical, foram selecionadas do banco de tumores incluídos em blocos de parafina do Hospital A.C. Camargo. Todos os casos foram previamente avaliados por exame anatomopatológicos para seleção das áreas mais representativas de malignidade e de tecido renal não tumoral para a confecção do TMA. Para classificação dos tumores, foi empregado o sistema TNM proposto pela União Internacional Contra o Câncer AJCC/UICC 2002 (SOBIN; WITTEKIND, 2002). Os tumores tiveram a sua graduação de malignidade histológica definidos segundo os critérios de Fuhrman (FUHRMAN *et al.*, 1982). Para a determinação dos subtipos histológicos foi empregada a classificação de 2004 pela Organização Mundial de Saúde (EBLE *et al.*, 2004).

Cada bloco de parafina foi examinado individualmente, por patologista, para delimitação das áreas representativas da neoplasia, utilizando lâminas coradas com hematoxilina e eosina. As regiões selecionadas e classificadas foram incluídas em um bloco-receptor de parafina (*Beecher Instruments, Silver Spring, MD*) a partir de cilindros colhidos do bloco-doador original com agulha de 1mm de diâmetro (*TMArrayer punch MP10-1,0 mm*). Para cada amostra clínica, foram selecionadas duas áreas representativas do bloco de parafina doador e transferidos posteriormente para o bloco de parafina receptor, contendo assim amostras representativas de duas áreas diferentes do tumor de cada paciente (duplicatas). A partir do bloco de parafina receptor foram feitos cortes histológicos com 3 μ a 4 μ de espessura, posteriormente utilizados para os experimentos de IHQ.

III.9. Lâminas contando arranjos de Tecido: Casuística

Durante este trabalho foram utilizadas duas lâminas de TMA construídas em tempos diferentes, contendo distintos números de amostras de pacientes. A primeira lâmina (Janeiro 2006) foi construída contendo 107 amostras de pacientes portadores de CCR com diferentes

graus de malignidade, assim como também 18 amostras de tecido renal não tumoral pareado, provenientes do mesmo paciente com CCR, tratados exclusivamente no Hospital A. C. Camargo no período de 1980 a 2005. A segunda lâmina de TMA utilizada (Setembro 2012), contem amostras provenientes de 192 pacientes com CCR, coletadas consecutivamente no Hospital A. C. Camargo entre 1982 a 2009, conjuntamente com 67 amostras de tecido renal não tumoral, sendo 64 das amostras pareadas com as amostras de RCC presentes na lâmina. De acordo com a rotina do departamento de cirurgia pélvica do Hospital A.C. Camargo, o acompanhamento no pós-operatório dos pacientes, consiste de consultas trimestrais nos primeiro e segundo anos, semestrais no terceiro e quarto anos e anualmente após o quinto ano. Unicamente para aqueles pacientes que foi possível obter todas as informações epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas disponíveis, foram incluídos posteriormente nas análises. A descrição detalhadas destas informações encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Informações epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas das amostras provenientes de pacientes com RCC, depositadas nas lâminas de TMA.

VARIÁVEL	CATEGORIA	TMA 1 Total = 108 (100%)	TMA 2 Total = 189 (100%)
		N (%)	N (%)
Idade	30 – 54	51 (47)	88 (47)
	55 - 72	57 (53)	101 (53)
Sexo	Masculino	68 (63)	116 (61)
	Feminino	40 (37)	73 (39)
Raça	Branco	93 (88)	166 (88)
	Não Brancos	13 (12)	23 (12)
Tabagismo	Sim	49 (45)	123 (65)
	Não	59 (55)	66 (35)
Sintomas	Sim	66 (61)	92 (49)
	Não	42 (39)	97 (51)

VARIÁVEL	CATEGORIA	TMA 1 Total = 108 (100%)	TMA 2 Total = 189 (100%)
		N (%)	N (%)
Tumor Incidental	Sim	42 (39)	94 (49)
	Não	66 (61)	95 (51)
Metástase ao Diagnóstico	Sim	16 (15)	22 (11)
	Não	92 (85)	167 (89)
Diâmetro Tumoral	< 7cm	60 (55)	122 (65)
	> 7cm	48 (45)	67 (35)
ECOG	0	83 (77)	126 (67)
	1 – 2	23 (23)	63 (33)
Estadio Clínico	I – II	67 (62)	131 (69)
	III – IV	41 (38)	58 (31)
Grau Fuhrman	1 – 2	64 (59)	123 (65)
	3 – 4	44 (41)	66 (35)
Necrose Tumoral	Sim	56 (52)	81 (43)
	Não	52 (48)	108 (57)
Subtipo Histológico	Células Claras	70 (65)	141 (75)
	Cromóforo	14 (13)	18 (10)
	Papilífero	12 (11)	18 (10)
	TFE3	2 (2)	1 (0,5)
	Dutos Coletores	1 (1)	1 (0,5)
	Inclassificáveis	9 (8)	9 (4)
Recorrência (local ou metástase)	Sim	30 (28)	37 (20)
	Não	78 (72)	152 (80)
Situação Clínica ao Termino do Estudo	Vivos	73 (67)	143 (75)
	Morte por Câncer	27 (25)	33 (18)
	Morte outras Causas	4 (4)	5 (3)
	Perda de Seguimento	4 (4)	8 (4)

III.10. Detecção de proteínas em lâminas de TMA por imunohistoquímica

Os experimentos de IHQ para todos os candidatos foram realizados seguindo as especificações do fabricante (DAKO), tendo sido padronizado individualmente para cada anticorpo a melhor diluição assim como o melhor método para recuperação antigênica utilizando cortes inteiros de tecido renal (Tabela 5).

Tabela 5: Método de recuperação antigênica e padronização da diluição dos anticorpo.

Anticorpo	Recuperação Antigênica	Diluição	Catalogo
<i>ACTN4</i>	Banho Maria 96°C 40min Tampão Citrato 10 mM; pH = 6,0	1: 100	Gene Tx - Cat N° GTX92633
<i>ARNTL</i>	Banho Maria 96°C 40min Tampão Citrato 10 mM; pH = 6,0	1:100	Sigma-Aldrich – Cat N° AV32002
<i>CASP7</i>	Panela de pressão 125°C, 25min TRIS/EDTA; pH = 9,0	1:150	Chemicon – Cat N° MAB4706
<i>EPAS1</i>	Banho Maria 96°C 40min Tampão Citrato 10 mM; pH = 6,0	1:1000	Abcam– Cat N° ab8365

Brevemente, as lâminas de TMAs foram desparafinadas com dois banhos sucessivos de Xilol e rehidratadas utilizando quatro banhos sucessivos de Etanol a 100%, a 95%, a 80% e a 70%, respectivamente, durante 30 segundos cada um e finalmente enxaguadas em água destilada. Seguidamente, foi realizada a recuperação antigênica padronizada para cada anticorpo (Tabela 5). A peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos de dez minutos cada, com H₂O₂ (10 vol) e na sequência um banho com PBS 1X. O bloqueio foi realizado utilizando bloqueador de proteínas livre de soro (DAKO). As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário por duas horas (Tabela 5). Hibridizações omitindo o anticorpo primário foram realizadas como controle negativo. Posteriormente, foram feitas três lavagens com PBS 1X para retirar o excesso de anticorpo, e as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (*Advanced HRP Link* – DAKO) e com o polímero (*Advanced HRP enzyme* – DAKO) por 30 minutos, intercalando com três lavagens de PBS 1X, para retirada do excesso de anticorpo secundário e do polímero. A marcação da proteína-alvo foi evidenciada pela

detecção da cor marrom após incubação com 3,3-tetracloridro de diaminobenzina (*Liquid DAB + substrate chromogen system*; DAKO). Finalmente, foi realizada uma contra coloração com hematoxilina de Harris (Merck®) para todas as lâminas. Na sequência, as lâminas foram submetidas ao processo de desidratação para efetuar a montagem, com banhos sucessivos de Etanol 80%, 95% e 100%, por 30 segundos cada um, e em quatro banhos de Xilol de 30 segundos cada.

III.11. Análise visual das lâminas de TMA

Para a análise dos resultados, as lâminas foram interrogadas utilizando microscopia óptica comum (*double-headed microscope*) junto a um histopatologista, utilizando o método semiquantitativo conhecido como *quick score* (ALVARENGA *et al.*, 2013; REINER *et al.*, 1990; WALKER, 2006). A determinação do *score* visual da imunomarcação foi realizado pela somatória final entre os atributos correspondente aos valores de intensidade da marcação e porcentagem de células marcadas de cada amostra. A escala de intensidades foi: “0” para amostras negativas; “1”, para marcação fraca; “2”, marcação moderada; e “3”, marcação forte. A porcentagem de células marcadas foi delimitada como: “0”, negativas o com marcação marginal até 5%; “1”, 6-25% das células marcadas positivamente; “2”, 26-50% de células positivas; “3”, 51-75% de células positivas; e “4”, 76-100% de células positivas. Foram considerados como avaliáveis apenas as amostras que apresentaram um mínimo de 10% do diâmetro total do caso. Nas Figura 1 e Figura 2, podem se observar exemplos para os valores de *score* visual das amostras tumorais e não tumorais de rim. Quando foi possível observar regiões com marcação heterogênea, foi considerada para determinação dos *scores* visuais a porção que apresentou maior intensidade. Quando as réplicas correspondentes ao mesmo paciente apresentaram valores diferentes, o maior *score* visual foi escolhido.

Figura 1: Exemplos dos diferentes graus de marcação observados nas amostras de CCR presentes no TMA. Após a somatória entre os valores de grau de marcação (0-3) e porcentagem de células marcadas (0-4), as amostras tumorais apresentaram valores de *score* visual como os representados em A = sem marcação, B = 2, C = 3, D = 4, E = 5, e F = 6. Nenhuma das amostras tumorais apresentaram o valor máximo de 7.

Figura 2: Diferentes graus de marcação observados nas amostras não tumorais presentes no TMA. Após a somatória entre os valores de grau de marcação (0-3) e porcentagem de células marcadas (0-4), as amostras tumorais apresentaram valores de *score* visual como os representados em A = 3, B = 4, C = 5, D = 6, e E = 7. Nenhuma das amostras não tumorais se apresentaram sem marcação o com o valor mínimo de 2.

III.12. Análise quantitativa automatizada utilizando o ACIS III

Uma primeira análise quantitativa foi realizada utilizando o programa *Automated Cellular Imaging System*, ACIS III (DAKO) que atribui um valor numérico de intensidade de marcação para cada uma das amostras presentes no TMA, utilizando a área total da amostra. Os procedimentos para leitura das lâminas foram feitos seguindo as especificações dos fabricantes (DAKO). Para cada anticorpo utilizado, primeiramente foi feita uma calibração manual do ACIS III, identificando a coloração azul (correspondente à contra coloração com hematoxilina de Harris) e as áreas com marcação marrom claro e marrom escuro. A quantificação foi determinada pelo programa do aparelho utilizando o algoritmo de marcação citoplasmática. O *score* final foi calculado como: (intensidade X área marcada da cor marrom) / (área marcada total + área não marcada total).

III.13. Análise quantitativa automatizada utilizando o APERIO

Foi introduzido posteriormente a utilização do programa *ScanScope* (APERIO – Vista, CA). Os procedimentos para leitura e detecção das lâminas foram feitos seguindo as especificações dos fabricantes (APERIO). Para determinação da marcação específica de cada amostra foi utilizando o algoritmo *Positive Pixel Count*. Os resultados expressos em valores de “positividade” correspondem ao número total de pixels positivos (somatória dos fracos, moderados e fortes positivos) divididos pelo número total de pixels da amostra, representado valores entre 0 e 1. O algoritmo utilizado no APERIO permitiu o cálculo da medida de marcação “*H-score*” (BUDWIT-NOVOTNY *et al.*, 1986; MCCARTY *et al.*, 1986). Para o cálculo do *H-score* é feita a somatória entre, a porcentagem de pixels positivos (“Pi”, valores entre 0% até 100%), nas categorias de pixels fracos positivos, pixels moderados positivos e pixels fortes positivos presentes na amostra; multiplicado pela intensidade (“i”), sendo $i = 3$ para os fortes positivos, $i = 2$ para os moderados positivos e $i = 1$ para os fracos positivos. A fórmula geral é $\Sigma(i \times P_i)$ e contém valores no range entre 0 até 300.

III.14. Determinação dos grupos de pacientes utilizando o programa *X-tile*.

A determinação do valor de corte para os valores contínuos de *score* de marcação utilizados na construção das curvas de sobrevida foi determinado utilizando o programa *X-tile* (CAMP *et al.*, 2004). Inicialmente o programa separa o conjunto total de amostras em um grupo de treinamento e outro de validação. Ambos os grupos possuem uma média de sobrevida comparável. Em seguida, o programa determina o valor corte que permite separar otimamente as amostras do conjunto de treinamento em função da sobrevida. O programa pode criar três subgrupos de amostras utilizando dois valores de corte, ou dois subgrupos utilizando um único valor de corte (alta ou baixa intensidade). Para cada possível valor de corte utilizando na divisão dos subgrupos é calculado o Qui-quadrado (X^2). O teste X^2 permite investigar se o valor de corte consegue separar subgrupos de pacientes com sobrevidas distintas: quanto maior o valor da estatística X^2 , maior a probabilidade de rejeição da hipótese nula, i.e., que a sobrevida média dos pacientes seja igual nos subgrupos definidos pelo valor de corte selecionado. O valor de *score* de marcação utilizado como corte que resulta no maior resultado de X^2 no conjunto de treinamento é escolhido pelo programa como o valor ótimo. Em seguida o mesmo valor de corte ótimo é aplicado às amostras do conjunto de validação. A significância estatística para o valor de corte aplicado ao conjunto de validação é calculado pelo teste *log-rank*. Essa abordagem permite o estabelecimento de um valor de corte com fundamentação estatística ao invés de um valor arbitrário, o que é especialmente importante quando existe uma distribuição linear e difusa de valores de *score* de marcação contínuos na população total de amostras, sem uma observação evidente da presença de subpopulações.

III.15. Análises estatísticas dos dados de imunomarcação obtidos com TMAs.

As análises estatísticas para os resultados de TMA foram realizadas utilizando os programas Mini-Tab (v.16), GraphPad Prism (v. 5) e *R statistical software package*.

Primeiramente, foram determinados se os valores de *score* semiquantitativos e quantitativos seguem uma distribuição normal, utilizando os testes de normalidade de D'Agostino & Pearson ou Shapiro-Wilk foram aplicados. Valores de $p \leq 0,05$ rejeitam a hipótese nula dos dados não possuírem uma distribuição normal.

Quando determinado que o conjunto de amostras possui uma distribuição normal, foi aplicado o teste *t* (*Student*) não pareado bicaudal, para o conjunto de dados assim como para as análises das amostras pareadas provenientes do mesmo paciente (teste *t* de *Student*, bicaudal pareado). Para dados que não possuem uma distribuição normal, as análises estatísticas foram feitas utilizando o *U-test* não paramétrico de Mann-Whitney. Quando comparado às amostras pareadas tumorais e não tumoral proveniente do mesmo paciente foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon. Para todos os testes, o limiar de $p \leq 0,05$ foi utilizado para considerar uma diferença significativa.

Para determinar a existência de associação entre a imunomarcação da proteína-alvo e as variáveis anatomopatológicas, foi empregado o teste Qui-quadrado (X^2). Para variáveis em que o número de amostras em um dos grupos fosse menor ou igual a 5 foi utilizado o teste exato de Fisher. Nas análises de sobrevida global e sobrevida câncer-específica foi empregado o estimador de Kaplan-Meier (KM), utilizando um período de seguimento de 60 meses, decorrido entre a data da nefrectomia e a data do óbito ou do último seguimento. O tempo de seguimento dos pacientes foi calculado em meses, correspondendo ao intervalo entre o tempo decorrido data da cirurgia e a data do último seguimento clínico do paciente de 60 meses. A existência de diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de KM foi avaliada pelo teste *log-rank* (análise univariada).

O modelo de riscos proporcionais de Cox foi empregado para as análises multivariadas, seguindo a estratégia *Stepwise backward*. Apenas as variáveis que apresentaram uma significância de $p < 0,10$ na análise univariada (teste *log rank*) foram

selecionadas para uma análise multivariada. Permaneceram no modelo múltiplo as variáveis com $p < 0,05$. A medida de risco estimada foi a razão das funções de risco (*hazard ratio* – *HR*), que é a exponencial dos coeficientes de regressão do modelo múltiplo.

O teste multivariado de Cox permite avaliar variáveis contínuas, tais como a idade dos pacientes. Frequentemente é observada a idade como uma variável independente nas análises multivariadas, devido ao risco aumentado que os pacientes com CCR têm de morrer a cada ano que passa. Dentre os fatores que afetam na estatística da análise multivariada de Cox encontrasse o número de pacientes (casuística) e o número de variáveis (assim como seu respectivo grau de associação com a sobrevida). Excluir variáveis fortemente associadas à sobrevida tais como estadió clínico e o grau Fuhrman, permitiria que as demais variáveis ficassem com valores de p significativos ou próximos da significância. Da mesma forma, a inclusão ou não da variável quantitativa “idade” pode afetar nos resultados finais do teste. Quando a variável idade apresentou $p < 0,10$ nas curvas de KM, foram realizadas duas análises multivariadas de Cox, com adição ou não desta variável contínua.

IV. RESULTADOS

IV.1. Validação da expressão gênica de biomarcadores candidatos de CCR por PCR Tempo Real.

Os candidatos a biomarcadores de CCR foram selecionados a partir de um conjunto de 64 transcritos identificados como diferencialmente expressos em tumores de rim em estudo prévio realizado em nosso grupo utilizando microarranjos de DNA (BRITO *et al.*, 2008). Os nove candidatos selecionados estão apresentados na Tabela 1. Foram realizados experimentos de qPCR para confirmação dos níveis de expressão gênica dos candidatos selecionados em um conjunto independente de amostras de pacientes com CCR e tecidos histologicamente não tumorais pareados retirados da margem livre do tumor (Tabela 2).

Dentre os candidatos selecionados para validação por qPCR, o transcrito *ARNTL* foi o único transcrito que apresentou expressão aumentada nas amostras tumorais de rim nos experimentos com microarranjos (Tabela 1). Foi possível confirmar com significância estatística (7 de 11 de amostras com expressão mais alta no tumor, $p = 0,01$) do aumento da expressão do transcrito *ARNTL* nas amostras de CCRcc (Figura 3).

Figura 3: Expressão de *ARNTL* em amostras clínicas de rim por qPCR. Abundância relativa do transcrito *ARNTL* em amostras tumorais (barras escuras) e não tumorais (barras claras) pareadas provenientes do mesmo paciente (indicados por números no eixo x). Os valores foram normalizados em relação ao gene calibrador *HPRT1*. Para cada paciente, os valores de expressão (*Fold Change*) são relativos à abundância medida na amostra não tumoral. A determinação da significância estatística ($p < 0,05$) foi realizada utilizando o teste pareado de Wilcoxon (para detalhes, ver o item III.7 dos materiais e métodos).

Os demais candidatos selecionados para validação apresentaram expressão diminuída nas amostras tumorais comparadas às amostras não tumorais de rim (Tabela 1) nos experimentos com microarranjos de DNA (BRITO *et al.*, 2008).

Nossos experimentos de qPCR confirmaram a diminuição da expressão dos candidatos *ACTN4* (14 de 18 amostras com expressão mais baixa no tumor; $p = 0,01$) e *EPAS1* (9 de 13 amostras com expressão mais baixa no tumor; $p = 0,04$) tanto nas amostras de CCRcc, como nas amostras provenientes de outros subtipos histológicos (Figura 4, painel A e B repetitivamente).

Figura 4: Expressão dos genes *ACTN4* e *EPAS1* em amostras clínicas de rim por qPCR. Abundância relativa do transcrito *ACTN4* (A) e *EPAS1* (B) em amostras tumorais (barras escuras) e não tumorais (barras claras) pareadas provenientes do mesmo paciente (indicados por números no eixo x). Os valores foram normalizados em relação ao gene calibrador *HPRT1*. Para cada paciente, os valores de expressão (*Fold Change*) são relativos à abundância medida na amostra não tumoral. A determinação da significância estatística ($p < 0,05$) foi realizada utilizando o teste pareado de Wilcoxon (para detalhes, ver o item III.7 dos Materiais e Métodos).

Dois dos candidatos apresentaram resultados contrários aos observados nos experimentos com microarranjos (Tabela 1). O transcrito *CASP7* apresentou um aumento significativo da expressão (10 de 12 amostras com expressão mais alta no tumor; $p = 0.003$) nas amostras de CCRcc (Figura 5, painel A). Da mesma forma, foi possível verificar um aumento significativo (10 de 13 amostras com expressão mais alta no tumor; $p = 0,01$) da expressão de *VRK2* nas amostras tumorais analisadas, independente do subtipo histológico (Figura 5, painel B).

Figura 5: Expressão dos genes *CASP7* e *VRK2* em amostras clínicas de rim por qPCR. Abundância relativa do transcrito *CASP7* (A) e *VRK2* (B) em amostras tumorais (barras escuras) e não tumorais (barras claras) pareadas provenientes do mesmo paciente (indicados por números no eixo x). Os valores foram normalizados em relação ao gene calibrador *HPRT1*. Para cada paciente, os valores de expressão (*Fold Change*) são relativos à abundância medida na amostra não tumoral. A determinação da significância estatística ($p < 0.05$) foi realizada utilizando o teste pareado de Wilcoxon (para detalhes, ver o item III.7 dos Materiais e Métodos).

Por fim, os candidatos *CTSB*, *MAP3K7IP1*, *PRKG1* e *UQCRH* apresentaram uma expressão extremamente variável nas amostras tumorais de CCR quando comparada as amostras não tumorais (dado não mostrado), e portanto não foram analisados em maior detalhe.

IV.2. Determinação da expressão dos biomarcadores candidatos de CCR em linhagens celulares de rim.

Contar com um modelo celular capaz de recapitular as diferenças de expressão detectadas por microarranjos de DNA ou qPCR em amostras clínicas de tecido tumoral e não tumoral de rim, é de grande importância para futuros experimentos de caracterização dos transcrito e seus possíveis envolvimento na tumorigênese. Nosso laboratório possui um banco de células renais, contendo uma linhagem imortalizada de fenótipo não tumoral (RC-124), duas linhagens tumorais do subtipo células claras (786-O e 769-P) e uma linhagem metastática derivada de um tumor renal primário (CAKI). Utilizando este conjunto de quatro linhagens celulares de rim, foi avaliada a expressão dos candidatos *ARNTL*, *ACTN4* e *EPAS1* cujo padrão de desregulação em tumores medido por qPCR foi semelhante ao observado nos experimentos anteriores com microarranjos de DNA (Figura 3 e Figura 4). Todas as medidas foram realizadas para três réplicas biológicas.

Inicialmente foi avaliada a expressão do transcrito *ARNTL*, que tinha apresentado um aumento significativo da sua expressão nas amostras de CCRcc (Figura 3). Foi possível observar um aumento significativo da expressão ($p = 0,04$) somente na linhagem tumoral 786-O (Figura 6, painel A), quando comparada a linhagem não tumoral RC-124.

Para o gene candidato *ACTN4* não foi possível observar uma diferença significativa da expressão em nenhuma das linhagens tumorais em relação à linhagem não tumoral de rim (Figura 6, painel B). Já o transcrito *EPAS1* mostrou uma diferença significativa ($p < 0.001$) da

expressão apenas linhagem celular 769-P quando comparado à linhagem celular não tumoral RC-124 (Figura 6, painel C).

Adicionalmente foi avaliada a expressão do transcrito *CASP7*, que apresentou um aumento significativo nas amostras clínicas de rim do subtipo células claras (Figura 5, painel A), resultado contrário ao observado nos experimentos de microarranjos (Tabela 1). Interessantemente, foi corroborado o aumento significativo da expressão de *CASP7* ($p < 0,05$) nas amostras provenientes da linhagem tumoral 769-P assim como também da linhagem metastática CAKI (Figura 6, painel D).

Figura 6: Expressão dos genes candidatos em linhagens celulares de rim por qPCR. A abundância relativa dos genes *ARNTL* (A), *ACTN4* (B), *EPAS1* (C), e *CASP7* (D) foi medida em linhagens celulares derivadas de tumores de rim (769-P, 786-O, CAKI) e na linhagem não tumoral RC-124, em triplicatas biológicas. Os valores foram normalizados em relação ao gene calibrador *GAPDH*. Para cada linhagem, os valores de expressão apresentados (*Fold Change*) são relativos à abundância medida na linhagem não tumoral RC-124. A determinação da significância estatística ($p < 0,05$) foi realizada utilizando o teste *t* (para detalhes, ver o item III.7 dos Materiais e Métodos).

IV.3. Expressão dos biomarcadores candidatos em amostras de CCR por imunohistoquímica em microarranjos de tecido

Continuando com a caracterização de um possível novo marcador de prognóstico do tumor renal, fomos interrogar a expressão proteica dos candidatos selecionados utilizando lâminas de TMA contendo centenas de amostras de tecido de adenocarcinoma de rim com diferentes graus de malignidade. Esses experimentos foram realizados através de colaboração estabelecida com o Prof. Dr. Fernando Soares, chefe da anatomia patológica e o Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, chefe do Núcleo de Urologia do Hospital A.C. Camargo (SP).

As proteínas avaliadas correspondem aos genes que tiveram seus níveis de expressão confirmados como diferencialmente expressos por PCR tempo real, e para os quais existiam anticorpos de boa qualidade (específico e com alta afinidade) comercialmente disponível. A descrição do método utilizado para a recuperação antigênica e a diluição do anticorpo estão apresentados no item III.10 da seção Materiais e Métodos (Tabela 5).

Durante este trabalho, foi possível utilizar duas lâminas de TMA diferentes (item III.9 da seção Materiais e Métodos). O conjunto de amostras presente nas lâminas de TMA representam pacientes com diversos subtipos histológicos de CCR. Cada subtipo possui características próprias de morfologia e agressividade. O subtipo histológico mais prevalente é o CCRcc, que corresponde em a 75-80% dos casos de carcinoma renal na população (LOPEZ-BELTRAN *et al.*, 2009; RINI *et al.*, 2009). Como existe uma baixa representatividade das amostras correspondentes a outros subtipos histológicos na lâmina de TMA, análises de associação entre a imunomarcagem da proteína candidato com as variáveis clinicopatológicas, assim como na determinação do valor prognóstico das proteínas candidatos expressas nos pacientes com CCR, foram realizadas utilizando apenas o subconjunto de pacientes CCRcc.

IV.4. Caracterização do ACTN4 como marcador de prognóstico no CCR.

IV.4.1. Determinação da expressão proteica de ACTN4 por imunohistoquímica.

Para determinação do nível relativo da expressão proteica do candidato ACTN4 em amostras clínicas de CCR, foram realizados experimentos de IHQ utilizando uma lâmina de TMA contendo 117 amostras de CCR provenientes de fragmentos cirúrgicos, assim como 18 amostras de tecido renal não tumoral pareado, provenientes do mesmo paciente (TMA 1, ver Materiais e Métodos para detalhes).

Para quantificação e cálculo do score de imunomarcção foi utilizado o analisador de lâminas ACIS III (ver Materiais e Métodos, seção III.12). Cento e treze amostras de CCR (96%, do total de 117) e 16 amostras de tecido renal não tumoral (89%, do total de 18) resultaram em spots avaliáveis. Quando comparada a imunomarcção da proteína ACTN4 nas amostras tumorais e não tumorais de rim, foi observada a diminuição significativa ($p < 0,05$) da expressão de ACTN4 no conjunto total de amostras de pacientes com CCR (Figura 7, painel A), assim como no subconjunto de 16 pares de amostras tumorais/não tumorais provenientes dos mesmos pacientes (Figura 7, painel B).

Figura 7: Expressão relativa de ACTN4 nas amostras tumorais e não tumorais de rim detectadas na lâmina de TMA. Os scores de imunomarcção foram determinados com o equipamento ACIS III. As comparações entre a imunomarcção de ACTN4 nas amostras tumorais e não tumorais de rim foram realizadas (A) no conjunto total de amostras do TMA ou (B) em apenas 16 pares de amostras tumorais/não tumorais de rim. Para determinação da significância estatística ($p < 0,05$) foi utilizado: (A) teste de Mann-Whitney (*U-test*), (B) teste pareado de Wilcoxon (para detalhes, ver o item III.15 dos Materiais e Métodos).

IV.4.2. Associação da expressão de ACTN4 com variáveis clinicopatológicas nos pacientes com CCRcc

Para avaliar se a imunomarcção detectada de ACTN4 apresenta associao com alguma das variáveis anatomopatológicas utilizadas na clínica, foi realizado o teste de Qui-quadrado (ver Materiais e Métodos, seção III.15). Após experimentos de IHQ para ACTN4 a lâmina de TMA 1 resultou em 113 *spots* avaliáveis, das quais 67 (60%) amostras correspondem a pacientes com CCRcc. Apenas as amostras correspondentes a pacientes com CCRcc foram utilizadas na análise.

Para identificação dos subgrupos de pacientes correspondentes a cada categoria de imunomarcção foi utilizado o programa *X-Tile* (ver Materiais e Métodos, seção III.14).

Nossos resultados mostraram uma associação significativa ($p = 0,005$) apenas entre a imunomarcção de ACTN4 e as variáveis anatomopatológicas "tumor incidental" e "tamanho tumoral" (Tabela 6). Interessantemente, pacientes com CCRcc que apresentaram valores de imunomarcção da proteína ACTN4 < 2 quantificada pelo ACIS III, mostraram-se significativamente associadas com tumores não diagnosticados incidentalmente (15 de 16, 94%) e tumores de maior dimensão ($> 7\text{cm}$) (12 de 16, 75%).

Tabela 6: Associação entre a variável de imunomarcção para ACTN4 e parâmetros clinicopatológicos em amostras de CCRcc presentes na lâmina de TMA.

Variável	Total (n = 67)	Número de casos		p-value ^a
		Imunomarcção ACTN4		
		ACIS III < 2 (n = 16)	ACIS III ≥ 2 (n = 51)	
Idade				0,327
Faixa 30 - 54	28	5 (31%)	23 (47%)	
Faixa 55 - 72	39	11 (69%)	28 (51%)	
Anos, media (± d.p.)		56,4 (±11,5)	54,7 (±10,0)	
Tumor Incidental				0,005
Ausente	43	15 (94%)	28 (55%)	
Presente	24	1 (06%)	23 (45%)	
Tamanho do tumor (cm)				0,005
< 7cm	37	4 (25%)	33 (65%)	
> 7cm	30	12 (75%)	18 (35%)	
Estádio Clínico ^b				0,101
I – II	41	7 (44%)	34 (67%)	
III – IV	26	9 (56%)	17 (33%)	
Necrose tumoral				0,212
Ausente	30	5 (31%)	25 (49%)	
Presente	37	11 (69%)	26 (51%)	
ECOG ^d				0,416
0	46	14 (88%)	32 (63%)	
1 – 2	21	2 (12%)	19 (37%)	
Grau Fuhrman				0,550
1 – 2	45	12 (75%)	33 (65%)	
3 – 4	22	4 (25%)	18 (18%)	
Metástase ao diagnóstico				0,691
Não	57	13 (81%)	44 (86%)	
Sim	10	3 (19%)	14 (7%)	
Invasão da Veia Renal				0,937
Não	59	14 (88%)	45 (88%)	
Sim	8	2 (12%)	6 (12%)	
Linfonodos ^c				0,983
N0	35	5 (83%)	30 (86%)	
N+	6	1 (17%)	5 (15%)	
NX	26	-	-	

As porcentagens das variáveis estão representadas entre parênteses. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão mostrados em negrito. ±d.p. desvio padrão.

^a Para determinação de associação entre as variáveis anatomopatológicas e a marcação por ACTN4 o teste de Qui-quadrado foi utilizado. Quando as variáveis apresentaram menos de $n < 5$ amostras para alguma das categorias avaliadas, foi utilizado o teste exato do Fisher.

^b Para determinação do Estadio Clínico foi utilizado a classificação UICC (GUINAN *et al.*, 1997).

^c Linfonodos N0, corresponde ausência de linfonodos positivos na peça cirúrgica após a nefrectomia; N+, linfonodos positivos; NX, ausência de linfonodos na peça cirúrgica após a nefrectomia.

^d Eastern Cooperative Oncology Group performance status (OKEN *et al.*, 1982).

IV.4.3. Avaliação do valor prognóstico da imunomarcção da proteína ACTN4 nos pacientes com CCRcc.

Para investigar se os subgrupos de pacientes com CCRcc estratificados pela imunomarcção de ACTN4 diferenciam-se quanto à sobrevida, foram construídas curvas de KM. Foi possível observar uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as curvas de sobrevida global (Figura 8, painel A) assim como também nas curvas de sobrevida câncer-específica (Figura 8, painel B) dos subgrupos de pacientes estratificados pelo seu grau de imunomarcção para ACTN4. Em ambos os casos, pacientes com menor *score* de imunomarcção ($score < 2$) apresentaram uma pior sobrevida.

Figura 8: Curvas de sobrevida de pacientes com CCRcc em função do padrão de imunomarcção de ACTN4. Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para (A) sobrevida global e (B) sobrevida câncer-específica, utilizando os valores quantitativos de expressão determinados pelo ACIS III. Os valores de corte utilizados foram determinados pelo programa X-Tile (para detalhes ver item III.14 nos Materiais e Métodos). Para determinação de significância estatística ($p < 0,05$) na comparação entre as curvas de KM foi utilizado o teste *log-rank*.

Variáveis anatomopatológicas como o grau Fuhrman ou estadió clínico (incluindo o TNM) vem sendo amplamente utilizadas na rotina clínica como marcadores prognósticos para determinação da sobrevida dos pacientes após a cirurgia (FICARRA; MARTIGNONI; *et al.*, 2005; NOVARA *et al.*, 2010). Para investigar se a imunomarcção de ACTN4 corresponde a uma variável de sobrevida independente quando comparada as demais variáveis explicativas de sobrevida nos pacientes com CCRcc, foi realizado o teste multivariado de Cox (ver Materiais e Métodos, seção III.15). Apenas as variáveis que mostraram significância

estatística nas análises univariada da sobrevida global foram incluídas na análise multivariada (Tabela 7).

Tabela 7: Análise univariada e multivariada para determinar associação entre a imunomarcção de ACTN4 e os parâmetros clinicopatológicos com a sobrevida câncer-específica de pacientes com CCRcc. Apenas as variáveis que mostraram uma significância $p \leq 0,10$ na análise univariada de KM foram utilizadas na análise multivariada. Variáveis com valores de $p \leq 0,05$ após análise multivariada foram consideradas significativas. Valores significativos e os resultados para a variável ACTN4 estão em negrito.

Variáveis	<i>p-value</i>	HR ou RR (95% CI) ^a
Análise Univariada ^b		
Estadio clínico ^c	< 0.001	0.15 (0.05 – 0.38)
Invasão da Veia Renal	< 0.001	0.06 (0.01 – 0.29)
Metástase ao diagnóstico	< 0.001	0.04 (0.01 – 0.20)
Tamanho Tumoral (7cm cut off)	0.005	0.28 (0.11 – 0.67)
Grau Fuhrman	0.013	0.29 (0.11 – 0.77)
ECOG ^d	0.006	0.24 (0.09 – 0.66)
Tumor Incidental	0.009	3.21 (1.34 – 7.65)
Imunomarcção ACTN4	0.016	3.63 (1.27 – 10.37)
Linfonodos +/-	0.041	0.18 (0.03 – 0.93)
Necrose Tumoral	0.057	0.43 (0.18 – 1.02)
Idade ^e	0.065	0.44 (0.18 – 1.05)
Análise Multivariada		
Imunomarcção ACTN4	0.007	2.67 (0.06 – 0.66)
Idade	0.027	2.20 (1.00 – 1.12)
Estadio Clínico	0.061	1.87 (0.90 – 9.10)
Análises Multivariada (sem idade)		
Estágio Clínico	0.001	2.60 (1.39 – 11.01)
Imunomarcção ACTN4	0.011	2.54 (0.12 – 0.76)
Grau Fuhrman	0.022	2.30 (1.16 – 7.22)
Metástase ao diagnóstico	0.064	1.85 (0.94 – 7.69)

^a Hazard Ratio (HR) e Relative Risk (RR) calculados nas análises univariada e multivariada, respectivamente.

^b Curvas de KM foram avaliadas na análise univariada. A significância foi testada utilizando o teste *log-rank*.

^c Para determinação do Estadio Clínico foi utilizado a classificação UICC (GUINAN *et al.*, 1997).

^d Eastern Cooperative Oncology Group performance status (OKEN *et al.*, 1982).

^e Para cálculo da curva de KM, a variável idade foi classificada em dois grupos (Tabela 6).

Independentemente da utilização ou não da variável "idade" (para detalhes, ver item III.15 nos Materiais e Métodos) nossos resultados mostraram que a variável de imunomarcção de ACTN4 esta significativamente associada de forma independente ($p < 0,05$) a um risco relativo de morte duas vezes maior para os pacientes que possuem imunomarcção fraca ACTN4 ($score < 2$) (Tabela 7). Foram também identificadas como

variáveis independentes "Estágio Clínico", "Grau Fuhrman" e "presença de metástase ao diagnóstico", parâmetros clinicopatológicos fortemente associados à sobrevida dos pacientes com CCR (FICARRA; MARTIGNONI; *et al.*, 2005; FICARRA; SCHIPS; *et al.*, 2005; LANE, 2013).

IV.5. Avaliação de ARNTL como marcador de prognóstico no CCR.

IV.5.1. Determinação da expressão proteica de ARNTL por imunohistoquímica.

Para determinação do nível relativo da proteína ARNTL em amostras de tecido renal tumoral, foram realizados experimentos IHQ em lâminas de TMA contendo amostras de 192 pacientes com CCR de diferentes subtipos histológicos, assim como 67 amostras de tecido renal não tumoral, sendo 64 das amostras pareadas provenientes de pacientes.

Os resultados foram avaliados no APERIO (ver Materiais e Métodos, seção III.13). Foi possível obter um total de 152 *spots* tumorais avaliáveis (79% do total) e 50 amostras de tecido renal não tumoral (74% do total).

Utilizando o conjunto total de amostras (152 tumores e 50 tecido não tumoral) a quantificação dos dados de IHQ pela abordagem da positividade mostrou uma tendência para a diminuição da expressão de ARNTL (Figura 9, painel A). Quando avaliada a positividade da imunomarcção de ARNTL no conjunto de 34 amostras pareadas provenientes dos mesmos pacientes, observou-se a diminuição significativa da imunomarcção de ARNTL nos tumores CCR ($p = 0.006$; Figura 10, painel A). A quantificação pelo método *H-Score* revelou a diminuição estatisticamente significativa da imunomarcção de ARNTL no conjunto total de amostras de CCR ($p < 0,0001$; Figura 9, painel B) assim como nas amostras pareadas ($p = 0.0003$; Figura 10, painel B).

Figura 9: Expressão relativa de ARNTL no conjunto total de amostras tumorais e não tumorais de rim detectadas na lâmina de TMA. Foram utilizados dois métodos para detecção dos resultados quantitativos (A) “positividade” e (B) *H-score* após experimentos de IHQ. Para determinação da significância estatística ($p < 0,05$) foi utilizado: (A) teste de Mann-Whitney (*U-test*), (B) teste *t* não pareado (para detalhes, ver o item III.15 dos Materiais e Métodos).

Figura 10: Expressão relativa de ARNTL no subconjunto de 34 amostras pareadas tumor/não tumor provenientes do mesmo paciente, contidas na nossa lâmina de TMA. Foram utilizados dois métodos para detecção dos resultados quantitativos (A) “positividade” e (B) *H-score* após experimentos de IHQ. Para determinação da significância estatística ($p < 0,05$) foi utilizando o teste *t* pareado (para detalhes, ver o item III.15 dos Materiais e Métodos).

IV.5.2. Avaliação do valor prognóstico da proteína ARNTL nos pacientes com CCRcc.

Com o intuito de avaliar se a expressão proteica de ARNTL pode ser utilizada como um possível marcador de prognóstico em pacientes com CCR foram construídas curvas de Kaplan-Meier para investigar a associação entre a imunomarcação da proteína determinada por IHQ (positividade e *H-score*) e a sobrevida dos pacientes. Os valores de corte das variáveis positividade e *H-score* utilizados para separar grupos de pacientes em função da sobrevida foram determinados utilizando a ferramenta *X-tile* (ver Materiais e Métodos, seção III.14).

Dos 152 *spots* avaliáveis presentes na nossa lâmina de TMA (79% do total), 106 (70%) correspondem a amostras de pacientes com CCRcc. Fomos investigar se expressão de ARNTL consegue explicar a sobrevida utilizando apenas o subconjunto de pacientes com CCRcc.

Embora sem significância estatística ($p = 0,08$), quando utilizada a quantificação pela positividade foram identificadas duas populações de pacientes, onde uma maior expressão da proteína (positividade $\geq 0,80$) está associada a uma pior sobrevida global (Figura 11, painel A). Quando avaliada a sobrevida câncer-específica, foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0.03$) entre as curvas de sobrevida (76% de sobrevida para os pacientes com positividade $< 80\%$, comparado a 58% de sobrevida para os pacientes que apresentaram uma positividade $> 80\%$). Novamente, pacientes que possuem um maior valor de positividade apresentaram uma pior sobrevida (Figura 11, painel C).

Curvas de KM geradas com os valores de *H-score* da imunomarcação de ARNTL não apresentaram diferenças significativas na sobrevida global (Figura 11, painel B) ou na sobrevida câncer-específica (Figura 11, painel B).

Figura 11: Curvas de sobrevida de pacientes com CCRcc em função do padrão de imunomarcagem de ARNTL. Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global (A e B) e sobrevida câncer-específica (C e D); utilizando os valores quantitativos de expressão “positividade” (A e C) e *H-score* (B e D). Os valores de corte utilizados foram determinados pelo programa *X-tile* (para detalhes ver item III.14 nos Materiais e Métodos). Para determinação de significância estatística ($p < 0,05$) na comparação entre as curvas de KM foi utilizado o teste de *log-rank*.

Para avaliar se a positividade de ARNTL corresponde a uma variável de sobrevida independente quando comparada às demais variáveis explicativas de sobrevida nos pacientes com CCRcc, foi realizado o teste multivariado de Cox (ver Materiais e Métodos, seção III.15). Apenas as variáveis que apresentaram valores de $p < 0,10$ na análise de sobrevida câncer-específica (análise univariada, Tabela 8) foram incluídas na análise multivariada. A variável “positividade de ARNTL” resultou significativamente independente ($p = 0,03$), associada a um risco relativo de morte aproximadamente duas vezes maior para os pacientes que possuem uma expressão aumentada da proteína ARNTL (Tabela 8). Foram também identificadas como variáveis independentes “Tamanho Tumoral”, “Estágio Clínico”, “Grau Fuhrman” e a “presença de metástase ao diagnóstico”, parâmetros clinicopatológicos

fortemente associados à sobrevida (BEDKE *et al.*, 2008; FICARRA; MARTIGNONI; *et al.*, 2005; FICARRA; SCHIPS; *et al.*, 2005; LANE, 2013)

Tabela 8: Análise univariada e multivariada para determinar associação entre a imunomarcagem de ARNTL e os parâmetros clinicopatológicos com a sobrevida câncer-específica de pacientes com CCRcc. Apenas as variáveis que mostraram uma significância $p \leq 0,10$ na análise univariada de KM foram utilizadas na análise multivariada. Variáveis com valores de $p \leq 0,05$ após análise multivariada foram consideradas significativas. Valores significativos e os resultados para a variável ARNTL estão em negrito.

Variáveis	<i>p-value</i>	HR ou RR (95% CI) ^a
Análise Univariada ^b		
Estadio clínico ^c	< 0,001	0,08 (0,03 – 0,21)
Metástase ao diagnostico	< 0,001	0,008 (0,002 – 0,03)
Tamanho Tumoral (7cm cut off)	< 0,001	0,09 (0,03 – 0,23)
Grau Fuhrman	< 0,001	0,13 (0,05 – 0,36)
ECOG ^d	< 0,001	0,20 (0,07 – 0,51)
Linfonodos +/-	< 0,001	0,02 (0,004 – 0,11)
Necrose Tumoral	< 0,001	0,21 (0,09 – 0,52)
Tumor Incidental	0,002	0,27 (0,11 – 0,63)
Positividade ARNTL	0,031	0,20 (0,04 – 0,87)
Idade ^e	0,084	0,46 (0,19 – 1,10)
Análise Multivariada		
Tamanho Tumoral	0,005	2,76 (1,68 – 21,08)
Estadio Clínico ^c	0,013	2,76 (1,38 – 16,55)
Metástase ao diagnostico	0,023	2,26 (1,16 – 8,71)
Positividade ARNTL	0,034	2,15 (1,09 – 10,71)
Idade	0,133	1,49 (0,98 – 1,09)

^a Hazard Ratio (HR) e Relative Risk (RR) calculados nas análises univariada e multivariada, respectivamente.

^b Curvas de KM foram avaliadas na análise univariada. A significância foi testada utilizando o teste *log-rank*.

^c Para determinação do Estadio Clínico foi utilizado a classificação UICC (GUINAN *et al.*, 1997).

^d Eastern Cooperative Oncology Group performance status (OKEN *et al.*, 1982).

^e Para cálculo da curva de KM, a variável idade foi classificada em dois grupos (Tabela 9).

A comparação dos valores de positividade nos subgrupos de amostras de pacientes com melhor ou pior prognóstico revelou uma diferença significativa ($p < 0,0001$) entre as médias de imunomarcagem de ARNTL em cada grupo (Figura 12), de acordo com o esperado para o valor de corte de positividade utilizado.

Figura 12: Distribuição dos valores de positividade nas populações de pacientes CCRcc determinados pelo X-tile. As amostras de CCRcc com valores positividade $\geq 0,80$ correspondem a pacientes com uma pior sobrevida compara aos pacientes que apresentaram valores de positividade $< 0,80$. A barra transversal corresponde ao valor médio de “positividade” para cada grupo. A diferença Foi possível identificar que as duas populações possuem medias significativamente diferentes ($p < 0,001$).

IV.5.3. Associação da imunomarcção de ARNTL com variáveis clinicopatológicas nos pacientes com CCRcc

Uma vez identificada a “positividade de ARNTL” como variável independente associada à sobrevida câncer-específica nos pacientes com CCRcc, fomos investigar se os subgrupos de pacientes identificados anteriormente mostram uma associação com as demais variáveis anatomopatológicas utilizadas na clínica. Para as análises de tabelas de contingencia o teste de Qui-quadrado foi utilizado (ver Materiais e Métodos, seção III.15).

Nossos resultados não mostraram associação significativa entre a imunomarcção de ARNTL e nenhuma das variáveis anatomopatológicas. A variável ECOG mostrou uma associação marginalmente significativa ($p = 0,066$) onde 68% dos pacientes que apresentaram uma positividade $< 0,80$ (60 de 88 no total) apresentaram um status ECOG 0 (Tabela 9).

Tabela 9: Associação entre a variável de imunomarcacão para ARNTL e parâmetros clinicopatológicos em amostras de CCRcc presentes na lâmina de TMA.

Variável	Total (n = 102)	Número de casos		p-value ^a
		Imunomarcacão ARNTL		
		Positividade < 80 (n = 88)	Positividade ≥ 80 (n = 14)	
Idade				0,181
Faixa 30 - 54	46	42 (48%)	4 (29%)	
Faixa 55 - 72	56	46 (52%)	10 (72%)	
Anos, media (± d.p.)		55,0 (±11,1)	59,2 (±10,8)	
ECOG ^b				0,066
0	66	60 (68%)	6 (43%)	
1 – 2	36	28 (32%)	8 (57%)	
Metástase ao diagnóstico				0,214
Não	87	77 (88%)	10 (86%)	
Sim	15	11 (12%)	4 (29%)	
Tamanho do tumor (cm)				0,288
< 7cm	64	57 (65%)	7 (50%)	
> 7cm	38	31 (35%)	7 (50%)	
Tumor Incidental *				0,394
Ausente	50	45 (51%)	5 (38%)	
Presente	51	43 (49%)	8 (62%)	
Necrose tumoral				0,371
Ausente	55	49 (56%)	6 (43%)	
Presente	47	39 (44%)	8 (57%)	
Grau Fuhrman				0,372
1 – 2	69	61 (69%)	8 (57%)	
3 – 4	33	27 (31%)	6 (43%)	
Invasão da Veia Renal				0,381
Não	89	78 (89%)	11 (79%)	
Sim	13	10 (11%)	3 (21%)	
Estadio Clínico ^c				0,519
I – II	65	55 (63%)	10 (71%)	
III – IV	37	33 (37%)	4 (29%)	
Linfonodos ^d				0,987
Negativo	91	78 (89%)	13 (93%)	
Positivo	11	10 (11%)	1 (07%)	

As porcentagens das variáveis estão representadas entre parênteses. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão mostrados em negrito. ±d.p. desvio padrão. Asterisco indica ausência de dados na variável (n = 101).

^a Para determinação de associação entre as variáveis anatomopatológicas e a marcação por ARNTL o teste de Qui-quadrado foi utilizado. Quando as variáveis apresentaram menos de $n < 5$ amostras para alguma das categorias avaliadas, foi utilizado o teste exato do Fisher.

^b Eastern Cooperative Oncology Group performance status (OKEN et al., 1982).

^c Para determinação do Estadio Clínico foi utilizado à classificação UICC (GUINAN et al., 1997).

^d Linfonodos negativo corresponde à ausência de invasão tumoral nos linfonodos, ou a ausência de linfonodos na peça cirúrgica após a nefrectomia. Linfonodos positivo indica a presença de invasão tumoral nos linfonodos.

IV.6. Caracterização de EPAS1 como marcador de prognóstico no CCR.

IV.6.1. Determinação da expressão proteica de EPAS1 por imunohistoquímica.

A expressão da proteína EPAS1 foi avaliada em amostras clínicas de pacientes com câncer renal utilizando o TMA 2, contendo 192 amostras de CCR e 64 amostras pareadas de tecido renal não tumoral (borda livre de tumor do mesmo paciente). Os resultados de IHQ em lâminas de TMA foram analisados com o equipamento APERIO (ver Materiais e Métodos, seção III.13). Cento e sessenta e oito amostras tumorais (88% do total) e 53 amostras não tumorais (83% do total) resultaram em spots avaliáveis e foram analisados em maior detalhe.

Utilizando scores de imunomarcacão determinados pelas metodologias positividade e *H-score*, foi detectado um aumento significativo ($p < 0,01$) da expressão de EPAS1 nas amostras tumorais comparadas às amostras não tumorais de rim, tanto no conjunto total de amostras presentes no TMA (Figura 13), como também no subconjunto 36 amostras tumor/não tumor pareadas provenientes do mesmo paciente (Figura 14).

Figura 13: Expressão relativa de EPAS1 no conjunto total de amostras tumorais e não tumorais de rim detectadas na lâmina de TMA. (A) “positividade” e (B) *H-score*. Para determinação da significância estatística ($p < 0,05$) foi utilizado: (A) teste de Mann-Whitney (*U-test*), (B) teste *t* não pareado (para detalhes, ver o item III.15 dos Materiais e Métodos).

Figura 14: Expressão relativa de ARNTL no subconjunto de 34 amostras pareadas tumor/não tumor provenientes do mesmo paciente, contidas na nossa lâmina de TMA. (A) “positividade” e (B) *H-score*. Para determinação da significância estatística ($p < 0,05$) foi utilizando (A) teste *t* pareado e (B) teste pareado de Wilcoxon (para detalhes, ver o item III.15 dos Materiais e Métodos).

IV.6.2. Avaliação do valor prognóstico da proteína EPAS1 nos pacientes com CCRcc.

Utilizando os diferentes graus de imunomarcção detectados nas amostras de CCRcc, fomos investigar se existem grupos de pacientes com sobrevidas diferentes em curvas de KM. As análises foram realizadas utilizando somente o conjunto de pacientes do subtipo de célula clara. Dos 168 *spots* avaliáveis presentes na nossa lâmina de TMA, 116 (70%) correspondem a amostras de CCRcc. Para determinação dos valores de corte para cada uma das populações de pacientes foi empregado à ferramenta *X-tile* (ver Materiais e Métodos, seção III.14).

As curvas de KM para sobrevida global utilizando os valores de *H-score* não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,08$; Figura 15, painel B). No entanto, quando a sobrevida câncer-específica foi avaliado utilizando a mesma variável de *H-score*, foi observada uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$) entre as curvas de KM, onde

pacientes com uma imunomarcção aumentada de EPAS1 ($H\text{-score} > 200$) apresentaram uma sobrevida menor (Figura 15, painel D).

Utilizando a variável de imunomarcção positividade foi possível observar duas populações de pacientes com curvas de sobrevidas significativamente diferentes ($p < 0,05$) tanto na sobrevida global (Figura 15, painel A) quanto na sobrevida câncer-específica (Figura 15, painel C); novamente se observando que pacientes CCRcc com expressão aumentada da proteína EPAS1 apresentaram uma sobrevida menor.

Figura 15: Curvas de sobrevida de pacientes com CCRcc em função do padrão de imunomarcção de EPAS1. Foram construídas curvas KM para (A) sobrevida global e (B) sobrevida câncer-específica, utilizando os valores contínuos de expressão determinados pelo ACIS III. Os valores de corte utilizados foram determinados pelo programa *X-tile* (para detalhes ver item III.14 nos Materiais e Métodos). Para determinação de significância estatística ($p < 0,05$) na comparação entre as curvas de KM foi utilizado o teste de *log-rank*.

Para determinar se os valores de positividade ou de $H\text{-score}$ correspondem a variáveis independentes que explicam sobrevida, foi realizado o teste multivariado de Cox (ver Materiais e Métodos, seção III.15). Novamente, apenas as variáveis que apresentaram um valor de $p < 0,10$ na análise de sobrevida câncer-específica (Tabela 10, análise univariada)

foram utilizadas nas análises multivariada de Cox. Nossos resultados mostraram que a variável positividade de imunomarcção de EPAS1 foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) como variável explicativa independente da sobrevida (Tabela 10).

Tabela 10: Análise univariada e multivariada para determinar associação entre a imunomarcção de EPAS1 e os parâmetros clinicopatológicos com a sobrevida câncer-específica de pacientes com CCRcc. Apenas as variáveis que mostraram uma significância $p \leq 0,10$ na análise univariada de KM foram utilizadas na análise multivariada. Variáveis com valores de $p \leq 0,05$ após análise multivariada foram consideradas significativas. Valores significativos e os resultados para a variável EPAS1 estão em negrito.

Variáveis	p-value	HR or RR (95% CI) ^a
Análise Univariada ^b		
Estadio clínico ^c	< 0,001	0,08 (0,03 – 0,22)
Metástase ao diagnostico	< 0,001	0,002 (0,001 – 0,01)
Tamanho Tumoral (7cm cut off)	< 0,001	0,09 (0,03 – 0,22)
Grau Fuhrman	< 0,001	0,10 (0,04 – 0,28)
ECOG ^d	< 0,001	0,18 (0,07 – 0,46)
Linfonodos +/-	< 0,001	0,01 (0,003 – 0,08)
Necrose Tumoral	< 0,001	0,19 (0,08 – 0,45)
Invasão Veia Renal	0,002	0,12 (0,03 – 0,47)
Tumor Incidental	0,002	0,25 (0,10 – 0,60)
Positividade EPAS1	0,004	0,21 (0,07 – 0,61)
H-score EPAS1	0,031	0,27 (0,08 – 0,89)
Análises Multivariada		
Metástases ao diagnostico	< 0,001	3,76 (2,66 – 22,24)
Grau Fuhrman	0,016	2,40 (1,24 – 8,88)
Positividade EPAS1	0,028	2,18 (1,11 – 6,81)
Estadio Clínico	0,054	1,91 (0,97 – 11,61)

^a Hazard Ratio (HR) e Relative Risk (RR) calculados nas análises univariada e multivariada, respectivamente.

^b Curvas de KM foram avaliadas na análise univariada. A significância foi testada utilizando o teste *log-rank*.

^c Para determinação do Estadio Clínico foi utilizado a classificação UICC (GUINAN *et al.*, 1997).

^d Eastern Cooperative Oncology Group performance status (OKEN *et al.*, 1982).

A comparação dos valores de imunomarcção nos subgrupos de amostras de pacientes com melhor ou pior prognóstico identificadas utilizando o *X-tile*, revelou uma diferença significativa ($p < 0,0001$) entre as médias de imunomarcção em cada grupo (Figura 16), de acordo com o esperado para o valor de corte de “positividade” utilizado.

Figura 16: Distribuição dos valores de positividade nas populações de pacientes CCRcc determinados pelo X-tile. As amostras de CCRcc com valores positividade $\geq 0,95$ correspondem aos pacientes com uma pior sobrevida compara aos pacientes que apresentaram valores de positividade $< 0,95$. A barra transversal corresponde ao valor médio de “positividade” para cada grupo. A diferença Foi possível identificar que as duas populações possuem medias significativamente diferentes ($p < 0,001$).

IV.5.3. Associação da expressão de EPAS1 com variáveis clinicopatológicas nos pacientes com CCRcc

Para investigar se os subgrupos de pacientes com CCRcc apresentam associação entre as variáveis anatomopatológicas utilizadas na clínica e os valores de positividade para EPAS1 (variável que se mostrou independentemente associada à sobrevida câncer-específica), tabelas de contingencia foram construídas e foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado (ver Materiais e Métodos, seção III.15).

Foi possível observar uma associação significativa ($p < 0,05$) entre a imunomarcção de EPAS1 quantificada pela positividade e as variáveis anatomopatológicas: "Idade", "Grau Fuhrman", "Necrose Tumoral", "Estadio Clínico", "*status* ECOG" e "Invasão da Veia Renal" (Tabela 11). Pacientes com CCRcc que apresentaram tumores com positividade da proteína EPAS1 < 95 foram significativamente associados a tumores com baixos grau Fuhrman (62 de 82, 77%), estadio clínico (59 de 82, 72%), e *status* de ECOG (58 de 82, 71%), além de ausência de necroses tumoral (50 de 82, 61%) e sem presença de invasão de células malignas na veia renal (75 de 82, 92%).

Tabela 11: Associação entre a variável de imunomarcção para EPAS1 e parâmetros clinicopatológicos em amostras de CCRcc presentes na lâmina de TMA.

Variável	Total (n = 112)	Número de casos		p-value ^a
		Imunomarcção EPAS1		
		Positividade <95 (n = 82)	Positividade ≥95 (n = 30)	
Idade				0,004
Faixa 30 - 54	51	44 (54%)	7 (23%)	
Faixa 55 - 72	61	38 (46%)	23 (77%)	
Anos, media (± d.p.)		53,5 (±11,9)	60,1 (±9,1)	
Grau Fuhrman *				0,003
1 – 2	76	62 (77%)	14 (46%)	
3 – 4	35	19 (23%)	16 (53%)	
Necrose Tumoral				0,004
Ausente	59	50 (61%)	9 (30%)	
Presente	53	32 (39%)	21 (70%)	
Estadio Clínico ^b				0,005
I – II	72	59 (72%)	13 (43%)	
III – IV	40	23 (28%)	17 (57%)	
ECOG ^c				0,008
0	71	58 (71%)	13 (43%)	
1 – 2	41	24 (29%)	17 (57%)	
Invasão da Veia Renal				0,024
Não	97	75 (92%)	22 (73%)	
Sim	15	7 (09%)	8 (27%)	
Tumor Incidental *				0,117
Ausente	56	45 (55%)	11 (38%)	
Presente	55	37 (45%)	18 (62%)	
Tamanho do tumor (cm)				0,143
< 7cm	72	56 (68%)	16 (53%)	
> 7cm	40	26 (32%)	14 (47%)	
Metástase ao diagnóstico				0,361
Não	96	72 (88%)	24 (80%)	
Sim	16	10 (12%)	6 (20%)	
Linfonodos ^d				0,730
Negativos	100	74 (90%)	26 (87%)	
Positivos	12	8 (10%)	4 (13%)	

As porcentagens das variáveis estão representadas entre parênteses. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão mostrados em negrito. ±d.p. desvio padrão. Asterisco indica ausência de dados para a variável (n = 101).

^a Para determinação de associação entre as variáveis anatomopatológicas e a marcação por ARNTL o teste de Qui-quadrado foi utilizado. Quando as variáveis apresentaram menos de $n < 5$ amostras para alguma das categorias avaliadas, foi utilizado o teste exato do Fisher.

^b Para determinação do Estadio Clínico foi utilizado a classificação UICC (GUINAN *et al.*, 1997).

^c Eastern Cooperative Oncology Group performance status (OKEN *et al.*, 1982).

^d Linfonodos negativo corresponde à ausência de invasão tumoral nos linfonodos, ou a ausência de linfonodos na peça cirúrgica após a nefrectomia. Linfonodos positivo indica a presença de invasão tumoral nos linfonodos.

IV.7. Caracterização de CASP7 como marcador de prognóstico no CCR.

IV.7.1. Determinação da expressão proteica de CASP7 por imunohistoquímica.

A imunomarcção de CASP7 em amostras clínicas de CCR foi avaliada utilizando a lâmina de TMA 2, contendo 192 amostras clínicas de pacientes com tumor renal, assim como 67 amostras de tecido renal não tumoral (64 amostras pareadas proveniente dos mesmos pacientes).

Os resultados foram interrogados visualmente (ver Materiais e Métodos, seção III.11) e exemplos para os valores de *score* visual de imunomarcção detectados para CASP7 encontrasse representados na Figura 17. No total, foram identificados 165 *spots* tumorais avaliáveis (86% do total) na lâmina de TMA, sendo 120 amostras de CCRcc e 45 amostras correspondentes a outros subtipos histológicos de CCR. Adicionalmente, os resultados de IHQ foram coletados utilizando uma abordagem quantitativa para valores contínuos de imunomarcção através do programa de análise ACIS III (ver Materiais e Métodos, seção III.12). Foi observada uma alta correlação entre as medidas de imunomarcção por *score* visual e o ACIS III (Figura 17, painel F). Em função da mais fácil aplicabilidade da quantificação visual na rotina clínica, optamos por utilizar os valores de imunomarcção obtidos por este método nas análises subsequentes.

A expressão de CASP7 foi detectada em todas as amostras não tumorais (*score* ≥ 3 , Tabela 12). Em contraste, 26% das amostras de CCRcc e 18% das amostras provenientes de outros subtipos histológicos não CCRcc não apresentaram imunomarcção (*score* 0). Foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) da expressão relativa de CASP7 nas amostras de CCR do subtipo células claras assim como nas amostras com outros subtipos histológicos (Tabela 12).

Figura 17: Exemplos de padrões de imunomarcção de CASP7 obtidos nos experimentos de IHQ na lâmina de TMA (A–E). Correlação entre os valores de imunomarcção determinados visualmente ou de forma automática (F). O *score* visual detectado nas amostras de pacientes com CCR foi avaliado como: negativo (painel A), *score* 2 (painel B), *score* 2 (painel B), *score* 3 (painel C). Os *scores* de imunomarcção para CASP7 de 4 (painel D) e 5 (painel E) foram detectados apenas nas amostras de tecido não tumoral de rim. A barra de escala representa 50um. Foi observada uma correlação positiva e significativa (Sperman $r = 0,8961$, $p < 0,0001$) entre os valores discretos de imunomarcção determinados por inspeção visual ou valores contínuos determinados pelo programa de análise ACIS III (painel F). No gráfico, as caixas representam o primeiro e terceiro quartil, a linhas horizontais correspondem à mediana e os pontos mostram os valores de *score* considerados “*outliers*”.

Tabela 12: Scores visuais obtidos nas amostras de CCR determinado pela imunomarcção de CASP7.

	Total (n = 235)	Imunomarcção de CASP7				<i>p</i> -value**
		score 0 (n = 39)	score 2 (n = 63)	score 3 (n = 81)	score ≥ 4 (n = 48)	
Subtipo histológico						
CCRcc	120	31 (26%)	49 (41%)	39 (32%)	1 (1%)	< 0,0001
não CCRcc*	45	8 (18%)	14 (31%)	20 (44%)	3 (7%)	< 0,0001
não tumor	66	-	-	22 (33%)	34 (67%)	

* não ccRCC: 18 cromofobos, 14 papilífero, 10 não classificados, 2 TTE3 translocação e 1 dutos coletores.

**Mann-Whitney U-test.

A diminuição significativa ($p < 0,0001$) da expressão de CASP7 nas amostras tumorais também foi detectada no subconjunto de amostras tumorais/não tumorais pareadas provenientes do mesmo paciente, tanto nas 34 amostras de CCRcc (Figura 18, painel A) como nas amostras provenientes de outros subtipos histológicos (Figura 18, painel B).

Figura 18: Expressão de CASP7 no subconjunto de amostras pareadas tumorais e não tumorais de CCRcc detectadas na lâmina de TMA. As comparações foram realizadas (A) no conjunto de 34 amostras de CCRcc e (B) em 16 amostras provenientes de outros subtipos histológicos (6 cromóforas e 8 papilífero).

IV.7.2. Associação da expressão de CASP7 com variáveis clinicopatológicas nos pacientes com CCR

Como descrito anteriormente, 31 amostras CCRcc (26%) apresentaram *score* de marcação 0 (negativo). As restantes 89 amostras de CCRcc que tiveram *scores* de marcação compreendido entre 2 a 4, foram agrupadas na categoria de “positivas” para imunomarcação de CASP7 (Tabela 13). Para determinar se a marcação por CASP7 possui associação com alguma das variáveis anatomopatológicas utilizadas na clínica, foi realizado o teste de Qui-quadrado (ver Materiais e Métodos, seção III.15).

Nossos resultados mostraram uma associação significativa entre a imunomarcação de CASP7 e as variáveis anatomopatológicas: tamanho tumoral ($p < 0,001$), estadio clínico ($p = 0,002$), tumor incidental ($p = 0,001$), necrose tumoral ($p = 0,012$) e invasão da veia renal ($p = 0,019$) (Tabela 13). As amostras proveniente de pacientes com CCRcc que apresentaram imunomarcação negativa para CASP7 foram significativamente associadas com a presença de tumores $> 7\text{cm}$ (22 de 31, 71%), necróticos (21 de 31, 68%), de estadio clínicos avançados (19 de 31, 61%) e diagnosticados não incidentalmente (26 de 31, 84%).

Tabela 13: Associação entre a variável de imunomarcção para CASP7 e parâmetros clinicopatológicos em amostras de CCRcc presentes na lâmina de TMA.

Variável	Total (n = 120)	Número de casos		p-value ^b
		Imunomarcção CASP7 ^a		
		Negativo (n = 31)	Positivos (n = 89)	
Idade				0,078
Faixa 30 - 54	51	9 (29%)	42 (47%)	
Faixa 55 - 72	69	22 (71%)	47 (53%)	
Anos, média (± d,p,)		58,3 (±11,6)	54,7 (±10,6)	
Tamanho do tumor (cm)				< 0,001
< 7cm	73	9 (29%)	64 (72%)	
> 7cm	47	22 (71%)	25 (28%)	
Tumor Incidental				0,001
Ausente	69	26 (84%)	43 (48%)	
Presente	51	5 (16%)	46 (52%)	
Estadio Clínico ^c				0,002
I – II	74	12 (39%)	62 (70%)	
III – IV	46	19 (61%)	27 (30%)	
Necrose tumoral				0,012
Ausente	62	10 (32%)	52 (58%)	
Presente	58	21 (68%)	37 (42%)	
Invasão da Veia Renal				0,019
Não	101	22 (71%)	79 (89%)	
Sim	19	9 (29%)	10 (11%)	
Linfonodos ^d				0,416
N0	84	16 (84%)	68 (91%)	
N+	10	3 (16%)	7 (09%)	
NX	26	-	-	
Grau Fuhrman [*]				0,708
1 – 2	80	21 (70%)	59 (66%)	
3 – 4	39	9 (30%)	30 (34%)	
Metástase ao diagnóstico				0,937
Não	105	27 (87%)	78 (88%)	
Sim	15	4 (13%)	11 (12%)	

As porcentagens das variáveis estão representadas entre parênteses. Os valores significativos ($p < 0,05$) estão mostrados em negrito. $\pm$ d.p. desvio padrão. Asterisco indica ausência de dados para a variável em um paciente (n = 101).

^a Imunomarcção de CASP7: "Negativo" para amostras com *score* 0; "Positivo" amostras com *score* 2 o 3.

^b Para determinação de associação entre as variáveis anatomopatológicas e a marcação por CASP7 o teste de Qui-quadrado foi utilizado. Quando as variáveis apresentaram menos de $n < 5$ amostras para alguma das categorias avaliadas, foi utilizado o teste exato do Fisher.

^c Para determinação do Estadio Clínico foi utilizado à classificação UICC (GUINAN *et al.*, 1997)

^d Linfonodos N0, corresponde ausência de linfonodos positivos na peça cirúrgica após a nefrectomia; N+, linfonodos positivos; NX, ausência de linfonodos na peça cirúrgica após a nefrectomia.

IV.7.3. Avaliação do valor prognóstico da proteína CASP7 nos pacientes com CCRcc.

Para investigar se existem grupos de pacientes com sobrevidas diferentes nas amostras de CCRcc, curvas de KM foram construídas entre os grupos de pacientes que apresentaram imunomarcção positiva ou negativa para CASP7 (Tabela 13). Foi possível observar diferenças significativas entre as curvas de sobrevidas global ($p = 0,047$; Figura19, painel A e Tabela 14) e sobrevida câncer-específica ($p = 0,032$; Figura19, painel B), onde pacientes que apresentaram uma imunomarcção negativa para CASP7 apresentaram uma pior sobrevida.

Figura 19: Curvas de sobrevida de pacientes com CCRcc em função do padrão de imunomarcção de CASP7. Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para (A) sobrevida global e (B) sobrevida câncer-específica, utilizando os valores de *score* visual definidos como "negativo" (*score* 0) e "positivo" (*score* 2, 3 e 4). Para determinação de significância estatística ($p < 0,05$) na comparação entre as curvas de KM foi utilizado o teste *log-rank*.

Para determinar se o *score* visual de CASP7 corresponde a uma variável explicativa da sobrevida independente, foi utilizada a análise multivariada de Cox (ver Materiais e Métodos, seção III.15). Não foi possível observar uma associação significativamente independente entre a variável de *score* visual de imunomarcção para CASP7 e a sobrevida de pacientes com CCRcc (Tabela 14). Apenas as variáveis "Estadio Clínico", "Necrose Tumoral" e presença de "metástase ao diagnóstico" se mostraram independentes no teste multivariado de Cox (Tabela 14).

Tabela 14: Análise univariada e multivariada para determinar associação entre a imunomarcção de CASP7 e os parâmetros clinicopatológicos com a sobrevida câncer-específica de pacientes com CCRcc. Apenas as variáveis que mostraram uma significância $p \leq 0,10$ na análise univariada de KM foram utilizadas na análise multivariada. Variáveis com valores de $p \leq 0,05$ após análise multivariada foram consideradas significativas. Valores significativos e os resultados para a variável CASP7 estão em negrito.

Variável	p -value ^a	HR or RR (95% CI) ^b
Análises Univariada ^c		
Metástases ao diagnóstico	< 0,001	0,004 (0,001 – 0,02)
Necrose Tumoral	< 0,001	0,18 (0,08 – 0,45)
Tamanho tumoral (cm)	< 0,001	0,11 (0,04 – 0,28)
Estágio Clínico ^d	< 0,001	0,14 (0,06 – 0,33)
Grau de Fuhrman	< 0,001	0,14 (0,05 – 0,38)
Recorrência	0,001	0,19 (0,07 – 0,52)
Invasão da Veia Renal	0,002	0,15 (0,04 – 0,52)
ECOG ^e	0,004	0,25 (0,10 – 0,64)
Tumor Incidental	0,006	0,29 (0,12 – 0,71)
CASP7 score	0,032	2,87 (1,09 – 7,56)
Idade ^f	0,049	0,42 (0,17 – 0,99)
Análises Multivariada		
Metástases ao diagnóstico	< 0,001	3,64 (2,47 – 19,17)
Necrose Tumoral	0,013	2,46 (1,43 – 24,53)
Estágio Clínico	0,030	2,15 (1,14 – 17,95)

^a A significance threshold of $p < 0,05$ was used in all analyses.

^b *Hazard Ratio* (HR) e *Relative Risk* (RR) calculados nas análises univariada e multivariada, respectivamente.

^c As curvas de sobrevida de Kaplan-Meier foram aplicadas nas análises univariadas. A significância foi testada utilizando o log-rank test.

^d Para determinação do Estadio Clínico foi utilizado a classificação UICC (GUINAN *et al.*, 1997).

^e Eastern Cooperative Oncology Group performance status (OKEN *et al.*, 1982).

^f Para cálculo da curva de KM, a variável idade foi classificada em dois grupos (Tabela 13).

Embora a variável de imunomarcção para CASP7 não tenha apresentado significância estatística na análise multivariada, decidimos testar se os níveis de expressão de CASP7 poderiam ser usados para substratificar pacientes com baixo e alto grau de Fuhrman ou estadio clínico em função da sobrevida, fornecendo assim uma informação prognóstica adicional. Interessantemente, foi possível observar que os pacientes com baixo estadio clínico, que apresentam um prognóstico mais favorável, podem ser substratificados com significância estatística ($p = 0,045$) em função da sobrevida câncer-específica utilizando o padrão de imunomarcção de CASP7 como variável (Figura 20, painel A). Pacientes com baixo estadio clínico que apresentam imunomarcção negativa para CASP7, possuem um pior

prognóstico nas curvas de KM câncer-específica (2 paciente morto e pacientes 7 vivos, 78% de sobrevida após 5 da cirurgia) comparada aqueles com marcação positiva para CASP7 (1 paciente morto e 16 pacientes vivos, 94% de sobrevida após 5 da cirurgia). Não foram observadas curvas de KM com significância estatística para subgrupos de pacientes CCRcc com alto estadio clínico (Figura 20, painel B) ou baixo/alto grau Fuhrman (Figura 20, painel C e D) estratificados pela imunomarcação por CASP7.

Figura 20: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes CCRcc com baixo/alto grau Fuhrman ou estadio clínico, estratificados pela marcação com CASP7. Os pacientes foram agrupados em baixo grau Fuhrman (painel A), alto grau Fuhrman (painel C), baixo estadio clínico (painel B) e alto estadio clínico (painel D). Para determinação de significância estatística ($p < 0,05$) na comparação entre as curvas de KM foi utilizado o teste *log-rank*.

A presença de recorrência da doença após a remoção cirúrgica do tumor primário influencia negativamente a sobrevida dos pacientes. Nosso conjunto de amostras é heterogêneo, contendo pacientes com e sem recorrência no período de 5 anos após a cirurgia. Adicionalmente, fomos investigar se o padrão de imunomarcação de CASP7 permite

subestratificar grupos de pacientes com ou sem recorrência após a nefrectomia em função da sobrevida.

Figura 21: Análise de Kaplan-Meier dos pacientes CCRcc que apresentaram ou não recorrência em até 5 anos após a cirurgia. As amostras foram estratificadas pela imunomarcagem de CASP7 em grupos de pacientes sem recorrência (painel A) e com recorrência (painel B) em até 5 anos após a cirurgia. Estratificações utilizando as variáveis de grau Fuhrman (painel C) ou estadio clínico (painel D) foram realizadas em pacientes que apresentaram recorrência em até 5 anos após a cirurgia. Para determinação de significância estatística ($p < 0,05$) na comparação entre as curvas de KM foi utilizado o teste *log-rank*.

Pacientes sem recorrência após a cirurgia, não mostraram diferenças nas suas curvas de sobrevida (Figura 21, painel A). Os mesmos resultados foram observados em pacientes sem recorrência, estratificados pelo grau Fuhrman ou estadio clínico (dados não mostrados). Por outro lado, para o grupo de pacientes que apresentaram recorrência em até 5 anos após cirurgia, foi possível observar uma diferença significativa nas sobrevidas câncer-específica ($p = 0,018$) quando estratificados pela imunomarcagem de CASP7 (Figura 21, painel B). Utilizando o mesmo conjunto de pacientes com recorrência, as variáveis de grau Fuhrman e

estadio clínico, não foram capazes de estratificar significativamente os pacientes pelas sobrevidas (Figura 21, painel C e D respectivamente).

A fim de avaliar se os padrões de imunomarcção de CASP7 observados no TMA são representativos da expressão da proteína na massa tumoral e não contem viéses associados à seleção de regiões do tumor para construção do TMA, decidimos realizar experimentos utilizando cortes do fragmento inteiro (*whole mount*) seguido de IHQ.

Experimentos de IHQ em 31 das 39 amostras de pacientes que apresentaram *score* negativo para CASP7 (79% do total) resultaram na ausência homogênea de imunomarcção, sem pontos focais de coloração, corroborando os resultados obtidos no TMA (Figura 22, painel A e B). Por outro lado, experimentos de *whole mount* com amostras que apresentaram *scores* de marcação positivos para CASP7 no TMA revelaram uma marcação homogênea ao longo de todo o fragmento (Figura 22, painel C–F). Todas as amostras foram processadas em paralelo. Esses experimentos indicam que os padrões de expressão de CASP7 medidos no TMA representam adequadamente os padrões de expressão da proteína nos tumores.

Figura 22: Imagens representativas dos experimentos de IHQ utilizando o anticorpo anti-CASP7 em amostras completas de CCRcc. As amostras utilizadas nos experimentos de *whole mount* representam amostras com diferentes *scores* de marcação no TMA. (A–B) *score* negativo, (C–D) *score* 2, e (E–F) *score* 3. As imagens nos painéis horizontais representam diferentes ampliações. No painel da esquerda observa-se o corte inteiro no aumento de 20X. Os painéis centrais representam áreas próximas ao *core* retirado para construção do TMA (seta preta, painel esquerdo); magnificação de 40X (painel central esquerdo) e 400X (painel central direito). No painel direito foi capturada uma imagem correspondente a uma área aleatória que não se encontra próxima ao *core* retirado para a construção do TMA (seta vermelha, painel esquerdo) na magnificação de 400X.

V. DISCUSSÃO.

V.1. Validação de candidatos a biomarcadores de CCR por qPCR.

As plataformas de microarranjos de DNA, indiscutivelmente constituem umas das ferramentas mais importantes quando se deseja interrogar a expressão de milhares de genes ao mesmo tempo, a fim de avaliar quais transcritos encontram-se alterados sob determinadas condições experimentais, utilizando inclusive quantidades relativamente pequenas de material (CUPERLOVIC-CULF *et al.*, 2005). Porém, por se tratar de uma tecnologia de análise em larga escala altamente sensível, cada um dos passos do procedimento experimental pode influenciar nos resultados finais (BRAZMA *et al.*, 2001). Desde as sequências das sondas presentes na plataforma, passando pelas diferentes etapas de preparação das amostras até a hibridização, além das metodologias utilizadas na filtragem dos dados e análises estatísticas, assim como também a presença de artefatos experimentais tais como hibridizações inespecíficas (falsos positivos), todos podem vir a afetar significativamente nos resultados finais (BRAZMA *et al.*, 2001). Por tanto, é extremamente importante a realização de experimentos complementares de validação (DALLAS *et al.*, 2005).

A determinação da expressão gênica utilizando qPCR tem se convertido numa das ferramentas mais amplamente aceitas pela comunidade científica para confirmação dos resultados de expressão observados nos experimentos com microarranjos de DNA (MUTCH *et al.*, 2002; YUEN *et al.*, 2002). Vários trabalhos tem reportado que existe uma alta correlação (85% de concordância) entre os dados de expressão observados utilizando microarranjos de DNA e os resultados obtidos pela técnica de qPCR (DALLAS *et al.*, 2005; MOREY *et al.*, 2006; MUTCH *et al.*, 2002). Também é importante observar que aproximadamente 15% dos genes que não apresentam variações consideradas similares quando comparada entre as duas técnicas, podem ser devido a problemas metodológicos próprios de cada técnica (MOREY *et al.*, 2006).

Utilizando uma lâmina de microarranjos de DNA customizada, o nosso grupo identificou um conjunto de 64 genes diferencialmente expressos em amostras provenientes de seis pacientes com RCC do subtipo célula claras (BRITO *et al.*, 2008). Como parte deste trabalho de doutorado, foram selecionados nove candidatos dos 64 genes identificados como alterados nos pacientes com CCR, para realizar experimentos de validação utilizando a técnica de qPCR. Os experimentos de qPCR foram realizados utilizando um conjunto independentes de amostras provenientes de pacientes CCRcc (entre 8 a 13 amostras), além de 5 amostras adicionais correspondentes a pacientes de outros subtipos histológicos (2 papilífero, 2 sarcomatóides e 1 cromóforo). Para favorecer que as medidas de expressão avaliadas por qPCR sejam realizadas sobre as mesmas isoformas dos transcritos interrogado no microarranjo de DNA, todos os pares de *primers* utilizados nos experimentos de validação foram desenhados dentro da região compreendida pela sonda de DNA depositada no microarranjo (ETIENNE *et al.*, 2004).

Nossos resultados permitiram confirmar a expressão alterada de três (*ARNTL*, *ACTN4* e *EPAS1*) dos nove genes selecionados (33% do total) nas amostras de pacientes com CCR. Interessantemente, para os candidatos *ACTN4* e *EPAS1* (Figura 4, painel A e B respectivamente) a alteração da expressão gênica foi confirmada inclusive nas amostras provenientes de outros subtipos histológicos diferentes de células claras, expandindo assim os nossos resultados iniciais em outros subtipos não analisados anteriormente. A detecção de um biomarcador que seja universal para todos os subtipos histológicos de CCR seria de grande importância para utilização na clínica médica. Já para os candidatos *CASP7* e *VRK2*, embora fosse observada uma expressão significativamente ($p < 0,05$) aumentada nas amostras tumorais (Figura 5, painel A e B respectivamente), estes resultados se mostraram contrários aos determinados nos experimentos com microarranjos de DNA (Tabela 1).

O trabalho publicado por Brito *et al.*, permitiu a identificação de genes que estão desregulados independentemente da diferenciação ou do subtipo tumoral, além reportar pela primeira vez, a presença de transcritos não codificadores desregulados em pacientes com CCR (BRITO *et al.*, 2008). Uma das limitações daquele estudo foi à utilização de um numero reduzido de pacientes (6 amostras de CCRcc). Nossos experimentos de qPCR também contaram com uma limitação amostral, onde foi possível avaliar a expressão de apenas 15 pacientes com CCRcc, correspondendo a uma discreta amostragem da população. Mas, ao interrogar a expressão dos genes candidatos utilizando um universo modestamente maior de pacientes com RCC, podemos ter aumentado às chances de se achar valores de expressão que se localizam nas extremidades de uma curva gaussiana, influenciado assim os resultados das validações dos candidatos selecionados.

Outro ponto importante que pode ter influenciado na baixa taxa de validação, corresponde ao tipo de sondas utilizadas na lâmina customizada de microarranjos construída pelo nosso laboratório no trabalho anterior (BRITO *et al.*, 2008). As sondas de cDNA depositadas no microarranjo foram selecionados a partir de uma coleção de aproximadamente 1 milhão de clones de EST (*Expressed Sequence Tag*) sequenciados durante o projeto do genoma do câncer (CAMARGO *et al.*, 2001; DIAS-NETO *et al.*, 2000). Estas EST provem de bibliotecas de cDNA geradas a partir de transcritos de RNA poli(A) utilizando aproximadamente 20 tumores humanos diferentes. O tamanho médio das sondas depositadas no microarranjo foi de 600pb e correspondem a cDNAs de fita dupla. Embora a sensibilidade para detecção dos transcritos aumente com o tamanho da sonda, o incremento de tamanho também ocasiona uma diminuição da especificidade influenciada pela presença de hibridizações inespecíficas ao longo da extensão da sonda (CHOU *et al.*, 2004; RELOGIO *et al.*, 2002). Por exemplo, o gene *VRK2* apresentou um aumento significativo da sua expressão nas amostras tumorais (Figura 5, painel B). Interessantemente, a sonda depositada no

microarranjo para avaliar a expressão do *VRK2* mapeia nos dois últimos exons do gene, existindo uma sobreposição com o primeiro exon do gene *FANCL* localizado na fita oposta do mesmo *locus*. Experimentos de qPCR realizados para o gene *FANCL* permitiram observar um aumento significativo da expressão do transcrito nas amostras de pacientes com CCR (dados não mostrados). A existência de complementaridade entre os transcritos, assim como a competição pelo sitio de ligação na sonda de cDNA de fita dupla depositada no microarranjo, influenciada fortemente pelo aumento significativo da expressão de ambos dos transcritos nas amostras de CCR (confirmados pela avaliação individual dos genes usando a técnica de qPCR); podem ter sido as causas da ineficiente hibridização do transcrito *VRK2* com a sonda, resultando na aparente diminuição da sua expressão nos pacientes de CCR.

Também é importante ressaltar que os genes que apresentam níveis de expressão similares nos experimentos de microarranjos e RT-qPCR, não necessariamente mostrem a mesma amplitude de variação nas duas técnicas, reflexo da diferente cinética de hibridização de cada um deles com a respectiva sonda (DALLAS *et al.*, 2005). Interessantemente, o gene *CASP7* mostrou um nível de expressão similar do gene *ACTN4* ($\log_2$ da razão de T/N: -1,3 e -1,7 respectivamente), mas os experimentos de qPCR confirmaram significativamente a expressão diminuída para *ACTN4* enquanto que a expressão de *CASP7* observou-se significativamente aumentada nas amostras de CCRcc. Este tipo de mudanças de sentido já foram observadas anteriormente para resultados de expressão gênica utilizando microarranjos de DNA e qPCR, principalmente quando avaliado genes com taxas de expressão relativamente baixas (MOREY *et al.*, 2006). Pequenas variações nos níveis de mRNA são eficientemente detectados utilizando qPCR, enquanto que na técnica de microarranjos de DNA existe um pequeno intervalo de medidas (principalmente para genes que apresentam baixa expressão) onde pequenas mudanças na expressão não são detectadas de forma acurada (DALLAS *et al.*, 2005; YUEN *et al.*, 2002). As razões de expressão representadas em

$\log_2(T/N)$ de todos os genes selecionados para validação foram relativamente próximas e com valores próximos (Tabela 1).

Por fim, contar com linhagens celulares que recapitulem padrões de expressão gênica similares aos observados nos tecidos tumorais, representariam importantes ferramentas para determinação de novas vias de sinalização envolvidas na tumorigênese, descoberta de novos marcadores moleculares e ensaios funcionais para testar a eficácia de novas drogas terapêuticas, removendo todo tipo de influências associadas à heterogeneidade presentes nos tecidos (BANKS *et al.*, 2007). Assim, foram realizados experimento de qPCR utilizando diferentes linhagens celulares somente para os genes que apresentaram alterações significativas ($p < 0,05$) da sua expressão nas amostras tumorais de rim provenientes avaliadas no conjunto independentes de validação (*ARNTL*, *ACTN4*, *EPAS1* e *CASP7*). Foi possível observar (exceto para o gene *ACTN4*) que pelo menos uma das linhagens tumorais apresentou a expressão dos genes candidatos significativamente alterada em relação a uma linhagem não tumoral, similar ao observado na comparação entre amostras de CCR e tecido renal não tumoral (Figura 6). Interessantemente, a linhagem tumoral 769-P apresentou duas das alterações observadas nos pacientes, sendo expressão diminuída para o gene *EPAS1* e expressão aumentada para o gene *CASP7*.

V.2. Avaliação da expressão proteica dos biomarcadores candidatos em amostras de pacientes com CCR utilizando microarranjos de tecido.

A possibilidade de se estudar a expressão proteica em centenas de amostras de tecido contidas em apenas uma única lâmina de microscópio, tem tornado a metodologia do TMA num importante instrumento para o estudo de novos marcadores moleculares (KONONEN *et al.*, 1998). Com o objetivo de avaliar se os transcritos candidatos *ACTN4*, *EPAS1*, *ARNTL* e *CASP7* que se apresentaram significativamente alterados em amostras de pacientes e/ou linhagens celulares tumorais de rim nos experimentos de validação, encontram-se também

alterados ao nível proteico, foram realizados experimentos de IHQ em larga escala utilizando lâminas de TMA. Inicialmente foram utilizados TMAs contendo apenas 108 amostras de CCR (TMA 1) provenientes de pacientes com todos as informações epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas disponíveis. Durante este trabalho, foi possível expandir a casuística dos nossos estudos iniciais, utilizando uma nova lâmina de TMA (TMA 2) que possui aproximadamente o dobro do numero de amostras provenientes de pacientes com CCRcc (189 amostras de CCR no total) de pacientes com todos os dados epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas disponíveis. Apenas para o candidato ACTN4 os nossos resultados se limitaram ao uso da lâmina de TMA 1. Finalmente, a partir da disponibilidade dos dados clinicopatológicos dos pacientes analisados, foi possível investigar se existem grupos de pacientes com riscos diferentes de sobrevida, determinados pelo grau de imunomarcção das proteínas candidatas.

O uso correto da tecnologia de TMA é um ponto importante a se tomar em conta a fim de se obter resultados acurados e reproduzíveis para sua utilização na rotina clínica (TAYLOR; LEVENSON, 2006; WALKER, 2006). Bons experimentos de TMAs também estão diretamente influenciados pela coorte de amostras a partir dos qual este é criado (CAMP *et al.*, 2008). Foi possível verificar para nosso conjunto de amostras de CCRcc, curvas de sobrevida significativas ($p < 0,05$), compatíveis com as descritas na literatura para os marcadores clássicos como “Estadio Clínico” e o “Grau Nuclear de Fuhrman” (FICARRA; MARTIGNONI; *et al.*, 2005; FICARRA; SCHIPS; *et al.*, 2005; LANE, 2013). Adicionalmente, variáveis anatomopatológicas tais como: “presença de Necrose Tumoral”, “Invasão da Veia Renal”, “Tamanho do Tumor” e “Metástase ao Diagnóstico” também foram observadas estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nas análises uni e multivarias, para nossos conjuntos de amostras provenientes pacientes com CCRcc (BEDKE *et al.*, 2008; DA COSTA *et al.*, 2012). Esses resultados reforçam a ideia que a coorte de pacientes analisada é

representativa da população de pacientes com CCR, assim como também corroboram a correta classificação clínico-patológica realizada previamente ao início do trabalho para todas as mostras de CCR presentes na lâmina de TMA.

Em 15 anos do uso da ferramenta de TMA, não só tem aumentado exponencialmente o número de trabalhos publicados na literatura, como também têm surgido novas metodologias automatizadas para análise dos resultados (CAMP *et al.*, 2008; ROJO *et al.*, 2009). Diversos trabalhos publicados na literatura tem demonstrado que existe uma alta correlação entre os resultados obtidos entre a observação direta com uso do microscópio e a determinação dos valores de imunomarcação utilizando programas informáticos (ALVARENGA *et al.*, 2013; TURBIN *et al.*, 2008). Todas as lâminas de TMA analisadas durante este trabalho tiveram seus resultados avaliados utilizando metodologias de quantificação automatizadas acopladas a um programa para determinação dos *score* de marcação, tais como o ACIS III (DAKO) e o Aperio (ScanScope). A utilização destas tecnologias elimina possíveis variabilidades inerentes associadas à subjetividade ou fadiga do observador, ou interferências de fatores externos como correta iluminação, aumento do objetivo utilizado na inspeção da lâmina e detecção do sinal acima do ruído (ALVARENGA *et al.*, 2013; CREGGER *et al.*, 2006). Os métodos automatizados permitem também acessar as intensidades da marcação numa escala contínua e não apenas discreta para cada *spot* presente na lâmina.

Os métodos semiquantitativos utilizados comumente para avaliação dos resultados de IHQ tentam reproduzir a natureza contínua da expressão do biomarcador. Contudo, os resultados de categorização tem um componente de subjetividade própria de cada observador e não refletem acuradamente a natureza contínua das medidas (CREGGER *et al.*, 2006). A utilização de instrumentos que capturam imagens em alta resolução acopladas a programas de análise permitem aumentar a faixa de intensidades possíveis de identificar além de detectar valores sutis afetados por pequenas variações de luz (RIMM, 2006). A determinação de

valores de imunomarcacão quantitativos e contínuos permite também ter uma aproximao similar às observadas quando avaliada os mesmos biomarcadores em ensaios bioquímicos, importantes medidas de quantificao utilizadas para seleo das terapias endocrinológicas (RIMM *et al.*, 2007).

A utilizao dos valores semiquantitativos discretos de imunomarcacão facilita nas analises posteriores, quando são testados para cada categoria discreta, se a expressão proteica do candidato a biomarcador permite classificar os pacientes em diferentes grupos de riscos em funo da sobrevida. Embora os valores de imunomarcacão contínuos reflitam acuradamente os padrões de expressão das proteínas presentes nas amostras, estes podem não apresentar evidencias que permitam identificar facilmente as categorias de expressão. Assim, para determinar acuradamente quais valores de expressão permitem classificar os pacientes em diferentes grupos de riscos utilizando as variáveis quantitativas continuas, procuramos qual  o melhor valor de corte (imunomarcacão) que permite separar estatisticamente subgrupos de pacientes em funo da sobrevida (MAZUMDAR; GLASSMAN, 2000), utilizando o programa de análise *X-Tile* (CAMP *et al.*, 2004).

A correta categorizao das variáveis prognósticas além de determinar o valor de corte pode também influenciar no grau de acerto do classificador, afetando assim a atribuo correta do paciente a um determinado grupo de risco. Classificaes tais como o *H-score* tentam representar uma escala continua de expressão, embora apenas seja uma aproximao subjetiva das medidas de expressão continuas observada nas amostras. Os candidatos ARNTL e EPAS1 foram avaliados em TMAs analisados em um leitor de lâminas que permite a obteno de valores categóricos (*H-score*) e contínuos (positividade) de imunomarcacão. Nossos resultados mostraram que embora seja possível separar grupos de pacientes em funo da sobrevida nas analises univariadas utilizando os valores de *H-score*, apenas os valores contínuos de positividade de imunomarcacão se mostraram significativamente independentes

nas análises multivariadas. Este resultado indica que a categorização das amostras resulta em subgrupos heterogêneos de expressão, distinguíveis apenas quando são utilizados valores contínuos de imunomarcação.

Finalmente, um dos pontos a se considerar com respeito aos experimentos de IHQ em lâminas de TMA, refere-se a possível limitação na preservação correta e acurada das características histológicas originalmente presentes no tecido tumoral avaliado (ECKELPASSOW *et al.*, 2010). O carcinoma de células renais é originado pelo crescimento descontrolado das células epiteliais dos túbulos renais localizados no parênquima do órgão (EBLE *et al.*, 2004). Em comparação com outros tipos de tumores, à medida que as células tumorais crescem, estas vão cobrindo completamente a porção cortical do órgão formando uma massa homogênea de células com as características próprias que definem a cada subtipo histológico. Nossos experimentos de IHQ utilizando cortes inteiros de tecido (embora realizados apenas para CASP7) permitiram confirmar que os valores de imunomarcação detectados nos *spots* depositados na lâmina de TMA conseguem assinar corretamente a imunomarcação encontrada na peça de tecido. Além disso, as IHQ realizadas nas amostras completas de tecido mostraram ausência de pontos focais de marcação ao longo do tecido renal tumoral.

A existência de uma alta correlação entre os valores de imunomarcação observados nos amostras depositadas no TMA e os experimentos de IHQ em lâminas que contem cortes inteiros (CAMP *et al.*, 2008), é observada inclusive em tumores CCR que se apresentam como neoplasias de crescimento heterogêneo ou mesmo em neoplasias com histologia mais complexa que o CCR (HENRIKSEN *et al.*, 2007). TORHORST *et al.*, demonstraram que a heterogeneidade histológica caracteristicamente encontrada no tumor de mama não influencia significativamente a capacidade preditiva de marcadores analisados utilizando lâminas de TMA (TORHORST *et al.*, 2001). Ainda em tumores de mama, foi mostrado que quando as

marcações são uniformes ao longo do tecido, as chances de se avaliar corretamente o valor de imunomarcação em apenas um único *core* de TMA é de aproximadamente 100% (CAMP *et al.*, 2000). Quando o antígeno apresenta variabilidade de expressão, a utilização de apenas um único *core* tem 90% de acerto nos valores de imunomarcação quando comparados aos cortes inteiros de tecido, e uma taxa de 95% de acerto quando utilizado dois *cores* (CAMP *et al.*, 2000). Em tumores de CCRcc já foi proposto que a utilização de um mínimo de 2-4 *cores* é suficiente para se efetuar um diagnóstico confiável (ECKEL-PASSOW *et al.*, 2010). Os valores de imunomarcação extraídos dos nossos experimentos de IHQ em lâminas de TMA correspondem ao resultado do valor médio para dois *cores* depositados na lâmina, provenientes de duas regiões diferentes do mesmo tumor. Isto reforça nossos resultados, devido a que os valores utilizados referidos a quantificação detectada após imunomarcação com o anticorpo específico, não correspondem apenas a uma medida isolada, mas sim provêm da observação de pelo menos duas regiões diferentes do mesmo tumor.

Adicionalmente, deve-se tomar em conta que, aquilo referido como cortes inteiros também representam uma pequena fração (i.e. 0,004 x 10 x 10 mm) de peças cirúrgicas grandes (i.e. 30 x 30 x 30 mm), constituindo apenas uma fração de 0,05% do tumor total (CAMP *et al.*, 2000; TORHORST *et al.*, 2001). Portanto, uma vez que tenham sido obtidos resultados significativos na análise estatística dos dados de TMA, a questão do número de *cores* presentes no TMA representar corretamente ao tumor como um todo é menos importante do que a confirmação dos resultados em conjuntos maiores de pacientes.

Abaixo são discutidos individualmente cada um dos biomarcadores de CCR avaliados nos experimentos de TMA durante este trabalho.

V.2.1. ACTN4

As alfa-actininas são proteínas que pertencem à superfamília das espectrinas (proteínas estruturais do citoesqueleto celular) que possuem um domínio de ligação para actina na sua

porção amino-terminal (DIXSON *et al.*, 2003). Já foram identificadas quatro alfa-actininas: *ACTN1-4*. *ACTN2* e *ACTN3* são exclusivas dos tecidos muscular e cardíaco. *ACTN1* e *ACTN4* por sua vez possuem uma expressão ubíqua e as proteínas estão amplamente distribuídas nos tecidos, com exceção da ausência de expressão de *ACTN1* no tecido renal (KAPLAN *et al.*, 2000). *ACTN4* colocaliza com as fibras de estresse do citoesqueleto além de se encontrar amplamente dispersa no citoplasma e no núcleo celular (HONDA *et al.*, 1998).

Nossos experimentos de IHQ mostraram uma redução significativa ($p < 0,05$) da expressão proteica de *ACTN4* nas amostras tumorais, não só no conjunto total de pacientes com CCR presentes na lâmina assim como nas amostras pareadas provenientes dos mesmos pacientes (Figura 7). Interessantemente, foi possível identificar dois grupos de pacientes CCRcc que apresentaram riscos de sobrevidas significativamente diferentes, utilizando como valor de corte o *score* de marcação de ACIS igual a 2. O *score* de marcação <2 detectado pelo ACIS III pode ser considerado com ausência de marcação, i.e, ausência da expressão da proteína *ACTN4*. O conjunto de pacientes CCRcc que foram detectados com ausência de expressão da proteína *ACTN4* apresentaram uma pior sobrevida câncer-específica comparados aos pacientes que tiveram um *score* de expressão da proteína ≥ 2 (Figura 8). Além disso, foi possível observar uma associação entre ausência de expressão de *ACTN4* e a presença tumores mais agressivos (tumores não detectados incidentalmente e com tamanhos $> 7\text{cm}$) nos pacientes com CCRcc.

Vários trabalhos publicados na literatura têm observado uma associação entre a desregulação da expressão de *ACTN4* e a presença de câncer (FU *et al.*, 2007; HARA *et al.*, 2007; HONDA *et al.*, 2005; KIKUCHI *et al.*, 2008; MENEZ *et al.*, 2004; NIKOLOPOULOS *et al.*, 2000; YAMAMOTO *et al.*, 2009). Em tumores de neuroblastomas e adenocarcinomas da próstata foi observada que a ausência da expressão de *ACTN4* esta correlacionada com o aumento da agressividade do tumor (HARA *et al.*, 2007;

NIKOLOPOULOS *et al.*, 2000). Alguns autores tem sugerido que a proteína ACTN4 pode atuar como um supressor de tumor, onde a diminuição da sua expressão ou a presença de mutações no gene, afeta a tumorigênese (MENEZ *et al.*, 2004). Ainda não existem dados publicados na literatura que associem a desregulação da proteína ACTN4 com o câncer renal.

Camundongos *Actn4 null* (KO) ou heterozigotos para uma mutação que inativa o gene *ACTN4*, apresentaram um amplo espectro de lesões morfológicas nos glomérulos, mas sem evidências de neoplasias (HENDERSON *et al.*, 2008). Pacientes que apresentam mutações no gene *ACTN4* apresentam lesões renais não específicas que afetam principalmente os glomérulos renais, decorrentes de outros tipos de alterações como obesidade, hipertensão e diabetes (KAPLAN *et al.*, 2000). Estes resultados podem indicar que as alterações observadas na expressão do gene *ACTN4* nos diferentes tipos de câncer, correspondem a eventos posteriores na tumorigênese, onde o microambiente tumoral e as vias de sinalização ativadas/reprimidas são afetados de forma heterogênea nos diferentes tecidos.

Embora os estudos de expressão da proteína ACTN4 tenham sido realizados utilizando um numero limitados de amostras (67 amostras de CCRcc), nossos resultados descrevem pela primeira vez a existência da uma alteração na abundancia relativa da proteína ACTN4 em pacientes com CCRcc. Mais importante, foi possível observar que a alteração da expressão de ACTN4 constitui uma variável explicativa independente de sobrevida, onde pacientes os CCRcc que apresentam ausência da expressão de ACTN4 (*score* < 2) tem um risco 2.5 maior de morrer pela doença (Tabela 7), resultado observado no teste multivariado de Cox.

Ampliar estes resultados em estudos multicentros, utilizando um numero maior de amostras não só do subtipo células claras assim como também nos outros subtipos histológico, será de grande utilidade para corroborar os dados obtidos neste trabalho e para avançar na possibilidade de utilizar a imunomarcacão de ACTN4 como um possível novo marcador prognóstico no tumor renal. Uma vez validado o marcador, será importante

determinar a possibilidade de identificar facilmente as subpopulações de pacientes, através da inspeção visual de lâminas de IHQ marcadas com ACTN4, o que facilitaria a sua utilização como marcador de prognóstico na rotina clínica.

V.2.2. ARNTL

O gene *ARNTL* (*Aryl-hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like*; (WOLTING; MCGLADE, 1998) codifica para uma das proteínas-chave na regulação dos osciladores circadianos (TAKAHASHI, J. S. *et al.*, 2008). Estes mecanismos de relógios circadianos envolvem ciclos autônomos de transcrição/tradução de 24 horas, regulados por um *feedback loop* positivo/negativo de genes circadianos altamente conservados em mamíferos (LAMONT *et al.*, 2007; TAKAHASHI, J. S. *et al.*, 2008). Entre os principais genes circadianos, encontram-se as proteínas codificadas pelos genes *CLOCK* e *ARNTL* (também conhecido na literatura como *BMAL1*(IKEDA; NOMURA, 1997)) que atuam como fatores de transcrição diméricos regulando os períodos claros do ciclo (LAMONT *et al.*, 2007).

Cronobiologistas vem a definir o câncer como uma doença que não deve ser tratada apenas com produto de uma alteração local (FU; LEE, 2003). Portanto, a maior parte das pesquisas feitas para genes circadianos e sua associação com tumorigênese, tem como foco do estudo, explicar como a perda ciclo pode afetar diretamente ao surgimento do câncer (FU; LEE, 2003). Foram observado como vários genes, tais como *MYC*, assim com alguns genes supressores de tumores, proteínas do citoesqueleto e genes envolvidos na apoptose; também apresentam oscilações e estão sob efeito de genes circadianos (CANAPLE *et al.*, 2003; FU; LEE, 2003; TAKAHASHI, J. S. *et al.*, 2008). Mas, a desregulação destes genes também pode surgir como um evento secundário ao aparecimento câncer. Por exemplo, foi observado como os genes circadianos podem afetar as vias de resposta ante condições de hipóxia, frequentemente ativadas em tumores de crescimento rápido e altamente angiogênicos, tais como no câncer renal (MAZZOCCOLI *et al.*, 2013).

Poucos trabalhos na literatura têm estudado as alterações dos genes circadianos no tumor e seu possível uso como marcador de prognóstico. Por exemplo, pacientes com câncer de mama mostraram uma correlação significativa entre a expressão do *ARNTL* e presença de metástase nos linfonodos (KUO *et al.*, 2009). Em tumores metastáticos de fígado, o aumento da expressão do *ARNTL* provoca uma alteração de um outro gene circadiano (*PER1*) que por sua vez, afeta diretamente a sobrevida dos pacientes (OSHIMA *et al.*, 2011). O aumento da expressão de *ARNTL* também foi observado em tumores de mesotelioma pleural quando comparado às amostras de tecido não tumoral (ELSHAZLEY *et al.*, 2012). Interessantemente, experimentos posteriores onde foi silenciada a expressão de *ARNTL* nas linhagens celulares tumorais derivadas do mesmo tumor, foi observada a redução significativa na proliferação celular e um aumento da taxa de apoptose (ELSHAZLEY *et al.*, 2012). Não apenas o aumento da expressão de *ARNTL* foi observado afetando a tumorigênese; sua perda da expressão foi observada em pacientes com câncer pancreático, câncer colorectal e câncer de cabeça e pescoço (HSU *et al.*, 2012; MAZZOCCOLI *et al.*, 2011; RELLES *et al.*, 2013). Experimentos feitos em tumores hematológicos mostraram que a diminuição da expressão proteica de *ARNTL* encontra-se associado ao aumento no padrão de metilação na região promotora do gene (TANIGUCHI *et al.*, 2009). O conjunto destas evidencias, mostram uma possível associação entre desregulação da expressão de *ARNTL* e o câncer, abrindo a possibilidade de utilizar este gene como um possível marcador de diagnóstico ou prognóstico na clínica.

Embora tenha sido observado um aumento da abundância relativa do mRNA de *ARNTL* nos tumores renais (Tabela 1 e Figura 3) nossos experimentos de IHQ mostraram uma diminuição significativa da expressão da proteína *ARNTL* nas amostras tumorais relativamente às amostras não tumorais presentes no TMA (Figura 9 e Figura 10). Os genes circadianos encontram-se regulados por ciclos de transcrição/tradução de 24 horas, além de

estarem afetados por outro conjunto de processos celulares que afetam a estabilidade dos mRNAs e as proteínas. Uma possível explicação para estas observações é a existência de mecanismos de controle pós-transcricional que podem estar influenciando nossos resultados. Novos experimentos serão necessários para corroborar esta hipótese.

Quando avaliada a expressão proteica de ARNTL como possível marcador de prognóstico no tumor renal, foi possível identificar duas populações de pacientes com sobrevidas estatisticamente diferentes ($p = 0,03$) utilizando os valores de positividade da imunomarcacão (Figura 11). Pacientes com valores de positividade $\geq 0,80$, correspondente a uma expressão aumentada da proteína ARNTL, apresentaram um pior prognóstico na sobrevida câncer-específica. Não foi observada nenhuma associação entre a imunomarcacão de ARNTL e alguma das variáveis anatomopatológicas utilizadas na clínica. Alguns estudos investigaram o uso de ARNTL como marcador prognóstico em outros tumores humanos (câncer colorectal e a presença de metástase no fígado), sem sucesso (MAZZOCCOLI *et al.*, 2011; OSHIMA *et al.*, 2011). A diminuição significativa da imunomarcacão de ARNTL em amostras de pacientes com CCRcc observada nos experimentos de TMA, está significativamente associada com a sobrevida dos pacientes na análise multivariada (Tabela 8). Pacientes que apresentam uma expressão aumentada da proteína ARNTL (positividade $\geq 0,80$) tem um risco duas vezes maior de morrer por câncer comparado aos pacientes que expressam ARNTL com valores de positividade $< 0,80$. Estes resultados abrem novas perspectivas, justificando estudos adicionais utilizando um numero maior de amostras, para avaliar se efetivamente o nível de expressão de ARNTL pode ser utilizado como novo biomarcador de prognóstico no câncer de rim.

V.2.3. EPAS1

O gene *EPAS1* (*Endothelial Pas Domain Protein-1*) codifica a proteína HIF2 α (*Hypoxia-Inducible Factor 2, Alpha Subunit*) (TIAN *et al.*, 1997) envolvida na regulação da

resposta molecular em condições de hipóxia nas células (TALKS *et al.*, 2000). Pressões parciais de oxigênio abaixo do normal, como as observadas no desenvolvimento de neoplasias pela rápida e constante duplicação celular, ativam a transcrição de genes regulados pelo promotor induzível HRE (*Hypoxia Response Element*) (CORN, 2007; HOPFL *et al.*, 2004; SMALDONE; MARANCHIE, 2009). O fator de transcrição responsável por esta sinalização celular é o complexo proteico conhecido como HIF-1 (por *Hypoxia-Inducible Factor*), produto da dimerização da proteína HIF1 β junto com uma das três proteínas HIF α (HIF1 α , HIF2 α e HIF3 α) (CORN, 2007; HOPFL *et al.*, 2004; SEMENZA, 2003). A dimerização HIF2 α e HIF1 β (também conhecido na literatura como ARNT) constituem o fator de transcrição HIF-2 (SMALDONE; MARANCHIE, 2009; TIAN *et al.*, 1997). Foram identificados aproximadamente mais de 60 genes alvos regulados de forma direta pelo HIF-1 (SEMENZA, 2003). Embora seja possível observar certa redundância de função e sobreposição de expressão entre HIF-1 e HIF-2 em alguns tecidos sob condições de hipóxia (HOPFL *et al.*, 2004), HIF1 α e HIF2 α (*EPAS1*) estão expressos em regiões diferentes e utilizam os mesmos mecanismos bioquímicos/moleculares para controlar processos celulares diferentes (HOPFL *et al.*, 2004; SMALDONE; MARANCHIE, 2009).

Embora os genes HIF α e HIF1 β sejam constitutivamente expressos, HIF α está sujeito a um mecanismo de regulação postraducional e a resposta ante condições de hipóxia apenas são disparadas quando a pressão parcial de oxigênio se encontra diminuída na célula (HOPFL *et al.*, 2004). Em condições de normoxia, os resíduos de prolina das proteínas HIF α são hidroxiladas, provocando uma mudança na conformação da proteína e posterior degradação, acionada pela pVHL (uma proteína que forma parte do complexo multiproteico E3 do proteossomo) responsável pela degradação das proteínas HIF α via o sistema ubiquitina-proteossoma (CORN, 2007; HOPFL *et al.*, 2004).

A mutação bialélica autossômica dominante no gene VHL encontra-se presente em aproximadamente 75% dos tumores renais do subtipo célula clara, tornando este tumor altamente angiogênico pela constante ativação das proteínas HIF (devido à ausência da degradação das proteínas HIFs) em condições de normoxia, (CORN, 2007; HOPFL *et al.*, 2004; SMALDONE; MARANCHIE, 2009). Esta atividade constitutiva do HIF1 α em condições de normoxia e sua associação a vários tipos de tumores encontram-se amplamente documentados na literatura (SEMENZA, 2003; SMALDONE; MARANCHIE, 2009). Mas, a expressão ubíqua do HIF-1 nos tumores sólidos sugere que o incremento dos níveis de expressão da proteína seja principalmente uma consequência do crescimento tumoral, e não a sua causa (KIM, C. M. *et al.*, 2006). Não existem na literatura trabalhos que tenham investigado HIF2 α (EPAS1) como biomarcador de prognóstico de tumores.

Embora a proteína HIF2 α (EPAS1) seja estabilizada e não endereçada para degradação apenas em condições de hipóxia, ainda é possível observar a presença da proteína por imunohistoquímica em vários tipos de tecidos normais e tumorais inclusive em condições de normoxia (TALKS *et al.*, 2000; WIESENER *et al.*, 1998). Assim, foi possível comparar os níveis de expressão da proteína EPAS1 entre as amostras tumorais e não tumorais, as quais se encontram em condições de normoxia. Nossos experimentos de IHQ em lâminas de TMA mostraram que as amostras provenientes de tecidos tumorais apresentam uma abundância significativamente maior da proteína EPAS1 quando comparada às amostras de rim histologicamente não tumorais.

Como esperado para um fator de transcrição, foi reportada à localização nuclear da proteína codificada pelo gene *EPAS1*, similar ao observado para a proteína HIF1 α (FAVIER *et al.*, 2007; TALKS *et al.*, 2000). Interessantemente, tumores renais provenientes de três subtipos histológicos diferentes mostraram uma localização citoplasmática para a proteína codificada pelo gene *EPAS1*, ao contrário de HIF1 α que se mostrou exclusivamente nuclear

(KIM, C. M. *et al.*, 2006). Nossos experimentos de TMA mostraram a mesma localização da proteína EPAS1 apenas nos compartimentos citoplasmáticos das células tanto tumorais como o não tumorais de rim.

Análises de sobrevidas permitiram identificar a existência de dois grupos de pacientes CCRcc com curvas de sobrevidas significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) em função dos níveis de expressão de EPAS1. Independentemente de utilizado dos valores de positividade ou *H-score*, pacientes que possuem maior expressão da proteína possuem um pior prognóstico nas curvas de KM câncer-específica. Apenas a marcação de EPAS1 avaliado pela positividade se mostrou como uma variável independente nas análises multivariadas de Cox, apresentando um risco de morte cerca de três vezes maior a cada ano para os pacientes com uma positividade ≥ 0.95 (Tabela 10). Adicionalmente, foi observada uma associação estatisticamente significativa entre os pacientes CCRcc com valores de positividade ≥ 0.95 e importantes variáveis anatomopatológicas tais como, baixo grau Fuhrman (62 de 82, 77%), Estadio Clínico (59 de 82, 72%) e status ECOG (58 de 82, 58%), assim como também com ausência de Necroses Tumoral (50 de 72, 61%) e Invasão da Veia Renal (75 de 7, 92%).

O conjunto de resultados obtidos aponta um possível potencial de se utilizar a imunomarcção da proteína EPAS1 na clinica patológica, como marcador prognóstico de sobrevida em pacientes com CCRcc. Contudo, os valores de positividade observados como variável significativamente independente, não parecem ser de fácil interpretação se observados visualmente, pré-requisito indispensável para a sua utilização na rotina clínica. O programa *X-tile* identificou duas populações de pacientes com riscos significativamente diferentes, mas na prática os valores de corte se encontram próximos da saturação máximos de imunomarcção, podendo assim afetar a correta classificação e o resultado significativo observado pode ser apenas um viés estatístico. Os resultados de *H-score* para EPASI se

mostraram como variáveis de identificação mais simples comparada à positividade, mas lamentavelmente não resultaram significativos nas após as análises multivariadas.

V.2.4. CASP7

A incorreta ativação da morte celular por apoptose é um importante mecanismo de evasão utilizada pelas células tumorais para favorecer crescimento exacerbado do tumor conferindo resistência à morte (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000;2011; THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). A cascata de sinalização ativada durante a apoptose, não depende apenas das principais proteínas catalíticas que formam parte desta via, como as caspases iniciadoras (CASP2, CASP8, CASP9 e CASP10) e caspases efetoras (CASP3, CASP6 e CASP7), como também de um grande repertório de proteínas regulatórias encarregadas de avaliar a existência de dano celular ou responder aos estímulos dos receptores de morte presentes na membrana celular (LI; YUAN, 2008). Qualquer tipo de alteração que afete a correta função destas proteínas pode afetar ao surgimento de tumores (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000;2011; THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998). Por exemplo, proteínas pró e antiapoptóticas tais como, p53, p21 e BCL2 já foram analisadas como possíveis marcadores moleculares de prognóstico em pacientes com CCR apresentando resultados promissores (LAM *et al.*, 2005; SRIGLEY *et al.*, 1997; TUNUGUNTLA; JORDA, 2008).

Utilizando uma lâmina de TMA contendo amostras tumorais provenientes de pacientes com CCR assim como também amostras de tecido renal não tumoral, foi possível observar uma diminuição estatisticamente significativa da expressão da proteína CASP7 nas amostras tumorais de rim (Tabela 12). Interessantemente, nossos experimentos de validação da expressão gênica por qPCR tinham mostrado um aumento significativo da expressão de CASP7 nas amostras tumorais de rim, resultados aparentemente contraditórios aos observados para a expressão proteica de CASP7 nas amostras tumorais. No trabalho de Hudson *et al*; publicado em 2012, os autores demonstraram que a expressão aumentado do microRNA miR-

106b influenciava significativamente na sobrevida de pacientes com câncer de próstata, sendo o mRNA da proteína Caspase 7 o alvo da regulação pelo microRNA (HUDSON *et al.*, 2013). Estes resultados indicam portanto a existência de mecanismos de regulação pós-transcricional que afetam a estabilidade do mRNA e/ou a eficiência do processo de tradução da proteína nas células tumorais. Recentemente, Slaby *et al* observaram um aumento da expressão do microRNA miR-106b em amostras de tecido renal tumoral (SLABY *et al.*, 2010). Assim, é possível que a expressão de CASP7 em tumores CCRcc seja também afetada pelo microRNA miR-106b, sendo necessários experimentos adicionais para confirmar a existência desse mecanismo já observado no câncer de próstata (HUDSON *et al.*, 2013). A expressão diminuída da proteína CASP7 também foi observada em tumores de cólon e próstata (PALMERINI *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-BERRIGUETE *et al.*, 2012), assim como também em linhagens celulares derivadas de tumores renais (KOLENKO *et al.*, 1999).

Observamos em nossas análises a existência de dois grupos de pacientes de fácil classificação visual, em função da presença ou ausência da expressão de CASP7 (Figura 17). Valores semiquantitativos de imunomarcção da proteína CASP7 determinados visualmente apresentaram correlação positiva e significativa com o método automatizado de quantificação utilizando o programa que acompanha o leitor de lâminas ACIS III. Posteriormente, agrupando as amostras de pacientes com CCRcc em duas populações em função de seus valores de imunomarcção, foi possível observar uma associação significativa entre ausência de imunomarcção de CASP7 e a presença de tumores com tamanhos “maiores a 7cm”, “Estadio Clínico avançado”, “presença de Necroses Tumoral”, “presença de Invasão da Veia Renal” e “ausência de Diagnostico Incidental”. Além disso, estes pacientes mostraram um pior prognóstico nas curvas de sobrevida globais e câncer-específica, comparada aos pacientes que apresentaram imunomarcção para CASP7. Estão descritos na literatura resultados similares observados em pacientes com tumor de próstata, onde a ausência da

imunomarcção para CASP7 mostrou uma associação significativa com diversas variáveis anatomopatológicas de agressividade do tumor e um pior prognóstico (HUDSON *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-BERRIGUETE *et al.*, 2012).

Adicionalmente, foi observado que o padrão de imunomarcção de CASP7 permite subestratificar grupos de pacientes com baixo ou alto risco baseado em critérios utilizados atualmente na clínica. Pacientes com CCRcc classificados como de baixo risco pelo estadiamento clínico foram subestratificados em função do risco de morte câncer-específica ($p = 0.045$). Pacientes classificados com melhor prognóstico pela presença do baixo grau Fuhrman e com ausência de imunomarcção de CASP7 apresentaram uma tendência de pior prognóstico (78% de sobrevida em 5 anos) comparada aos pacientes que tiveram expressão da proteína caspase 7 (92% de sobrevida em 5 anos). Similarmente, pacientes classificados com pior prognóstico pela presença de alto grau Fuhrman e com imunomarcção positiva para CASP7 mostraram uma tendência de melhor prognóstico (69% de sobrevida em 5 anos) comparado aos pacientes CASP7 negativos (40% de sobrevida em 5 anos). Possivelmente, o pequeno número de pacientes/amostras em cada uma das subcategorias contribui para a ausência de significância estatística nas duas últimas análises descritas acima.

A presença de metástase no diagnóstico assim como a ocorrência de recidiva local ou à distância após a cirurgia constituem as principais causas de morte nos pacientes diagnosticados com CCR. A existência de um biomarcador capaz de identificar grupos de pacientes com maior chance de apresentar metástase seria de grande utilidade na clínica, permitindo aplicar terapias adjuvantes mais agressivas nos pacientes identificados com esta predisposição. Interessantemente, dentre os pacientes que apresentaram recorrência num período de 5 anos após a cirurgia, a estratificação pela imunomarcção de CASP7 foi capaz de identificar dois grupos de pacientes com riscos de morte significativamente diferentes ($p = 0.018$); pacientes com imunomarcção negativa para CASP7 apresentaram um pior

prognóstico comparado aos pacientes com expressão positiva de CASP7, embora ambos os grupos apresentem recorrência em até 5 anos após a cirurgia. A inclusão de marcadores moleculares que podem adicionar informações adicionais para uma melhor seleção dos pacientes com alto risco de apresentar recorrência ao longo do tempo, como no caso da CASP7, pode beneficiar na escolha das terapias a serem aplicadas nos diferentes pacientes classificados pelos seus grupos de risco (BANKS *et al.*, 2007).

Está bem documentado na literatura a relação entre a perda da função de proteínas caspases e o aparecimento de câncer (PLATI *et al.*, 2011), mas até hoje nenhuma destas se mostrou como potencial biomarcador de prognóstico nos pacientes com CCR (TUNUGUNTLA; JORDA, 2008). Nosso trabalho reporta pela primeira vez a existência de uma alteração na abundância relativa da proteína CASP7 em amostras clínicas de rim (VILELLA-ARIAS *et al.*, 2013). Observamos também a associação entre a expressão de CASP7 e importantes variáveis anatomopatológicas de agressividade, assim como com a sobrevida câncer-específica de pacientes com CCRcc (VILELLA-ARIAS *et al.*, 2013).

Lamentavelmente, a imunomarcagem de CASP7 não se apresentou como uma variável independente na análise multivariada realizada em nosso estudo. Uma possibilidade para explicar esse resultado é que o tamanho amostral avaliado no TMA (120 casos de CCRcc) tenha sido insuficiente para alcançar poder estatístico. Novos dados provenientes de um número ampliado de casos clínicos são necessárias para confirmar o valor prognóstico da imunomarcagem de CASP7 em pacientes com CCR.

V.3. Considerações finais

Até o momento, não existem dados suficientes para confirmar o uso na rotina dos vários biomarcadores identificados nos pacientes com RCC (SRIGLEY *et al.*, 1997). Seria portanto, interessante não apenas confirmar o potencial uso destes novos biomarcadores como novos parâmetros de prognóstico realizando estudos retrospectivos multicentros utilizando centenas

de amostras independentes para confirmação dos nossos resultados para os candidatos ACTN4, ARNTL e CASP7; assim como também avaliar se estes marcadores moleculares podem vir a auxiliar na prática clínica como novas ferramentas de *screening*, favorecendo no aconselhamento médico mais eficaz e um acompanhamento mais personalizado dos pacientes. Uma estratificação adicional para determinação dos riscos associados ao tumor poderiam também contribuir na prevenção dos pacientes a exposições radiológicas desnecessárias, assim como evitar o uso de terapias extremamente agressivas quando não existem sinais de prognósticos desfavoráveis (EICHELBURG *et al.*, 2009).

VI. CONCLUSÃO

- Dos nove candidatos selecionados para validação, nossos experimentos de qPCR permitiram confirmar a expressão significativamente alterada dos genes *ACTN4*, *ARNTL* e *EPAS1* em um conjunto independente de amostras tumorais de CCR, comparadas as amostras não tumorais adjacentes provenientes dos mesmos pacientes.
- Os genes *CASP7* e *VRK2* também apresentaram uma expressão significativamente alterada nas amostras de CCR, mas estes resultados se mostraram contrários aos observados previamente nos experimentos com microarraios de DNA.
- Foi observada a expressão significativamente alterada dos genes *ARNTL*, *EPAS1* e *CASP7* em pelo menos uma das linhagens celulares tumorais de rim avaliadas, comparada a expressão de uma linhagem celular de fenótipo não tumoral.
- Foi observada uma diminuição significativa da expressão das proteínas ACTN4, ARNTL e CASP7 em amostras de CCR em relação a tecido renal não tumoral pela técnica de IHQ em lâminas de TMA.
- Para os todos os biomarcadores candidatos (ACTN4, ARNTL, CASP7 e EPAS1) foram identificados valores de corte de imunomarcção capazes de estratificar com significância estatística as amostras de CCR função do risco de sobrevida câncer-específica. Adicionalmente, os subconjuntos de pacientes agrupados pelos valores de imunomarcção para ACTN4, CASP7 ou EPAS1 mostraram associação significativa com importantes variáveis anatomopatológicas utilizadas na clínica.
- Os parâmetros de imunomarcção das proteínas ACTN4, ARNTL e EPAS1 resultaram em variáveis prognósticas independentes em análises multivariadas de sobrevida câncer-específica.
- Embora não tenha se mostrado significativa nas análises multivariadas, a imunodeteção de CASP7 pode fornecer informações adicionais que auxiliem no prognóstico de pacientes

com CCR, sendo potencialmente capaz de identificar subgrupos de pacientes com pior prognóstico dentro de um conjunto de pacientes de baixo risco em função do estadió clínico. Adicionalmente, analisando apenas os grupos de pacientes que apresentaram recorrência ao longo de 5 anos após a cirurgia, foi observado que a imunomarcacão de CASP7 permite identificar pacientes com menor risco de morte pelo cãncér. O conjunto destes resultados pode indicar o potencial uso da imunomarcacão da proteína CASP7 como biomarcador prognóstico na prática clínica.

- Adicionalmente, os valores de corte da imunomarcacão de ACTN4 e CASP7 são conversíveis em valores discretos de positividade/negatividade de marcação. Uma vez validados em coortes adicionais de pacientes, a imunomarcacão dessas proteínas terá um grande potencial de ser rapidamente adaptada para uso na clínica como possível novo biomarcador prognóstico nos pacientes com CCR.

VII. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A. W.; COUTINHO-CAMILLO, C. M.; RODRIGUES, B. R.; ROCHA, R. M.; TORRES, L. F.; MARTINS, V. R.; DA CUNHA, I. W.; HAJJ, G. N. A comparison between manual and automated evaluations of tissue microarray patterns of protein expression. **J Histochem Cytochem**, v. 61, n. 4, p. 272-82, Apr 2013.

BANKS, R. E.; CRAVEN, R. A.; HARNDEN, P.; MADAAN, S.; JOYCE, A.; SELBY, P. J. Key clinical issues in renal cancer: a challenge for proteomics. **World J Urol**, v. 25, n. 6, p. 537-56, Dec 2007.

BEDKE, J.; PRITSCH, M.; BUSE, S.; JAKOBI, H.; ELSAESSER, K. H.; PAHERNIK, S.; HAFERKAMP, A.; HOHENFELLNER, M. Prognostic stratification of localized renal cell carcinoma by tumor size. **J Urol**, v. 180, n. 1, p. 62-7, Jul 2008.

BOER, J. M.; HUBER, W. K.; SULTMANN, H.; WILMER, F.; VON HEYDEBRECK, A.; HAAS, S.; KORN, B.; GUNAWAN, B.; VENTE, A.; FUZESI, L.; VINGRON, M.; POUSTKA, A. Identification and classification of differentially expressed genes in renal cell carcinoma by expression profiling on a global human 31,500-element cDNA array. **Genome Res**, v. 11, n. 11, p. 1861-70, Nov 2001.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World cancer report 2008**. Lyon: IARC Press, 2008. ISBN 9789283204237.

BRANNON, A. R.; RATHMELL, W. K. Renal cell carcinoma: where will the state-of-the-art lead us? **Curr Oncol Rep**, v. 12, n. 3, p. 193-201, May 2010.

BRAZMA, A.; HINGAMP, P.; QUACKENBUSH, J.; SHERLOCK, G.; SPELLMAN, P.; STOECKERT, C.; AACH, J.; ANSORGE, W.; BALL, C. A.; CAUSTON, H. C.; GAASTERLAND, T.; GLENISSON, P.; HOLSTEGE, F. C.; KIM, I. F.; MARKOWITZ, V.; MATESE, J. C.; PARKINSON, H.; ROBINSON, A.; SARKANS, U.; SCHULZE-KREMER, S.; STEWART, J.; TAYLOR, R.; VILO, J.; VINGRON, M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. **Nat Genet**, v. 29, n. 4, p. 365-71, Dec 2001.

BRITO, G. C.; FACHEL, A. A.; VETTORE, A. L.; VIGNAL, G. M.; GIMBA, E. R.; CAMPOS, F. S.; BARCINSKI, M. A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; REIS, E. M. Identification of protein-coding and intronic noncoding RNAs down-regulated in clear cell renal carcinoma. **Mol Carcinog**, v. 47, n. 10, p. 757-67, Oct 2008.

BUDWIT-NOVOTNY, D. A.; MCCARTY, K. S.; COX, E. B.; SOPER, J. T.; MUTCH, D. G.; CREASMAN, W. T.; FLOWERS, J. L.; MCCARTY, K. S., JR. Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. **Cancer Res**, v. 46, n. 10, p. 5419-25, Oct 1986.

CAMARGO, A. A.SAMAIA, H. P.DIAS-NETO, E.SIMAO, D. F.MIGOTTO, I. A.BRIONES, M. R.COSTA, F. F.NAGAI, M. A.VERJOVSKI-ALMEIDA, S.ZAGO, M. A.ANDRADE, L. E.CARRER, H.EL-DORRY, H. F.ESPREFICO, E. M.HABR-GAMA, A.GIANNELLA-NETO, D.GOLDMAN, G. H.GRUBER, A.HACKEL, C.KIMURA, E.

T.MACIEL, R. M.MARIE, S. K.MARTINS, E. A.NOBRAGA, M. P.PACO-LARSON, M. L.PARDINI, M. I.PEREIRA, G. G.PESQUERO, J. B.RODRIGUES, V.ROGATTO, S. R.DA SILVA, I. D.SOGAYAR, M. C.SONATI, M. F.TAJARA, E. H.VALENTINI, S. R.ALBERTO, F. L.AMARAL, M. E.ANEAS, I.ARNALDI, L. A.DE ASSIS, A. M.BENGTSON, M. H.BERGAMO, N. A.BOMBONATO, V.DE CAMARGO, M. E.CANEVARI, R. A.CARRARO, D. M.CERUTTI, J. M.CORREA, M. L.CORREA, R. F.COSTA, M. C.CURCIO, C.HOKAMA, P. O.FERREIRA, A. J.FURUZAWA, G. K.GUSHIKEN, T.HO, P. L.KIMURA, E.KRIEGER, J. E.LEITE, L. C.MAJUMDER, P.MARINS, M.MARQUES, E. R.MELO, A. S.MELO, M.MESTRINER, C. A.MIRACCA, E. C.MIRANDA, D. C.NASCIMENTO, A. L.NOBRAGA, F. G.OJOPI, E. P.PANDOLFI, J. R.PESSOA, L. G.PREVEDEL, A. C.RAHAL, P.RAINHO, C. A.REIS, E. M.RIBEIRO, M. L.DA ROS, N.DE SA, R. G.SALES, M. M.SANT'ANNA, S. C.DOS SANTOS, M. L.DA SILVA, A. M.DA SILVA, N. P.SILVA, W. A., JR.DA SILVEIRA, R. A.SOUSA, J. F.STECCONI, D.TSUKUMO, F.VALENTE, V.SOARES, F.MOREIRA, E. S.NUNES, D. N.CORREA, R. G.ZALCBERG, H.CARVALHO, A. F.REIS, L. F.BRENTANI, R. R.SIMPSON, A. J.DE SOUZA, S. J. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 21, p. 12103-12108, Oct 9 2001.

CAMP, R. L.; CHARETTE, L. A.; RIMM, D. L. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Lab Invest**, v. 80, n. 12, p. 1943-9, Dec 2000.

CAMP, R. L.; DOLLED-FILHART, M.; RIMM, D. L. X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 21, p. 7252-9, Nov 1 2004.

CAMP, R. L.; NEUMEISTER, V.; RIMM, D. L. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 34, p. 5630-7, Dec 1 2008.

CANAPLE, L.; KAKIZAWA, T.; LAUDET, V. The days and nights of cancer cells. **Cancer Res**, v. 63, n. 22, p. 7545-52, Nov 15 2003.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, n. 1, p. 156-9, Apr 1987.

CHOU, C. C.; CHEN, C. H.; LEE, T. T.; PECK, K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 12, p. e99, 2004.

COHEN, H. T.; MCGOVERN, F. J. Renal-cell carcinoma. **N Engl J Med**, v. 353, n. 23, p. 2477-90, Dec 8 2005.

CORN, P. G. Role of the ubiquitin proteasome system in renal cell carcinoma. **BMC Biochem**, v. 8 Suppl 1, p. S4, 2007.

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

CREGGER, M.; BERGER, A. J.; RIMM, D. L. Immunohistochemistry and quantitative analysis of protein expression. **Arch Pathol Lab Med**, v. 130, n. 7, p. 1026-30, Jul 2006.

CRESSIE, A. C.; WHITFORD, H. J. How to Use the Two Sample t-Test. **Biom J**, v. 28, n. 2, p. 131-8, 1986.

CUPERLOVIC-CULF, M.; BELACEL, N.; OUELLETTE, R. J. Determination of tumour marker genes from gene expression data. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 6, p. 429-37, Mar 15 2005.

DA COSTA, W. H.; MONIZ, R. R.; DA CUNHA, I. W.; FONSECA, F. P.; GUIMARAES, G. C.; DE CASSIO ZEQUI, S. Impact of renal vein invasion and fat invasion in pT3a renal cell carcinoma. **BJU Int**, v. 109, n. 4, p. 544-8, Feb 2012.

DALL'OGGIO, M. F.; RIBEIRO-FILHO, L. A.; ANTUNES, A. A.; CRIPPA, A.; NESRALLAH, L.; GONCALVES, P. D.; LEITE, K. R.; SROUGI, M. Microvascular tumor invasion, tumor size and Fuhrman grade: a pathological triad for prognostic evaluation of renal cell carcinoma. **J Urol**, v. 178, n. 2, p. 425-8; discussion 428, Aug 2007.

DALLAS, P. B.; GOTTARDO, N. G.; FIRTH, M. J.; BEESLEY, A. H.; HOFFMANN, K.; TERRY, P. A.; FREITAS, J. R.; BOAG, J. M.; CUMMINGS, A. J.; KEES, U. R. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? **BMC Genomics**, v. 6, p. 59, 2005.

DELAHUNT, B. Advances and controversies in grading and staging of renal cell carcinoma. **Mod Pathol**, v. 22 Suppl 2, p. S24-36, Jun 2009.

DIAS-NETO, E.; CORREA, R. G.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; BRIONES, M. R.; NAGAI, M. A.; DA SILVA, W., JR.; ZAGO, M. A.; BORDIN, S.; COSTA, F. F.; GOLDMAN, G. H.; CARVALHO, A. F.; MATSUKUMA, A.; BAIA, G. S.; SIMPSON, D. H.; BRUNSTEIN, A.; DE OLIVEIRA, P. S.; BUCHER, P.; JONGENEEL, C. V.; O'HARE, M. J.; SOARES, F.; BRENTANI, R. R.; REIS, L. F.; DE SOUZA, S. J.; SIMPSON, A. J. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 7, p. 3491-3496, Mar 28 2000.

DIXSON, J. D.; FORSTNER, M. J.; GARCIA, D. M. The alpha-actinin gene family: a revised classification. **J Mol Evol**, v. 56, n. 1, p. 1-10, Jan 2003.

EBLE, J. N.; TOGASHI, K.; PISANI, P. Tumours of the Kidney. In: EBLE, J. N.; SAUTER, G., *et al* (Ed.). **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs**. Lyon, France: IARC Press, 2004. cap. 1,

ECKEL-PASSOW, J. E.; LOHSE, C. M.; SHEININ, Y.; CRISPEN, P. L.; KRICO, C. J.; KWON, E. D. Tissue microarrays: one size does not fit all. **Diagn Pathol**, v. 5, p. 48, 2010.

EICHELBERG, C.; JUNKER, K.; LJUNGBERG, B.; MOCH, H. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. **Eur Urol**, v. 55, n. 4, p. 851-63, Apr 2009.

ELSHAZLEY, M.; SATO, M.; HASE, T.; YAMASHITA, R.; YOSHIDA, K.; TOYOKUNI, S.; ISHIGURO, F.; OSADA, H.; SEKIDO, Y.; YOKOI, K.; USAMI, N.; SHAMES, D. S.; KONDO, M.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; HASEGAWA, Y. The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant pleural mesothelioma. **Int J Cancer**, v. 131, n. 12, p. 2820-31, Dec 15 2012.

ERDOGAN, F.; DEMIREL, A.; POLAT, O. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **Int J Clin Pract**, v. 58, n. 4, p. 333-6, Apr 2004.

ETIENNE, W.; MEYER, M. H.; PEPPERS, J.; MEYER, R. A., JR. Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. **Biotechniques**, v. 36, n. 4, p. 618-20, 622, 624-6, Apr 2004.

FAVIER, J.; LAPOINTE, S.; MALIBA, R.; SIROIS, M. G. HIF2 alpha reduces growth rate but promotes angiogenesis in a mouse model of neuroblastoma. **BMC Cancer**, v. 7, p. 139, 2007.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-917, Dec 15 2010.

FICARRA, V.; GALFANO, A.; MANCINI, M.; MARTIGNONI, G.; ARTIBANI, W. TNM staging system for renal-cell carcinoma: current status and future perspectives. **Lancet Oncol**, v. 8, n. 6, p. 554-8, Jun 2007.

FICARRA, V.; MARTIGNONI, G.; MAFFEI, N.; BRUNELLI, M.; NOVARA, G.; ZANOLLA, L.; PEA, M.; ARTIBANI, W. Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. **Cancer**, v. 103, n. 1, p. 68-75, Jan 1 2005.

FICARRA, V.; PRAYER-GALETTI, T.; NOVELLA, G.; BRATTI, E.; MAFFEI, N.; DAL BIANCO, M.; ARTIBANI, W.; PAGANO, F. Incidental detection beyond pathological factors as prognostic predictor of renal cell carcinoma. **Eur Urol**, v. 43, n. 6, p. 663-9, Jun 2003.

FICARRA, V.; SCHIPS, L.; GUILLE, F.; LI, G.; DE LA TAILLE, A.; PRAYER GALETTI, T.; CINDOLO, L.; NOVARA, G.; ZIGEUNER, R. E.; BRATTI, E.; TOSTAIN, J.; ALTIERI, V.; ABBOU, C. C.; ARTIBANI, W.; PATARD, J. J. Multiinstitutional European validation of the 2002 TNM staging system in conventional and papillary localized renal cell carcinoma. **Cancer**, v. 104, n. 5, p. 968-74, Sep 1 2005.

FRANK, I.; BLUTE, M. L.; CHEVILLE, J. C.; LOHSE, C. M.; WEAVER, A. L.; ZINCKE, H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. **J Urol**, v. 168, n. 6, p. 2395-400, Dec 2002.

FRANK, I.; BLUTE, M. L.; LEIBOVICH, B. C.; CHEVILLE, J. C.; LOHSE, C. M.; ZINCKE, H. Independent validation of the 2002 American Joint Committee on cancer primary tumor classification for renal cell carcinoma using a large, single institution cohort. **J Urol**, v. 173, n. 6, p. 1889-92, Jun 2005.

FU, L.; LEE, C. C. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 5, p. 350-61, May 2003.

FU, L.; QIN, Y. R.; XIE, D.; CHOW, H. Y.; NGAI, S. M.; KWONG, D. L.; LI, Y.; GUAN, X. Y. Identification of alpha-actinin 4 and 67 kDa laminin receptor as stage-specific markers in esophageal cancer via proteomic approaches. **Cancer**, v. 110, n. 12, p. 2672-81, Dec 15 2007.

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

GARCIA, J. A.; RINI, B. I. Recent progress in the management of advanced renal cell carcinoma. **CA Cancer J Clin**, v. 57, n. 2, p. 112-25, Mar-Apr 2007.

GODLEY, P.; KIM, S. W. Renal cell carcinoma. **Curr Opin Oncol**, v. 14, n. 3, p. 280-5, May 2002.

GUINAN, P.; SOBIN, L. H.; ALGABA, F.; BADELLINO, F.; KAMEYAMA, S.; MACLENNAN, G.; NOVICK, A. TNM staging of renal cell carcinoma: Workgroup No. 3. Union International Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). **Cancer**, v. 80, n. 5, p. 992-3, Sep 1 1997.

HAKIMI, A. A.; PHAM, C. G.; HSIEH, J. J. A clear picture of renal cell carcinoma. **Nat Genet**, v. 45, n. 8, p. 849-50, Aug 2013.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HARA, T.; HONDA, K.; SHITASHIGE, M.; ONO, M.; MATSUYAMA, H.; NAITO, K.; HIROHASHI, S.; YAMADA, T. Mass spectrometry analysis of the native protein complex containing actinin-4 in prostate cancer cells. **Mol Cell Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 479-91, Mar 2007.

HENDERSON, J. M.; AL-WAHEEB, S.; WEINS, A.; DANDAPANI, S. V.; POLLAK, M. R. Mice with altered alpha-actinin-4 expression have distinct morphologic patterns of glomerular disease. **Kidney Int**, v. 73, n. 6, p. 741-50, Mar 2008.

HENRIKSEN, K. L.; RASMUSSEN, B. B.; LYKKESFELDT, A. E.; MOLLER, S.; EJLERTSEN, B.; MOURIDSEN, H. T. Semi-quantitative scoring of potentially predictive markers for endocrine treatment of breast cancer: a comparison between whole sections and tissue microarrays. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 4, p. 397-404, Apr 2007.

HIROTA, E.; YAN, L.; TSUNODA, T.; ASHIDA, S.; FUJIME, M.; SHUIN, T.; MIKI, T.; NAKAMURA, Y.; KATAGIRI, T. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 29, n. 4, p. 799-827, Oct 2006.

HONDA, K.; YAMADA, T.; ENDO, R.; INO, Y.; GOTOH, M.; TSUDA, H.; YAMADA, Y.; CHIBA, H.; HIROHASHI, S. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. **J Cell Biol**, v. 140, n. 6, p. 1383-93, Mar 23 1998.

HONDA, K.; YAMADA, T.; HAYASHIDA, Y.; IDOGAWA, M.; SATO, S.; HASEGAWA, F.; INO, Y.; ONO, M.; HIROHASHI, S. Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. **Gastroenterology**, v. 128, n. 1, p. 51-62, Jan 2005.

HOPFL, G.; OGUNSHOLA, O.; GASSMANN, M. HIFs and tumors--causes and consequences. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, n. 4, p. R608-23, Apr 2004.

HSU, C. M.; LIN, S. F.; LU, C. T.; LIN, P. M.; YANG, M. Y. Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma. **Tumour Biol**, v. 33, n. 1, p. 149-55, Feb 2012.

HUDSON, R. S.; YI, M.; ESPOSITO, D.; GLYNN, S. A.; STARKS, A. M.; YANG, Y.; SCHETTER, A. J.; WATKINS, S. K.; HURWITZ, A. A.; DORSEY, T. H.; STEPHENS, R. M.; CROCE, C. M.; AMBS, S. MicroRNA-106b-25 cluster expression is associated with early disease recurrence and targets caspase-7 and focal adhesion in human prostate cancer. **Oncogene**, v. 32, n. 35, p. 4139-47, Aug 29 2013.

IKEDA, M.; NOMURA, M. cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 233, n. 1, p. 258-64, Apr 7 1997.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer no Brasil. Dados dos Registros de Base Populacional v.4. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/> >.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil., 2011. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp> >.

JONASCH, E.; FUTREAL, P. A.; DAVIS, I. J.; BAILEY, S. T.; KIM, W. Y.; BRUGAROLAS, J.; GIACCIA, A. J.; KURBAN, G.; PAUSE, A.; FRYDMAN, J.; ZURITA, A. J.; RINI, B. I.; SHARMA, P.; ATKINS, M. B.; WALKER, C. L.; RATHMELL, W. K. State of the science: an update on renal cell carcinoma. **Mol Cancer Res**, v. 10, n. 7, p. 859-80, Jul 2012.

JONES, J.; LIBERMANN, T. A. Genomics of renal cell cancer: the biology behind and the therapy ahead. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 2 Pt 2, p. 685s-692s, Jan 15 2007.

JONES, J.; OTU, H.; SPENTZOS, D.; KOLIA, S.; INAN, M.; BEECKEN, W. D.; FELLBAUM, C.; GU, X.; JOSEPH, M.; PANTUCK, A. J.; JONAS, D.; LIBERMANN, T. A. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 16, p. 5730-9, Aug 15 2005.

KANE, C. J.; MALLIN, K.; RITCHEY, J.; COOPERBERG, M. R.; CARROLL, P. R. Renal cell cancer stage migration: analysis of the National Cancer Data Base. **Cancer**, v. 113, n. 1, p. 78-83, Jul 1 2008.

KAPLAN, J. M.; KIM, S. H.; NORTH, K. N.; RENNKE, H.; CORREIA, L. A.; TONG, H. Q.; MATHIS, B. J.; RODRIGUEZ-PEREZ, J. C.; ALLEN, P. G.; BEGGS, A. H.; POLLAK, M. R. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. **Nat Genet**, v. 24, n. 3, p. 251-6, Mar 2000.

KARAKIEWICZ, P. I.; BRIGANTI, A.; CHUN, F. K.; TRINH, Q. D.; PERROTTE, P.; FICARRA, V.; CINDOLO, L.; DE LA TAILLE, A.; TOSTAIN, J.; MULDER, P. F.; SALOMON, L.; ZIGEUNER, R.; PRAYER-GALETTE, T.; CHAUTARD, D.; VALERI, A.; LECHEVALLIER, E.; DESCOTES, J. L.; LANG, H.; MEJEAN, A.; PATARD, J. J. Multi-institutional validation of a new renal cancer-specific survival nomogram. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 11, p. 1316-22, Apr 10 2007.

KATTAN, M. W.; REUTER, V.; MOTZER, R. J.; KATZ, J.; RUSSO, P. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. **J Urol**, v. 166, n. 1, p. 63-7, Jul 2001.

KIKUCHI, S.; HONDA, K.; TSUDA, H.; HIRAOKA, N.; IMOTO, I.; KOSUGE, T.; UMAKI, T.; ONOZATO, K.; SHITASHIGE, M.; YAMAGUCHI, U.; ONO, M.; TSUCHIDA, A.; AOKI, T.; INAZAWA, J.; HIROHASHI, S.; YAMADA, T. Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 17, p. 5348-56, Sep 1 2008.

KIM, C. M.; VOCKE, C.; TORRES-CABALA, C.; YANG, Y.; SCHMIDT, L.; WALTHER, M.; LINEHAN, W. M. Expression of hypoxia inducible factor-1alpha and 2alpha in genetically distinct early renal cortical tumors. **J Urol**, v. 175, n. 5, p. 1908-14, May 2006.

KIM, H. L.; SELIGSON, D.; LIU, X.; JANZEN, N.; BUI, M. H.; YU, H.; SHI, T.; FIGLIN, R. A.; HORVATH, S.; BELLDEGRUN, A. S. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 16, p. 5464-71, Aug 15 2004.

KLATTE, T.; SELIGSON, D. B.; LAROCHELLE, J.; SHUCH, B.; SAID, J. W.; RIGGS, S. B.; ZOMORODIAN, N.; KABBINAVAR, F. F.; PANTUCK, A. J.; BELLDEGRUN, A. S. Molecular signatures of localized clear cell renal cell carcinoma to predict disease-free survival after nephrectomy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 3, p. 894-900, Mar 2009.

KOLENKO, V.; UZZO, R. G.; BUKOWSKI, R.; BANDER, N. H.; NOVICK, A. C.; HSI, E. D.; FINKE, J. H. Dead or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 59, n. 12, p. 2838-42, Jun 15 1999.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIEMI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S.; TORHORST, J.; MIHATSCH, M. J.; SAUTER, G.; KALLIONIEMI, O. P. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med**, v. 4, n. 7, p. 844-7, Jul 1998.

KOPPER, L.; TIMAR, J. Genomics of renal cell cancer-- does it provide breakthrough? **Pathol Oncol Res**, v. 12, n. 1, p. 5-11, 2006.

KOVACS, G.; AKHTAR, M.; BECKWITH, B. J.; BUGERT, P.; COOPER, C. S.; DELAHUNT, B.; EBLE, J. N.; FLEMING, S.; LJUNGBERG, B.; MEDEIROS, L. J.; MOCH, H.; REUTER, V. E.; RITZ, E.; ROOS, G.; SCHMIDT, D.; SRIGLEY, J. R.; STORKEL, S.; VAN DEN BERG, E.; ZBAR, B. The Heidelberg classification of renal cell tumours. **J Pathol**, v. 183, n. 2, p. 131-3, Oct 1997.

KUO, S. J.; CHEN, S. T.; YEH, K. T.; HOU, M. F.; CHANG, Y. S.; HSU, N. C.; CHANG, J. G. Disturbance of circadian gene expression in breast cancer. **Virchows Arch**, v. 454, n. 4, p. 467-74, Apr 2009.

LAM, J. S.; SHVARTS, O.; LEPPERT, J. T.; FIGLIN, R. A.; BELLDEGRUN, A. S. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. **J Urol**, v. 173, n. 6, p. 1853-62, Jun 2005.

LAMONT, E. W.; JAMES, F. O.; BOIVIN, D. B.; CERMAKIAN, N. From circadian clock gene expression to pathologies. **Sleep Med**, v. 8, n. 6, p. 547-56, Sep 2007.

LANE, B. R. Prognostic Factors for Localized Renal Cell Carcinoma. In: CAMPBELL, S. C. e RINI, B. I. (Ed.). **Renal cell carcinoma: Clinical Management (Current Clinical Urology)**: Springer Science+Business Media New York, 2013. cap. 5,

LEE, C. T.; KATZ, J.; FEARN, P. A.; RUSSO, P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. **Urol Oncol**, v. 7, n. 4, p. 135-40, Jul-Aug 2002.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194-206, Oct 20 2008.

LIU, L. S.; SHI, T.; DUAN, Z. H.; SADHUKHAN, P.; DER, S. D.; NOVICK, A. A.; HISSONG, J.; SKACEL, M.; ALMASAN, A.; DIDONATO, J. A. Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma. **BMC Urol**, v. 4, p. 9, Jun 22 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LJUNGBERG, B. Kidney cancer: A new nomogram predicting survival in renal cell carcinoma. **Nat Rev Urol**, v. 7, n. 8, p. 423-4, Aug 2010.

LOPEZ-BELTRAN, A.; CARRASCO, J. C.; CHENG, L.; SCARPELLI, M.; KIRKALI, Z.; MONTIRONI, R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. **Int J Urol**, v. 16, n. 5, p. 432-43, May 2009.

LOPEZ-BELTRAN, A.; SCARPELLI, M.; MONTIRONI, R.; KIRKALI, Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. **Eur Urol**, v. 49, n. 5, p. 798-805, May 2006.

MAZUMDAR, M.; GLASSMAN, J. R. Categorizing a prognostic variable: review of methods, code for easy implementation and applications to decision-making about cancer treatments. **Stat Med**, v. 19, n. 1, p. 113-32, Jan 15 2000.

MAZZOCCOLI, G.; DE CATA, A.; PIEPOLI, A.; VINCIGUERRA, M. The circadian clock and the hypoxic response pathway in kidney cancer. **Tumour Biol**, Aug 14 2013.

MAZZOCCOLI, G.; PANZA, A.; VALVANO, M. R.; PALUMBO, O.; CARELLA, M.; PAZIENZA, V.; BISCAGLIA, G.; TAVANO, F.; DI SEBASTIANO, P.; ANDRIULLI, A.; PIEPOLI, A. Clock gene expression levels and relationship with clinical and pathological features in colorectal cancer patients. **Chronobiol Int**, v. 28, n. 10, p. 841-51, Dec 2011.

MCCARTY, K. S., JR.; SZABO, E.; FLOWERS, J. L.; COX, E. B.; LEIGHT, G. S.; MILLER, L.; KONRATH, J.; SOPER, J. T.; BUDWIT, D. A.; CREASMAN, W. T.; ET AL. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. **Cancer Res**, v. 46, n. 8 Suppl, p. 4244s-4248s, Aug 1986.

MENEZ, J.; LE MAUX CHANSAC, B.; DOROTHEE, G.; VERGNON, I.; JALIL, A.; CARLIER, M. F.; CHOUAIB, S.; MAMI-CHOUAIB, F. Mutant alpha-actinin-4 promotes tumorigenicity and regulates cell motility of a human lung carcinoma. **Oncogene**, v. 23, n. 15, p. 2630-9, Apr 8 2004.

MILOWSKY, M. I.; NANUS, D. M. Chemotherapeutic strategies for renal cell carcinoma. **Urol Clin North Am**, v. 30, n. 3, p. 601-9, x, Aug 2003.

MOREY, J. S.; RYAN, J. C.; VAN DOLAH, F. M. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biol Proced Online**, v. 8, p. 175-93, 2006.

MOTZER, R. J.; MAZUMDAR, M.; BACIK, J.; BERG, W.; AMSTERDAM, A.; FERRARA, J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. **J Clin Oncol**, v. 17, n. 8, p. 2530-40, Aug 1999.

MUTCH, D. M.; BERGER, A.; MANSOURIAN, R.; RYTZ, A.; ROBERTS, M. A. The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. **BMC Bioinformatics**, v. 3, p. 17, Jun 21 2002.

NARDI, A. C.; ZEQUI SDE, C.; CLARK, O. A.; ALMEIDA, J. C.; GLINA, S. Epidemiologic characteristics of renal cell carcinoma in Brazil. **Int Braz J Urol**, v. 36, n. 2, p. 151-7; discussion 158, Mar-Apr 2010.

NAVAL, N.; WOOD, C. G. Environmental and modifiable risk factors in renal cell carcinoma. **Urol Oncol**, v. 30, n. 2, p. 220-4, Mar-Apr 2012.

NIKOLOPOULOS, S. N.; SPENGLER, B. A.; KISSELBACH, K.; EVANS, A. E.; BIEDLER, J. L.; ROSS, R. A. The human non-muscle alpha-actinin protein encoded by the ACTN4 gene suppresses tumorigenicity of human neuroblastoma cells. **Oncogene**, v. 19, n. 3, p. 380-6, Jan 20 2000.

NOVARA, G.; FICARRA, V.; ANTONELLI, A.; ARTIBANI, W.; BERTINI, R.; CARINI, M.; COSCIANI CUNICO, S.; IMBIMBO, C.; LONGO, N.; MARTIGNONI, G.; MARTORANA, G.; MINERVINI, A.; MIRONE, V.; MONTORSI, F.; SCHIAVINA, R.; SIMEONE, C.; SERNI, S.; SIMONATO, A.; SIRACUSANO, S.; VOLPE, A.; CARMIGNANI, G. Validation of the 2009 TNM version in a large multi-institutional cohort

of patients treated for renal cell carcinoma: are further improvements needed? **Eur Urol**, v. 58, n. 4, p. 588-95, Oct 2010.

OKEN, M. M.; CREECH, R. H.; TORMEY, D. C.; HORTON, J.; DAVIS, T. E.; MCFADDEN, E. T.; CARBONE, P. P. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. **Am J Clin Oncol**, v. 5, n. 6, p. 649-55, Dec 1982.

OSHIMA, T.; TAKENOSHITA, S.; AKAIKE, M.; KUNISAKI, C.; FUJII, S.; NOZAKI, A.; NUMATA, K.; SHIOZAWA, M.; RINO, Y.; TANAKA, K.; MASUDA, M.; IMADA, T. Expression of circadian genes correlates with liver metastasis and outcomes in colorectal cancer. **Oncol Rep**, v. 25, n. 5, p. 1439-46, May 2011.

PALMERINI, F.; DEVILARD, E.; JARRY, A.; BIRG, F.; XERRI, L. Caspase 7 downregulation as an immunohistochemical marker of colonic carcinoma. **Hum Pathol**, v. 32, n. 5, p. 461-7, May 2001.

PENA-LLOPIS, S.; VEGA-RUBIN-DE-CELIS, S.; LIAO, A.; LENG, N.; PAVIA-JIMENEZ, A.; WANG, S.; YAMASAKI, T.; ZHREBKER, L.; SIVANAND, S.; SPENCE, P.; KINCH, L.; HAMBUCH, T.; JAIN, S.; LOTAN, Y.; MARGULIS, V.; SAGALOWSKY, A. I.; SUMMEROUR, P. B.; KABBANI, W.; WONG, S. W.; GRISHIN, N.; LAURENT, M.; XIE, X. J.; HAUDENSCHILD, C. D.; ROSS, M. T.; BENTLEY, D. R.; KAPUR, P.; BRUGAROLAS, J. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. **Nat Genet**, v. 44, n. 7, p. 751-9, Jul 2012.

PLATI, J.; BUCUR, O.; KHOSRAVI-FAR, R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. **Integr Biol (Camb)**, v. 3, n. 4, p. 279-96, Apr 2011.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett**, v. 339, n. 1, p. 62-6, Mar 13 2003.

REINER, A.; NEUMEISTER, B.; SPONA, J.; REINER, G.; SCHEMPER, M.; JAKESZ, R. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. **Cancer Res**, v. 50, n. 21, p. 7057-61, Nov 1 1990.

RELLES, D.; SENDECKI, J.; CHIPITSYNA, G.; HYSLOP, T.; YEO, C. J.; ARAFAT, H. A. Circadian gene expression and clinicopathologic correlates in pancreatic cancer. **J Gastrointest Surg**, v. 17, n. 3, p. 443-50, Mar 2013.

RELOGIO, A.; SCHWAGER, C.; RICHTER, A.; ANSORGE, W.; VALCARCEL, J. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 11, p. e51, Jun 1 2002.

RILEY, R. D.; SAUERBREI, W.; ALTMAN, D. G. Prognostic markers in cancer: the evolution of evidence from single studies to meta-analysis, and beyond. **Br J Cancer**, v. 100, n. 8, p. 1219-29, Apr 21 2009.

RIMM, D. L. What brown cannot do for you. **Nat Biotechnol**, v. 24, n. 8, p. 914-6, Aug 2006.

RIMM, D. L.; GILTNANE, J. M.; MOEDER, C.; HARIGOPAL, M.; CHUNG, G. G.; CAMP, R. L.; BURTNES, B. Bimodal population or pathologist artifact? **J Clin Oncol**, v. 25, n. 17, p. 2487-8, Jun 10 2007.

RINI, B. I. New strategies in kidney cancer: therapeutic advances through understanding the molecular basis of response and resistance. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 5, p. 1348-54, Mar 1 2010.

RINI, B. I.; CAMPBELL, S. C.; ESCUDIER, B. Renal cell carcinoma. **Lancet**, v. 373, n. 9669, p. 1119-32, Mar 28 2009.

RODRIGUEZ-BERRIGUETE, G.; GALVIS, L.; FRAILE, B.; DE BETHENCOURT, F. R.; MARTINEZ-ONSURBE, P.; OLMEDILLA, G.; PANIAGUA, R.; ROYUELA, M. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. **Hum Pathol**, v. 43, n. 2, p. 229-37, Feb 2012.

ROJO, M. G.; BUENO, G.; SLODKOWSKA, J. Review of imaging solutions for integrated quantitative immunohistochemistry in the Pathology daily practice. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 47, n. 3, p. 349-54, Jan 2009.

SATO, Y.; YOSHIKATO, T.; SHIRAIISHI, Y.; MAEKAWA, S.; OKUNO, Y.; KAMURA, T.; SHIMAMURA, T.; SATO-OTSUBO, A.; NAGAE, G.; SUZUKI, H.; NAGATA, Y.; YOSHIDA, K.; KON, A.; SUZUKI, Y.; CHIBA, K.; TANAKA, H.; NIIDA, A.; FUJIMOTO, A.; TSUNODA, T.; MORIKAWA, T.; MAEDA, D.; KUME, H.; SUGANO, S.; FUKAYAMA, M.; ABURATANI, H.; SANADA, M.; MIYANO, S.; HOMMA, Y.; OGAWA, S. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. **Nat Genet**, v. 45, n. 8, p. 860-7, Aug 2013.

SCHRAML, P.; KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; MOCH, H.; BISSIG, H.; NOCITO, A.; MIHATSCH, M. J.; KALLIONIEMI, O. P.; SAUTER, G. Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. **Clin Cancer Res**, v. 5, n. 8, p. 1966-75, Aug 1999.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Mol Biol**, v. 7, p. 3, 2006.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 10, p. 721-32, Oct 2003.

SINGER, E. A.; GUPTA, G. N.; SRINIVASAN, R. Update on targeted therapies for clear cell renal cell carcinoma. **Curr Opin Oncol**, v. 23, n. 3, p. 283-9, May 2011.

SKUBITZ, K. M.; SKUBITZ, A. P. Differential gene expression in renal-cell cancer. **J Lab Clin Med**, v. 140, n. 1, p. 52-64, Jul 2002.

SKUBITZ, K. M.; ZIMMERMAN, W.; KAMMERER, R.; PAMBUCCIAN, S.; SKUBITZ, A. P. Differential gene expression identifies subgroups of renal cell carcinoma. **J Lab Clin Med**, v. 147, n. 5, p. 250-67, May 2006.

SLABY, O.; JANCOVICOVA, J.; LAKOMY, R.; SVOBODA, M.; POPRACH, A.; FABIAN, P.; KREN, L.; MICHALEK, J.; VYZULA, R. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 29, p. 90, 2010.

SMALDONE, M. C.; MARANCHIE, J. K. Clinical implications of hypoxia inducible factor in renal cell carcinoma. **Urol Oncol**, v. 27, n. 3, p. 238-45, May-Jun 2009.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**. 6th ed. / edited by L.H. Sobin and Ch. Wittekind. New York; : Wiley-Liss, 2002. ISBN 0-471-22288-7 (alk. Paper).

SORBELLINI, M.; KATTAN, M. W.; SNYDER, M. E.; REUTER, V.; MOTZER, R.; GOETZL, M.; MCKIERNAN, J.; RUSSO, P. A postoperative prognostic nomogram predicting recurrence for patients with conventional clear cell renal cell carcinoma. **J Urol**, v. 173, n. 1, p. 48-51, Jan 2005.

SRIGLEY, J. R.; HUTTER, R. V.; GELB, A. B.; HENSON, D. E.; KENNEY, G.; KING, B. F.; RAZIUDDIN, S.; PISANSKY, T. M. Current prognostic factors--renal cell carcinoma: Workgroup No. 4. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). **Cancer**, v. 80, n. 5, p. 994-6, Sep 1 1997.

SUN, M.; LUGHEZZANI, G.; JELDRES, C.; ISBARN, H.; SHARIAT, S. F.; ARJANE, P.; WIDMER, H.; PHARAND, D.; LATOUR, M.; PERROTTE, P.; PATARD, J. J.; KARAKIEWICZ, P. I. A Proposal for Reclassification of the Fuhrman Grading System in Patients with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **Eur Urol**, Jun 21 2009.

TAKAHASHI, J. S.; HONG, H. K.; KO, C. H.; MCDEARMON, E. L. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 10, p. 764-75, Oct 2008.

TAKAHASHI, M.; RHODES, D. R.; FURGE, K. A.; KANAYAMA, H.; KAGAWA, S.; HAAB, B. B.; TEH, B. T. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 17, p. 9754-9, Aug 14 2001.

TALKS, K. L.; TURLEY, H.; GATTER, K. C.; MAXWELL, P. H.; PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J.; HARRIS, A. L. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. **Am J Pathol**, v. 157, n. 2, p. 411-21, Aug 2000.

TANIGUCHI, H.; FERNANDEZ, A. F.; SETIEN, F.; ROPERO, S.; BALLESTAR, E.; VILLANUEVA, A.; YAMAMOTO, H.; IMAI, K.; SHINOMURA, Y.; ESTELLER, M. Epigenetic inactivation of the circadian clock gene BMAL1 in hematologic malignancies. **Cancer Res**, v. 69, n. 21, p. 8447-54, Nov 1 2009.

TAYLOR, C. R.; LEVENSON, R. M. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. **Histopathology**, v. 49, n. 4, p. 411-24, Oct 2006.

THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. **Nature**, v. 499, n. 7456, p. 43-9, Jul 4 2013.

THOMPSON, R. H.; LEIBOVICH, B. C.; LOHSE, C. M.; CHEVILLE, J. C.; ZINCKE, H.; BLUTE, M. L.; FRANK, I. Dynamic outcome prediction in patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy: the D-SSIGN score. **J Urol**, v. 177, n. 2, p. 477-80, Feb 2007.

THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1312-6, Aug 28 1998.

TIAN, H.; MCKNIGHT, S. L.; RUSSELL, D. W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. **Genes Dev**, v. 11, n. 1, p. 72-82, Jan 1 1997.

TORHORST, J.; BUCHER, C.; KONONEN, J.; HAAS, P.; ZUBER, M.; KOCHLI, O. R.; MROSS, F.; DIETERICH, H.; MOCH, H.; MIHATSCH, M.; KALLIONIEMI, O. P.; SAUTER, G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. **Am J Pathol**, v. 159, n. 6, p. 2249-56, Dec 2001.

TUNUGUNTALA, H. S.; JORDA, M. Diagnostic and prognostic molecular markers in renal cell carcinoma. **J Urol**, v. 179, n. 6, p. 2096-102, Jun 2008.

TURBIN, D. A.; LEUNG, S.; CHEANG, M. C.; KENNECKE, H. A.; MONTGOMERY, K. D.; MCKINNEY, S.; TREABA, D. O.; BOYD, N.; GOLDSTEIN, L. C.; BADVE, S.; GOWN, A. M.; VAN DE RIJN, M.; NIELSEN, T. O.; GILKS, C. B.; HUNTSMAN, D. G. Automated quantitative analysis of estrogen receptor expression in breast carcinoma does not differ from expert pathologist scoring: a tissue microarray study of 3,484 cases. **Breast Cancer Res Treat**, v. 110, n. 3, p. 417-26, Aug 2008.

VILELLA-ARIAS, S. A.; ROCHA, R. M.; DA COSTA, W. H.; ZEQUI SDE, C.; GUIMARAES, G. C.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; SOARES, F. A.; REIS, E. M. Loss of caspase 7 expression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma clear cell subtype. **Urology**, v. 82, n. 4, p. 974 e1-7, Oct 2013.

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

WALKER, R. A. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. **Histopathology**, v. 49, n. 4, p. 406-10, Oct 2006.

WAN, W. H.; FORTUNA, M. B.; FURMANSKI, P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. **J Immunol Methods**, v. 103, n. 1, p. 121-9, Oct 23 1987.

WIESENER, M. S.; TURLEY, H.; ALLEN, W. E.; WILLAM, C.; ECKARDT, K. U.; TALKS, K. L.; WOOD, S. M.; GATTER, K. C.; HARRIS, A. L.; PUGH, C. W.; RATCLIFFE, P. J.; MAXWELL, P. H. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by

hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2260-8, Oct 1 1998.

WOLTING, C. D.; MCGLADE, C. J. Cloning and chromosomal localization of a new member of the bHLH/PAS transcription factor family. **Mamm Genome**, v. 9, n. 6, p. 463-8, Jun 1998.

YAMAMOTO, S.; TSUDA, H.; HONDA, K.; ONOZATO, K.; TAKANO, M.; TAMAI, S.; IMOTO, I.; INAZAWA, J.; YAMADA, T.; MATSUBARA, O. Actinin-4 gene amplification in ovarian cancer: a candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. **Mod Pathol**, v. 22, n. 4, p. 499-507, Apr 2009.

YUEN, T.; WURMBACH, E.; PFEFFER, R. L.; EBERSOLE, B. J.; SEALFON, S. C. Accuracy and calibration of commercial oligonucleotide and custom cDNA microarrays. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 10, p. e48, May 15 2002.

ZISMAN, A.; PANTUCK, A. J.; DOREY, F.; SAID, J. W.; SHVARTS, O.; QUINTANA, D.; GITLITZ, B. J.; DEKERNION, J. B.; FIGLIN, R. A.; BELLDEGRUN, A. S. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. **J Clin Oncol**, v. 19, n. 6, p. 1649-57, Mar 15 2001.

ANEXO I

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 15 de maio de 2012.

Ao
Dr. Eduardo Moraes Rego Reis.

Aluno: Santiago Andrés Vilella Arias (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1665/12
“Validação de marcadores de malignidade expressos no câncer renal”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua reunião extraordinária de 15/05/2012, aprovaram a realização do projeto do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedades das Informações Geradas;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Ciência do Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Comprometimento da Instituição Co-Participante;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

ANEXO II

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Santiago Andrés Vilella Arias

Nascimento: 18 de Março de 1983

Naturalidade: Posadas (Misiones)

Nacionalidade: Argentina

Endereço: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Sala 1200, 05508-000 São Paulo, SP.

Fone (11) 3091-2173 ramal: 209

E-mail: santiago@iq.usp.br

Formação Acadêmica

- Graduação: (2001 – 2007) Licenciatura en Genética – Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN). Universidad Nacional de Misiones (UNaM) – Argentina. Título: “Expresión y Purificación de Proteínas Recombinantes, como parte del Proyecto Genoma Estructural de *Trypanosoma cruzi*” – Orientador: Hernán Terenzi; Co-orientador: Javier Vernal.
- Doutorado: (2008) Doutorado em Ciências, Área: Bioquímica. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química (IQ). Universidade de São Paulo (USP) – Brasil. Título: “Validação de marcadores de malignidade expressos no câncer renal” – Orientador: Eduardo Moraes Rego Reis. Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP)

Formação Complementar

- (2012) “Nuevos Conceptos de Muerte Celular Programada” – Duração: 50hs – Modalidade: Teórico e Prático com exame final – Coordenadores: Dra. Marta Tesone, Dra. Gabriela Meresman e Dra. Fernanda Parborell – Local: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBiME).
- (2007) “Tópicos de Biología Celular Avanzada” – Duração: 140hs – Modalidade: Teórico e Prático com exame final – Coordenadores: Dra. Graciela L. Boccaccio e Dr. Mario D. Galigniana – Local: Instituto Leloir, Buenos Aires.
- (2004) “Técnicas Moleculares Aplicadas como Herramientas para la Investigación Biológica” – Duração: 45hs – Modalidade: Teórico e Prático com exame final – Coordenadores: Dr. Sergio Andrés Tonon. - Local: FCEQyN, UNaM.

Atuação Profissional

- Participação em Projeto: (2008 – 2013) “Caracterização funcional de RNAs intrônicos não-codificadores expressos no genoma humano” – Local: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química (IQ). Universidade de São Paulo (USP) – Coordenador: Dr. Sergio Verjovski-Almeida.
- Participação em Projeto: (4/2006 – 12/2006) “Expressão e Purificação de Proteínas Recombinantes de Trypanosoma cruzi de em bactéria, como parte do Projeto Genoma Estrutural do Parasita” – Local: Laboratório de Expressão Gênica e Interação DNA– Proteína. Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Orientador: Dr. Terenzi Hernán; Co-orientador: Dr. Vernal Javier.
- Participação em Projeto: (04/2005 – 08/2005) “Análisis epidemiológico molecular de virus re-emergentes en vectores capturados, bojo el proyecto de investigación: Circulación de arbovirus reemergentes transmitidos por mosquitos vectores de los géneros Culex y Aedes, en Posadas y Puerto Iguazú, Provincia de Misiones” – Local: Laboratorio de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN). Universidad Nacional de Misiones (UNaM) – Orientador: PhD. Tonon Sergio.

Produção Bibliográfica

▪ ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS:

VILELLA-ARIAS, S. A.; ROCHA, R. M.; COSTA, W. H.; ZEQUI, S. C.; GUIMARÃES, Gustavo S.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; SOARES, F. A.; REIS E.M. . *Loss of Caspase 7 expression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma clear cell subtype*. Urology (Ridgewood, N.J.), **2013**. 82(4): p. 974.e1-974.e7.

FACHEL, ANGELA A ; TAHIRA, ANA C ; **VILELLA-ARIAS, SANTIAGO A** ; MARACAJA-COUTINHO, VINICIUS ; GIMBA, ETEL RP ; VIGNAL, GISELLE M ; CAMPOS, FRANZ S ; REIS, EDUARDO M ; VERJOVSKI-ALMEIDA, SERGIO. *Expression analysis and in silico characterization of intronic long noncoding RNAs in renal cell carcinoma: emerging functional associations*. Molecular Cancer, **2013**. 12:p. 140.

Ecco, Gabriela; Vernal, Javier; Razzera, Guilherme; Tavares, Carolina; Serpa, Viviane Isabel; **Arias, Santiago**; Marchini, Fabricio Klerlynton; Krieger, Marco Aurelio ; Goldenberg, Samuel ; Terenzi, Hernán. *Initial characterization of a recombinant kynureninase from Trypanosoma cruzi identified from an EST database*. Gene (Amsterdam), **2009**. 448(1): p.1-6.

▪ RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS:

VILELLA-ARIAS, Santiago A.; FACHEL, Ângela A.; ROCHA, Rafael M.; SOARES, Fernando A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, Sergio; REIS, Eduardo M. R. *Characterization of noncoding and protein coding transcripts from two loci as molecular marker candidates in renal cell carcinoma* – Advanced Courses and Scientific Conferences: Functional Genomics and Systems Biology. Cambridge, London – UK. **2011**. p. P62

VILELLA-ARIAS, Santiago A.; FACHEL, Ângela A.; Valenzuela-Rodriguez, C.N.; ROCHA, Rafael M.; SOARES, Fernando A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, Sergio; REIS, Eduardo M. R. *Initial characterization of two intronic non-coding RNAs as molecular marker candidates in renal cell carcinoma* – 14º Congresso Latinoamericano de Genética (ALAG) y 39º Congreso Argentino de Genética. Viña del Mar – CHILE. **2010**

Valenzuela-Rodriguez, C.N.; FACHEL, Ângela A.; **VILELLA-ARIAS, Santiago A.**; REIS, Eduardo M. R.; VERJOVSKI-ALMEIDA, Sergio. *Intronic Noncoding RNA expression in Renal Cell Carcinoma by Quantitative RT-PCR* – 28º Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Águas de Lindóia, São Paulo – BRASIL. **2009**

VILELLA-ARIAS, Santiago A.; FACHEL, Ângela A.; Valenzuela-Rodriguez, C.N.; ROCHA, Rafael M.; SOARES, Fernando A.; VERJOVSKI-ALMEIDA, Sergio; REIS, Eduardo M. R. *Characterization of molecular markers of malignancy in Renal Cell Carcinoma* – 55º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo – BRASIL. **2009**. p. 44-44.

ECCO, Gabriela; TAVARES, C.; **VILELLA ARIAS, S.**; VERNAL, J.; KRIEGER, M.; GOLDENBERG, S.; TERENCE, H. *Expressão, purificação e caracterização inicial de uma quinureninase de trypanosoma cruzi* – 53º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo – BRASIL. **2007**. p. 23-23.

ANEXO III

VILELLA-ARIAS, S. A.; ROCHA, R. M.; COSTA, W. H.; ZEQUI, S. C.; GUIMARÃES, Gustavo S.; VERJOVSKI-ALMEIDA, S.; SOARES, F. A.; Reis EM . *Loss of Caspase 7 expression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma clear cell subtype*. Urology (Ridgewood, N.J.), **2013**. 82(4): p. 974.e1-974.e7.