ELIESER HITOSHI WATANABE

Caracterização clínico-radiológica e tratamento de angiomiolipomas múltiplos e/ou grandes com inibidor de mTOR: efeitos sobre os componentes vascular, adiposo e muscular e avaliação de risco associado a nefrectomia e sangramento tumoral

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando
Onuchic

São Paulo

2020

ELIESER HITOSHI WATANABE

Caracterização clínico-radiológica e tratamento de angiomiolipomas múltiplos e/ou grandes com inibidor de mTOR: efeitos sobre os componentes vascular, adiposo e muscular e avaliação de risco associado a nefrectomia e sangramento tumoral

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando
Onuchic

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Watanabe, Elieser Hitoshi
Caracterização clínico-radiológica e tratamento de
angiomiolipomas múltiplos e/ou grandes com inibidor
de mTOR : efeitos sobre os componentes vascular,
adiposo e muscular e avaliação de risco associado a
nefrectomia e sangramento tumoral / Elieser Hitoshi
Watanabe. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.Angiomiolipoma 2.Esclerose
tuberosa 3.Insuficiência renal crônica 4.Hipertensão
5.Linfangioleiomiomatose 6.Nefrectomia 7.Sirolimo

USP/FM/DBD-048/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, Hitoshi e Alinda, meus exemplos de integridade e fé.

À minha esposa Angela, meu porto seguro inabalável de apoio, amor e companheirismo.

À minha filha, Maria Luísa, raio de luz que despontou durante esse período árduo de trabalho e fez brotar um renovado sentido a minha vida.

Agradecimentos

Aos pacientes que entraram nesse estudo, que confiam suas vidas e pacientemente aguardam que o desenvolvimento científico se traduza em algum conforto as suas agruras.

Ao professor Luiz Fernando Onuchic, pelo exemplo de integridade, dedicação, entusiasmo e visão científica, além de resgatar em mim a paixão pelo conhecimento e a descoberta.

À Fernanda Franzin, por sua participação fundamental na construção dessa tese, e pela amizade, companhia e paciência.

Ao Fernando Yamauchi, por todos seus valiosos conselhos na elaboração e execução das análises radiológicas.

Ao Fernando Morbeck, por todo esforço e dedicação na execução das medidas radiológicas.

Ao Hilton Leão Filho, pelo apoio inicial na coleta de e medidas nos exames de imagem dos pacientes.

Ao Isac, pelo apoio e ensinamentos na parte estatística.

À Jessica pelo apoio inestimável na interminável coleta de dados que embasam este trabalho.

À Vivian, por sua ajuda na revisão da minha qualificação durante o período da internação da minha esposa.

Aos colegas médicos, meus amigos, Bruno, Carlos, Fernando, Jukelson, Valkercyo e Lucas, que batalham comigo nos atendimentos aos pacientes em nossa Unidade de Nefropatias Hereditárias.

À minha irmã, Andreia Watanabe, pelo apoio e por manter nossas discussões clínicas afiadas em tantos casos enigmáticos.

Ao Precil, companheiro e amigo dos últimos anos em quase todos os projetos clínicos em nosso laboratório.

Aos amigos e funcionários do LIM29, Andressa, Eliene, Leandro, Livia, Mirtes, Marciana, Stefanie e Vitória.

À minha sogra, Amélia, por se dedicar ao cuidado da nossa família nesses últimos anos desafiadores.

À Dra. Maria Eliza, sem o apoio da qual eu não poderia me dedicar a produção científica.

Ao Fernando Soares, por toda a amizade e disposição para ajudar quando foi preciso.

Á Fátima Libânio, por toda sua presteza e eficiência nas coletas de dados do prontuário eletrônico.

À todos os residentes, pela dedicação no atendimento aos pacientes em nosso ambulatório e enfermaria.

À toda equipe multidisciplinar e funcionários da Nefrologia do HC-FMUSP.

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Angiomiolipomas Renais: Epidemiologia e Patologia	1
1.2. Complexo Esclerose Tuberosa: Manifestações Clínicas	3
1.3. Patogênese Molecular do CET e dos Angiomiolipomas	6
1.4. Angiomiolipomas Renais: Manifestações Clínicas	9
1.5. Tratamento Invasivo de Angiomiolipomas Renais e suas Complicações Potenciais	10
1.6. Tratamento Clínico de Angiomiolipomas Renais	12
1.7. Efeitos da Inibição de mTOR sobre os Componentes dos Angiomiolipomas e Avaliação de Risco Associado a Nefrectomia e Sangramento Tumoral: Hipóteses e Justificativas	12
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo Central	17
2.2. Objetivos Específicos	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Projeto Multidisciplinar de Caracterização dos Pacientes com AMLs, CET e LAM	18
3.2. Aspectos Éticos e Legais	18
3.3. Casuística e Levantamento dos Prontuários de Pacientes com AMLs	19
3.4. Grupos de Pacientes Estudados	22
3.5. Eventos Adversos	22
3.6. Análise Radiológica	22
3.6.1. Desfecho Primário	23
3.6.2. Desfechos secundários	23
3.7. Análise Estatística	24
4. RESULTADOS	26

4.1. Casuística e Recrutamento dos Pacientes a Partir do Projeto Multidisciplinar de AMLs, CET e LAM	26
4.2. Casuística da Unidade de Nefropatias Hereditárias do HCFMUSP	26
4.3. Dados Demográficos e Comorbidades	27
4.4. AMLs: Características Clínicas e Radiológicas Integradas	33
4.5. CET se Associa a Índice Elevado de Neoplasias Malignas	35
4.6. Nefrectomia Prévia Relaciona-se com Menor TFG Estimada	36
4.7. Nefrectomia Parcial se Associa a Hipertensão Arterial Sistêmica	41
4.7. Sirolimo no Tratamento de AMLs	44
4.8. Efeito do Sirolimo em Pacientes com CET Submetidos à Nefrectomia Parcial com Preservação de Massa Renal	48
4.9. Sirolimo como Terapia Neoadjuvante em Nefrectomia Parcial com Preservação de Massa Renal para Angiomiolipomas se Associa a Menor Frequência de Perda Aguda de TFGe	49
4.10. Análise da Resposta dos Diferentes Compartimentos dos AMLs ao Tratamento com Sirolimo	52
4.10.1. Características dos pacientes e dos angiomiolipomas analisados	52
4.10.2. A eficácia do sirolimo em reduzir o volume do tumor é maior em AMLs com pouca gordura	53
4.10.3. Baixo Componente Gorduroso no Tumor Constitui Preditor Independente de Resposta ao Sirolimo	55
4.10.4. Sirolimo Induz Redução Maciça das Estruturas Vasculares de AMLs, enquanto sua Ação é Essencialmente Não Eficaz sobre o Compartimento Rico em Gordura	56
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	70
6.1. Conclusões fundamentais	70
6.2 Conclusões adicionais	70

8. REFERÊNCIAS	72
ANEXO I	81
ANEXO II	82
ANEXO III	91

RESUMO

Watanabe EH. *Caracterização clínico-radiológica e tratamento de angiomiolipomas múltiplos e/ou grandes com inibidor de mTOR: efeitos sobre os componentes vascular, adiposo e muscular e avaliação de risco associado a nefrectomia e sangramento tumoral*

Angiomiolipomas renais (AMLs) são tumores complexos com componentes vascular, gorduroso e muscular. Apresentam prevalência relativamente elevada na população geral, ocorrendo geralmente na forma esporádica. Em cerca de 10% dos casos, entretanto, AMLs associam-se com o complexo esclerose tuberosa (CET). Nesta doença, tais tumores acometem a maior parte dos pacientes e são geralmente múltiplos, bilaterais e precoces. AMLs podem ainda se associar com linfangioleiomiomatose pulmonar esporádica (LAM) e, raramente, se manifestar como lesões múltiplas isoladas. Sua principal complicação é hemorragia, de caráter potencialmente grave. Por essa razão, intervenções invasivas eram até recentemente indicadas para AMLs com alto risco de sangramento. Esses procedimentos, entretanto, associam-se a risco de perda significativa de massa renal funcional. Inibidores de mTOR, por sua vez, apresentam um importante efeito redutor de volume sobre AMLs. Seus efeitos específicos sobre os diferentes componentes tumorais, entretanto, não são conhecidos. Nesse cenário, investigamos os efeitos do sirolimo sobre os diferentes compartimentos do AML, e especificamente sobre as formações aneurismáticas/ectásicas intratumorais. Também analisamos seu papel potencial como terapia neoadjuvante em pacientes com AMLs submetidos a nefrectomia com preservação de massa renal. Analisamos 147 pacientes com AMLs associados a CET, LAM e múltiplos isolados. Observamos índices elevados de hipertensão arterial, albuminúria e malignidade para a idade avaliada na população estudada. Também detectamos associação entre a realização de nefrectomia e menor taxa de filtração glomerular estimada. Nefrectomia total constituiu preditor independente para doença renal crônica estágio 3 ou acima, enquanto nefrectomia parcial foi identificada como preditor independente para ocorrência de hipertensão arterial. Tratamento com sirolimo reduziu o tamanho dos AMLs, efeito que não diferiu entre pacientes com CET, LAM ou AMLs múltiplos isolados. Pacientes pré-tratados com sirolimo e submetidos a nefrectomia apresentaram elevações menores de creatinina sérica que pacientes nefrectomizados não pré-tratados, 48h e 7 meses após o procedimento cirúrgico. Não foram observados eventos adversos graves relacionados a este pré-tratamento. A análise de 23 tumores de pacientes com CET tratados com sirolimo mostrou redução do volume tumoral, um efeito primariamente determinado pela diminuição dos compartimentos com baixo teor de gordura. De fato, baixo teor de gordura mostrou-se um preditor independente de redução de pelo menos 50% do volume de AMLs em resposta a sirolimo. Interessantemente, o volume do compartimento rico em gordura aumentou em resposta ao sirolimo. Nesse cenário, alguns AMLs pobres em gordura evoluíram com lipossustituição. Observamos também uma diminuição marcante dos compartimentos altamente vascularizados. Em sintonia com esse achado, detectamos redução maciça de formações aneurismáticas/ectásicas intratumorais em resposta ao inibidor de mTOR. Nosso estudo sugere, portanto, que sirolimo exerça uma ação renoprotetora seguindo-se a nefrectomia em pacientes com CET. Nossos achados sugerem, também, que inibidores de mTOR reduzam o risco de sangramento em AMLs, dada sua indução de redução marcante de vascularização e de vasos aneurismáticos/ectásicos intratumorais.

Descritores: Angiomiolipoma; Esclerose tuberosa; Insuficiência renal crônica; Hipertensão; Linfangioleiomiomatose; Nefrectomia; Sirolimo.

SUMMARY

Watanabe EH. *Clinical-radiological characterization and treatment of multiple and/or large angiomyolipomas with mTOR inhibitor: effects on the vascular, adipose and muscular components and risk assessment associated with nephrectomy and tumor bleeding*

Renal angiomyolipomas (AMLs) are complex tumors with vascular, fatty and muscular components. Their prevalence is relatively high in the general population, usually occurring in the sporadic form. In about 10% of cases, however, AMLs are associated with the tuberous sclerosis complex (TSC). In this disease, such tumors affect most patients and are usually multiple, bilateral and early onset. AMLs may also be associated with sporadic pulmonary lymphangioleiomyomatosis (LAM) and, rarely, manifest as multiple isolated lesions. Its main complication is hemorrhage, a potentially serious event. For this reason, invasive interventions were until recently indicated for AMLs with a high risk of bleeding. These procedures, however, are associated with a risk of significant loss of functional renal mass. mTOR inhibitors, in turn, have shown to exert an important volume-reducing effect on AMLs. Its specific effects on the different tumor components, however, are not known. In this scenario, we investigated the effects of sirolimus on the different compartments of the AML, and specifically on intratumoral aneurysmatic/ectatic formations. We also analyzed its potential role as neoadjuvant therapy in patients with AMLs undergoing nephrectomy with preservation of renal mass. We analyzed 147 patients with AMLs associated with TSC, LAM and multiple isolated lesions. We observed high rates of hypertension, albuminuria and malignancy for the assessed age in the analyzed population. We also detected association between nephrectomy and a lower estimated glomerular filtration rate. Total nephrectomy was an independent predictor for chronic kidney disease stages 3 or above, while partial nephrectomy was identified as an independent predictor for the occurrence of hypertension. Treatment with sirolimus reduced the size of AMLs, an effect that did not differ among patients with TSC, LAM and multiple isolated AMLs. Patients pretreated with sirolimus and undergoing nephrectomy had lower serum creatinine elevations than untreated nephrectomized patients, 48 hours and 7 months after the surgical procedure. There were no serious adverse events related to this pretreatment. Analyses of 23 tumors from TSC patients treated with sirolimus showed reduction in tumor volume, an effect primarily determined by decrease of compartments with low fat content. Low fat content, in fact, was shown to be an independent predictor of an at-least-50% reduction in AML volume in response to sirolimus. Interestingly, the fat-rich compartment volume not only did not decrease but increased in response to sirolimus. In this scenario, some low-fat AMLs evolved with liposubstitution. We also observed a marked decrease in highly vascularized compartments. In line with this finding, we detected a massive reduction of intratumor aneurysmal/ectatic formations in response to the mTOR inhibitor. Our study suggests, therefore, that sirolimus exerts a renoprotective action following nephrectomy in patients with TSC. Our findings also suggest that mTOR inhibitors reduce the bleeding risk in AMLs, given their induction of marked reduction in vascularization and intratumoral aneurysmatic/ectatic vessels.

Descriptors: Angiomyolipoma; Tuberous sclerosis; Renal insufficiency, chronic; Hypertension; Lymphangioleiomyomatosis; Nephrectomy; Sirolimus.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Angiomiolipomas Renais: Epidemiologia e Patologia

Angiomiolipomas renais (AMLs) constituem tumores benignos formados por músculo liso, vasos dismórficos e tecido adiposo (1, 2). Estas neoplasias apresentam prevalência relativamente alta na população geral, ocorrendo majoritariamente na forma esporádica e tipicamente na quinta década de vida (3). Estudos imagenológicos prévios referem acometimento de 0,22% da população feminina contra 0,1% da população masculina (4), entretanto estudos maiores e mais recentes sugerem prevalências ainda mais elevadas. De fato, uma análise retrospectiva ultrassonográfica em 61.389 casos revelou a presença de AMLs em 0,44% dos indivíduos (5). Na mesma linha, um estudo retrospectivo por tomografia computadorizada (TC) em doadores potenciais renais encontrou tais lesões em 2,2% dos 1948 casos pesquisados (6). Estudos realizados em indivíduos submetidos a necrópsia, por sua vez, reportaram prevalência de AMLs de até 2.1% (7). AMLs esporádicos apresentam predomínio no sexo feminino, ocorrendo em até 92% dos casos (8). É importante atentar, contudo, que se estima que em cerca de 10% dos casos o desenvolvimento de AMLs se associe ao complexo esclerose tuberosa (CET), condição em que sua apresentação é mais precoce (9). A depender da faixa etária, a prevalência desses tumores pode chegar a até 80% em pacientes com CET submetidos a exames de imagem (10). Vale notar, também, que em alguns casos AMLs se associam a linfangioleiomiomatose (LAM) esporádica (11).

Embora os AMLs tenham sido inicialmente classificados como hamartomas, suas características morfológicas e imunoistoquímicas similares às de tumores originados do epitélio perivascular (PEComa) levou-os a serem posteriormente integrados a este grupo de neoplasias (12). Os AMLs são subdivididos histologicamente em “clássico”, quando os componentes vascular, adiposo e muscular estão sempre presentes, ainda que em proporções extremamente variadas; e “epitelióides”, quando apresenta uma composição elevada de células epitelióides. O segundo subtipo é relativamente raro e guarda maior similaridade com formas morfolologicamente alternativas de PEComas

(13). Esta variante é aparentemente mais comum em pacientes com CET (1) e pode exibir atipia celular, células multinucleadas e mesmo achados mais comuns em tumores malignos, tais como figuras de mitose e necrose focal (13). De maneira geral, AMLs raramente invadem o tecido adjacente, como veia cava (14), linfonodos regionais e gordura peri-renal (15), ou infiltram o tecido renal saudável (Figura 1). Mesmo nesses casos, entretanto, geralmente mantêm características benignas (13). Embora raro, também se pode observar comportamento maligno, uma realidade reportada com frequência progressivamente maior. AMLs epitelióides são responsáveis por quase todos esses casos, que incluem metástases para o pulmão e estruturas e órgãos intra-abdominais (16). Angiomiolipomas com cistos epiteliais, por sua vez, constituem uma terceira classificação histológica de AML. Essa classe tumoral é raramente encontrada e apresenta comportamento benigno e geralmente indolente (17). Por se caracterizar pela presença de áreas tumorais sólidas e císticas e se associar a baixo conteúdo gorduroso, esse tipo de AML pode apresentar difícil distinção de carcinoma cístico de células renais (18). Uma vez que o diagnóstico imagenológico de AML se fundamenta na identificação de gordura macroscópica intratumoral, AMLs epitelioides, geralmente com baixa composição adiposa, e AMLs clássicos pobres em gordura também constituem entidades de difícil diagnóstico diferencial em relação a carcinomas de células renais (19, 20).

Figura 1. Tomografia computadorizada de abdome após infusão de contraste iodado em paciente com CET. Não é possível identificar parênquima renal saudável em meio a inúmeros angiomiolipomas de limites mal definidos, infiltrando o tecido renal (setas grossas). Os tumores mostram-se altamente vascularizados, com a presença de vasos intra-tumorais ectásicos (setas finas).

1.2. Complexo Esclerose Tuberosa: Manifestações Clínicas

O CET constitui-se em uma doença autossômica dominante de incidência e prevalência estimadas de 1:5.800-10.000 nascidos vivos e 8,8:100.000 (21-23). Essa enfermidade caracteriza-se pelo desenvolvimento de neoplasias em múltiplos órgãos, principalmente sistema nervoso central, pele, olhos, coração, pulmões e rins (24). Interessantemente, aproximadamente 66% dos casos apresentam história familiar negativa para CET, inferindo alta taxa de mutações *de novo* (21). Apesar de pacientes com CET apresentarem composições fenotípicas altamente variáveis, a penetrância dessa enfermidade é virtualmente completa (25). Cerca de 85% dos indivíduos com tal enfermidade apresentam história de convulsões e podem cursar com epilepsia de apresentação precoce e por vezes de difícil controle (26). Aproximadamente a metade dos casos exibe déficit cognitivo e a terça parte dos pacientes evolui com autismo ou transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (26). Essas manifestações clínicas são a tradução das alterações de SNC associadas a CET, que incluem displasias corticais, compreendendo heterotopia da substância

branca, bem como de hamartomas neurogliais encontrados na grande maioria dos casos. Nódulos subependimários estão presentes em até 95% dos pacientes (27). Astrocitomas subependimários de células gigantes ocorrem em 5-20% dos casos e apresentam características semelhantes aos nódulos subependimários aos exames de imagem. Esses astrocitomas, no entanto, são maiores e podem apresentar crescimento acelerado (28). Tais formações podem potencialmente causar fenômenos compressivos intracranianos graves (23). É importante destacar que o acometimento neurológico é responsável por grande parte da morbidade e da mortalidade associada ao CET, especialmente na infância.

Manifestações cutâneas constituem as alterações mais frequentes relacionadas à doença, podendo ser observadas em até 96% dos pacientes (29). Máculas hipocrômicas, angiofibromas de face, placas fibrosas em fronte e fibromas periungueais são as manifestações mais comumente presentes. Rabdomiomas cardíacos foram observados em até 61% dos pacientes nos quatro primeiros anos de vida. Esses tumores constituem a principal manifestação associada ao diagnóstico pré-natal do CET (30), e podem se associar a defeitos de condução cardíaca e obstruções de via de saída. Raramente causam morbidade, contudo, e geralmente apresentam involução durante a vida.

LAM também ocorre associada ao CET e apresenta amplo predomínio no sexo feminino (31, 32). Apesar disso, casos de acometimento masculino são muito mais frequentes no CET que na forma esporádica, na qual praticamente inexistem. Até 80% das mulheres com CET com mais de 40 anos apresentam achados tomográficos consistentes com LAM pulmonar, uma importante causa de morbidade e mortalidade (31). De fato, não é infrequente a ocorrência de quadros graves, havendo a necessidade de transplante pulmonar em alguns casos.

Alterações oculares e de mucosa oral, dentes e esqueleto também estão presentes no CET, ilustrando sua grande amplitude de acometimento sistêmico (24, 33). Esse espectro de manifestações clínicas fez com que o diagnóstico da doença fundamente-se em critérios clínico-radiológicos, bastante satisfatórios na grande maioria dos pacientes. Tais critérios foram definidos em com base em consenso internacional.

Em sua última atualização, critérios moleculares foram também incluídos para o estabelecimento diagnóstico definitivo de CET (34) (Tabela 1).

Tabela 1. Critérios para diagnósticos de complexo esclerose tuberosa segundo o consenso internacional.

Critérios clínicos para o diagnóstico de Complexo Esclerose Tuberosa (CET)
Critérios maiores
Máculas Hipomelanóticas (≥ 3 , diâmetro ≥ 5 mm) Angiofibromas (≥ 3) ou placa fibrótica em fronte Fibromas ungueais (≥ 2) <i>Shagreen patch</i> (nevo de tecido conjuntivo) Múltiplos hamartomas retinianos Displasias corticais (inclui neurogliomas e linhas de migração radiais em substância branca cerebral) Nódulos subependimários Astrocitoma subependimário de células gigantes Rabdomioma cardíaco Linfangioleiomiomatose (LAM) * Angiomolipomas (≥ 2)
Critérios menores
Lesões de pele em "confetes" (máculas hipomelanóticas de 1 a 2 mm) Falhas no esmalte dental (> 3) Fibromas intraorais (≥ 2) <i>Patch</i> acrômico retiniano Múltiplos cistos renais Hamartomas não renais
Diagnóstico definitivo de CET: Dois critérios maiores ou um maior e dois ou mais critérios menores Diagnóstico possível de CET Um critério maior ou dois ou mais critérios menores
* A combinação de LAM e AMLs renais não é suficiente para o estabelecimento de CET na ausência de outros critérios clínicos

Tabela adaptada de publicação do *International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group* (34).

AMLs: angiomolipomas, CET: complexo esclerose tuberosa, LAM: linfangioleiomiomatose.

1.3. Patogênese Molecular do CET e dos Angiomiolipomas

CET decorre de mutação em um de dois genes: *TSC1* (*tuberous sclerosis complex 1*), mapeado em 9q34 e responsável por cerca de 15% dos casos, ou *TSC2* (*tuberous sclerosis complex 2*), localizado na região cromossômica 16p13.3 e mutado nos demais pacientes (23). AMLs associados a CET apresentam patogênese molecular similar à das lesões esporádicas. Entretanto, enquanto os primeiros apresentam mutações germinativas nos genes mencionados, tumores não associados a CET exibem apenas mutações somáticas (35). Interessantemente, *TSC2* e *PKD1* (*polycystic kidney disease 1*), gene mutado na maioria dos casos de doença renal policística autossômica dominante (DRPAD), localizam-se no cromossomo 16 com posicionamento adjacente cauda-a-cauda. Deleções abrangendo os dois genes acarretam uma síndrome de contiguidade, traduzida em manifestações das duas doenças (Figura 2). Do ponto de vista renal, esses indivíduos, apresentam rins policísticos associados a angiomiolipomas, geralmente múltiplos e geralmente evoluem com perda de função renal acelerada (36).

Figura 2. Paciente com possível síndrome de contiguidade *TSC2/PKD1* (deleção envolvendo ambos os genes). Aquisição por ressonância nuclear magnética em T2 demonstrando rins altamente císticos e aumentados.-A paciente também apresenta angiomiolipomas não visualizados nesta imagem.

TSC1 e *TSC2* codificam hamartina e tuberina, respectivamente, constituintes de um complexo proteico com ação inibitória sobre RHEB (*Ras homolog enriched in brain*)

(37). Esse efeito é determinado por uma atividade GTPase da tuberina. RHEB, por sua vez, promove a ativação de mTOR (*mamalian Target of Rapamycin*) quando ligada a GTP (38). Vale ressaltar que mTOR constitui-se em elemento central de uma via pró-proliferativa e pró-hipertrofia celular expressa de forma ubíqua em praticamente todas as linhagens celulares (Figura 3).

Figura 3. Sinalização envolvendo as proteínas do complexo esclerose tuberosa e mTOR. O complexo hamartina-tuberina favorece a ligação de GDP a RHEB, diminuindo a ativação de mTOR e reduzindo seus efeitos pró-hipertrofia, proliferação e angiogênese. eIF4: *eukariotic initiation factor 4E*, GDP: *guanina di-phosphate*, GTP: *guanina tri-phosphate*, HIF1α: *hypoxia induced factor 1α*, mTOR: *mamalian target of Rapamycin*, RHEB: *RAS homologue enriched in brain*, S6K: *ribosomal S6 kinase*, TSC1: *tuberous sclerosis complex 1 protein* (hamartina), TSC2: *tuberous sclerosis complex 2 protein* (tuberina), VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

A ausência ou insuficiência do complexo hamartina-tuberina resulta, portanto, em hiperativação de mTOR, gerando um estado celular pró-proliferativo e favorecendo a formação e crescimento tumoral em vários órgãos. Tal condição associa-se, além disso, à gênese de outras entidades clínicas como a LAM (33).

A observação de perda de heterozigose (*loss of heterozygosity* - LOH) em AMLs ampara o conceito de que o mecanismo de formação de tais tumores segue um modelo knudsoniano de dois eventos (35). O primeiro evento representa a mutação germinativa (no CET) ou somática (na forma esporádica), anteriormente descritas, enquanto o segundo evento consiste em uma mutação somática no alelo previamente

normal, presente em ambos os casos. Nesse cenário, a formação tumoral requer a perda ou intensa redução da atividade de ambos os alelos do *locus* envolvido, em uma mesma célula (39, 40). As diferentes composições de mutações justificam, por sua vez, a presença de lesões múltiplas, bilaterais e precoces no CET, assim como sua ocorrência isolada e mais tardia na maioria dos casos esporádicos. Explicam, ainda, a frequência consideravelmente maior dessas lesões no CET que na população geral, bem como o aumento da incidência desses tumores com a idade. Interessantemente, esse modelo de dois eventos se aplica quase exclusivamente a *TSC2* em casos esporádicos de AMLs e LAM (41).

Apesar das alterações em mTOR serem centrais na gênese molecular dos AMLs, os processos celulares e histológicos ainda não estão esclarecidos. Estudos citogenéticos baseados no perfil de inativação do cromossomo X em mulheres demonstraram a presença de expansão clonal em AMLs (42, 43). O tipo celular primário envolvido, no entanto, permanece controverso. Estudos histológicos realizados com microdissecção encontraram achados discordantes quanto à detecção de perda de heterozigose para *TSC2* e/ou *TSC1* e de clonalidade em adipócitos e vasos sanguíneos (42, 43). Estudos dessa natureza reportaram, ainda, a presença de LOH somente em algumas subclassificações vasculares dos AMLs (44), e propuseram que esses vasos sejam formados por endotélio normal, mas com uma parede de origem tumoral (42). Todos os estudos, contudo, são concordantes quanto à presença de LOH e clonalidade em miócitos tumorais.

Uma maior concentração de células com marcação histológica para tecido linfático é observada em proximidade com os miócitos tumorais (45), uma associação também presente na LAM. Culturas celulares derivadas de AMLs humanos, com ausência de expressão de *TSC2*, seguiram-se da expressão de vários marcadores de endotélio linfático, sugerindo a possibilidade do tumor se originar dessa linhagem celular (46). Outro estudo, por sua vez, relatou a expressão de diversos marcadores pericitários, incluindo receptor β de fator de crescimento derivado de plaquetas, desmina, α -actina de músculo liso, receptor 2 de fator de crescimento de endotélio vascular (*vascular endothelium growth factor receptor 2* - VEGFR2) e receptor 1 de angiotensina II, acompanhada da ausência de marcações vasculares ou adipocitárias (47). Tais achados sugerem que AMLs possam se originar a partir de pericitos.

A expressão de receptores de estrógeno e progesterona foi descrita para grande parte dos AMLs e de biópsias de LAM (29), observação potencialmente consistente com a maior predominância dessas entidades no sexo feminino (48). Esse achado também é concordante com o aparente aumento da incidência desses tumores nas fases de pré-adolescência até adulto jovem (49). Por fim, vários relatos têm descrito aumento no tamanho de AMLs frente a exposição aumentada a estrógeno, como no uso de anticoncepcionais hormonais e gestação (50-52).

1.4. Angiomiolipomas Renais: Manifestações Clínicas

AMLs exibem um amplo espectro de manifestações clínicas. Embora possam cursar assintomáticos, constituindo na maior parte das vezes achados incidentais de exames imagenológicos, também podem evoluir para complicações graves ou mesmo fatais (3, 9, 53, 54). Sintomas associados correlacionam-se principalmente com o tamanho da lesão. De fato, 59% dos pacientes incluídos em uma análise conjunta apresentaram-se sintomáticos com um diâmetro tumoral médio de 8,9 cm nos casos de CET e de 5,4 cm nos casos esporádicos (53). Em contraste, um levantamento mais recente relatou que 75% dos pacientes apresentaram-se assintomáticos ao diagnóstico; neste estudo, contudo, o diâmetro tumoral médio foi de apenas 3,5 cm (8). Os sinais e sintomas de apresentação mais comuns incluem dor abdominal ou em flanco, detecção de massa abdominal palpável e hematúria (55).

Hemorragia renal subcapsular ou perirrenal, incluindo a síndrome de Wunderlich, constitui a complicação grave mais comumente associada a esses tumores (55). Essa entidade acompanha-se de choque hemorrágico em cerca de 20% dos casos, constituindo causa importante de morbi-mortalidade. Em uma série de casos de pacientes com CET, a incidência acumulada dessa complicação com necessidade de hospitalização foi de 35% nos cinco anos de observação (56). Uma revisão mais recente de 336 casos, por sua vez, reportou hemorragia aguda à apresentação inicial em 44% dos casos com CET e 14% dos esporádicos (53). Nessa revisão, 54-95% dos tumores maiores que 4 cm requereram intervenção invasiva, em decorrência de sintomas, hemorragia e suspeita de malignidade. Vale destacar que as causas renais consistem na principal causa de mortalidade em pacientes com CET (57-59).

Os AMLs maiores que 4 cm de diâmetro são mais propensos a apresentar crescimento acelerado (46% *versus* 27%) e estão associados com maior frequência de intervenções terapêuticas invasivas que as lesões menores (53,8% *versus* 7%) (60). Vale notar que episódios de hemorragia são mais frequentes em tumores maiores e em lesões em crescimento (61). O crescimento dos AMLs está associado ao aumento de sua vascularização. Dilatações vasculares e aneurismas são mais comumente encontrados em tumores >4 cm (62). Importaneamente, hemorragia tumoral se associa fortemente a vascularização tumoral (62, 63). Nesse contexto, pacientes com CET e AMLs apresentam alta probabilidade de perda de função renal, necessidade de atendimento de emergência, internação hospitalar e hematúria (58).

Outras manifestações renais relativamente comuns em pacientes com CET incluem dor abdominal, hematúria microscópica e doença renal crônica. Comportamentos expansivos e invasivos, assim como compressivos, são observados mais raramente.

Prevalência crescente de hipertensão arterial sistêmica (HAS) tem sido reportada no contexto da CET, mesmo em pacientes jovens (59, 64). Apesar da fisiologia da HAS na CET ser pouco conhecida, essa condição clínica tem sido associada a maior acometimento renal por angiomiolipomas, acometimento cístico renal coexistente, embolizações renais prévias e malformações vasculares (49, 59, 65-68).

1.5. Tratamento Invasivo de Angiomiolipomas Renais e suas Complicações Potenciais

Dadas as complicações graves potencialmente associadas aos AMLs, intervenção invasiva profilática era indicada para tumores de alto risco de sangramento até recentemente. A ausência de estudos randomizados, no entanto, associada à disponibilidade limitada de dados prospectivos, dificulta a quantificação desse risco (8, 53, 69). Estudos retrospectivos disponíveis, por sua vez, associaram o risco de hemorragia a tumores maiores que 4 cm e, principalmente, a lesões vascularizadas contendo formações aneurismáticas maiores que 0,5 cm (60, 62, 70).

As modalidades de intervenção invasiva habitualmente empregadas são a nefrectomia total, nefrectomia parcial com preservação de massa renal e embolização arterial seletiva (3, 69, 71). Há relatos, também, da utilização de crioablação (72); essa técnica, no entanto, é geralmente empregada em tumores menores e, portanto, com menor potencial de sangramento. Vale ressaltar, entretanto, que todos esses procedimentos envolvem perda de massa renal funcional, ainda que em graus variados, e implicam em riscos potenciais associados à intervenção. A embolização seletiva é menos invasiva e mostrou-se efetiva na redução dos AMLs e no tratamento de sangramentos agudos associados à lesão (73-75). No entanto, até 85% dos pacientes desenvolvem síndrome pós-embolização e cerca de 10% deles evoluem com complicações, como abscessos (5%) e derrame pleural (3%) (53). A nefrectomia parcial com preservação de massa renal, por sua vez, permite a remoção definitiva do tumor e o diagnóstico histológico da lesão, importante em casos suspeitos. Tal procedimento, contudo, carrega maior risco de sangramento e envolve a necessidade de anestesia geral (69). Complicações documentadas incluem fístula urinária, infecção de ferida operatória e fístula arteriovenosa intra-renal (76). Apesar de tais limitações, a nefrectomia parcial constitui a melhor opção para casos suspeitos de neoplasia maligna ou associados a AMLs gigantes.

Apesar da maior parte das séries de casos disponíveis não documentarem piora de função renal acompanhando nefrectomia parcial e embolização arterial, tal avaliação pautou-se na creatinina sérica, um método inadequado para quantificar a reserva renal nas fases iniciais da doença renal crônica. Além disso, um estudo com maior período de seguimento (mediana de 15,8 anos) em pacientes com CET e AMLs revelou desfechos não satisfatórios quanto à função renal e complicações em pacientes submetidos a embolizações, procedimento realizado duas ou mais vezes em quase a metade destes pacientes (59). Essas observações são muito importantes, uma vez que pacientes com CET tendem a precisar de intervenções invasivas ao longo da vida, devido ao desenvolvimento frequente de tumores maiores, numerosos e bilaterais (9, 60).

Diante dessa realidade, o manejo atual dos AMLs visa preservar ao máximo a massa renal funcional (9, 53). Tais medidas incluem vigilância das lesões com baixo risco

de sangramento, evitando sempre que possível a realização de nefrectomia ou embolização seletiva (77).

1.6. Tratamento Clínico de Angiomiolipomas Renais

Com base nos avanços da patogênese molecular dos AMLs e de testes pré-clínicos promissores, diversos estudos de fase 2 e 3 foram realizados com inibidores da via mTOR (imTOR) em pacientes com CET ou LAM esporádica (78-82). Tais estudos demonstraram que o tratamento com sirolimo e everolimo, imTORs potentes, reduziram AMLs renais, atingindo decréscimo médio de até 66%. O estudo clínico fase 3 “*Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangiomyomatosis*” (EXIST-2, 73) incluiu 118 pacientes (79 tratados e 39 controles) e revelou que 55% dos mesmos tiveram redução de pelo menos 50% da soma do volume das massas maiores que 3 cm ao final da 24ª semana de tratamento, enquanto 80% deles tiveram redução de pelo menos 30% dessa soma ao final do mesmo período. O grupo placebo não apresentou redução média das lesões. A extensão desse estudo sugere redução dos índices de sangramento e benefício no longo prazo para os pacientes tratados, não tendo sido observado nenhum episódio de sangramento tumoral durante o período médio de 28,9 meses de exposição a esse fármaco (83). Baseado nesses resultados, o consenso atualizado de CET preconiza o emprego de imTOR para todos os pacientes que apresentem AMLs com 3 cm ou mais de diâmetro associados a essa enfermidade (34).

1.7. Efeitos da Inibição de mTOR sobre os Componentes dos Angiomiolipomas e Avaliação de Risco Associado a Nefrectomia e Sangramento Tumoral: Hipóteses e Justificativas

Aspectos fundamentais da gênese tumoral e multicentricidade dos AMLs ainda permanecem incertos. Enquanto o modelo de dois eventos é bastante plausível para explicar a origem dos AMLs esporádicos isolados, assim como a alta prevalência de tumores múltiplos associados ao CET, o mesmo não é aplicável para os casos esporádicos multicêntricos. Nesses casos, ainda não foi esclarecido se esses tumores

são resultado de mosaicismo em *TSC1* e *TSC2*, levando a um aumento da probabilidade de mutações patogênicas em ambos os alelos de uma mesma célula, ou se os tumores são originados a partir do tumor primário. Esse problema também se apresenta na associação entre LAM esporádica e AMLs descrita em até 60% dos casos com essa manifestação pulmonar (32). De fato, LOH tem sido descrita por vários autores na LAM, em um contexto onde uma mesma mutação - que não a deleção associada à LOH - foi encontrada nos AMLs desses indivíduos, sugerindo uma origem comum. A elucidação do mecanismo subjacente a tais associações permitiria a distinção entre a ocorrência de uma frequência relativamente alta de mosaicismo para esses genes, enquanto o modelo de disseminação à distância destacaria um comportamento potencial de malignidade desses tumores. Vale notar que a confirmação dessa última hipótese apresenta impacto potencial no manejo dessas lesões, tanto no contexto esporádico como de CET.

Um índice aumentado de carcinoma de células renais (CCR), estimado entre 2-4% (84), é observado em pacientes com CET. Essa observação, associada ao fato desses pacientes frequentemente apresentarem AMLs pobres em gordura, torna difícil a distinção entre tais tumores e CCRs. Um estudo sugeriu que o seguimento radiológico das lesões suspeitas, com a realização de biópsia para as massas que apresentarem crescimento acelerado, pode ser seguro; o tempo de seguimento, entretanto, foi curto e o número de biópsias foi baixo (três pacientes, com um CCR confirmado). Atualmente não existem critérios estabelecidos para diferenciar essas entidades em pacientes com CET. Interessantemente, uma análise molecular recente em CCRs bilaterais relacionados a CET utilizando sequenciamento de exoma completo demonstrou LOH para *TSC2* nesses tumores e um baixo índice de detecção de mutações patogênicas em outros genes (85), indicando potencialmente uma via tumorigênica comum a essas duas neoplasias. Nesse cenário, a caracterização imagenológica e a validação ampla de protocolos de vigilância das lesões renais se tornam essenciais ao refinamento do manejo dessas lesões suspeitas.

Apesar dos dados animadores provenientes dos estudos referentes ao uso de imTORs em AMLs, a diminuição da ocorrência de sangramentos nesses tumores ainda não está comprovada. Tais estudos foram desenhados para avaliar desfechos primários baseados em redução tumoral. Além disso, o mecanismo pelo qual essas drogas

diminuiriam tal risco não está claro, uma vez que a redução tumoral por si não implica necessariamente em alteração da probabilidade de hemorragia. Cabe lembrar que a redução do risco desses eventos é o objetivo central do tratamento dos AMLs.

O tratamento com imTOR, por outro lado, não produz resposta duradoura, evoluindo com rápida retomada do tamanho tumoral após a interrupção do medicamento na grande maioria dos casos (78). Desse modo, o tratamento medicamentoso deve ser prolongado. Nesse cenário, um alto índice de efeitos adversos foi reportado na extensão do estudo EXIST-2. Outro aspecto importante consiste na ausência ou baixa resposta de uma parte significativa dos tumores. No período médio de seguimento de 58 semanas, verificou-se que 31% dos tumores não alcançaram redução tumoral de pelo menos 50% de seu volume original. Além disso, para pacientes com AMLs maiores que 8 cm de diâmetro, presentes em cerca de 30% dos pacientes, a resposta de redução de 50% de volume resultaria ainda em tumores residuais volumosos. Nesse cenário, uma maior e melhor compreensão dos efeitos específicos dos imTORs sobre os diferentes componentes do AML é fundamental à análise dos efeitos benéficos potenciais dessas drogas. De fato, não sabemos se tais efeitos estão diretamente ligados à resposta volumétrica ou se independem da mesma, nem se existem outras vias potenciais que possam servir de alvo para tratamentos adicionais de pacientes que não responderam a esses fármacos.

O entendimento da natureza da resposta terapêutica dos AMLs aos imTORs parece essencial, portanto, visto que diferentes linhagens celulares respondem de forma bastante diversa a essas drogas (86). Tais variações incluem diferentes graus de fosforilação de Akt, uma das principais vias intracelulares envolvidas na ativação de mTOR. Hipotetizamos, assim, que esses fármacos pudessem atuar de forma heterogênea sobre os diferentes componentes tumorais, provocando alterações não apenas quantitativas, mas também qualitativas da estrutura dos AMLs. Diante dessa formulação, julgamos bastante provável que o efeito antitumoral dos imTORs pudesse ser mais intenso sobre as estruturas vasculares dos AMLs, uma vez que essas drogas induzem hiporregulação de VEGF (87, 88). Esse fator de crescimento, envolvido na sobrevivência das células endoteliais, define uma via essencial para a angiogênese (89, 90). A observação de que sirolimo determina a supressão de HIF-

1 α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*)(91) e aceleração da senescência do epitélio vascular (92, 93) sugere, por sua vez, que a redução da expressão de VEGF pelos imTORS possa decorrer da inibição prévia de HIF-1 α .

Nossa hipótese de que a ação redutora de volume determinada pelos imTORS predomine no compartimento vascular dos AMLs carrega consigo uma grande relevância clínica potencial, na medida em que o risco de hemorragia se relaciona diretamente com as características desse compartimento tumoral. Nesse cenário, uma diminuição preferencial do componente vascular tumoral poderia ampliar substancialmente o efeito benéfico da droga sobre o risco de sangramento.

Outros aspectos da doença ainda não esclarecidos incluem a perda de função renal não relacionada a procedimentos invasivos e sua associação a uma maior frequência de HAS em portadores de tumores múltiplos. Vale notar que os AMLs podem estar contribuindo para a origem desses fenótipos, dada a possibilidade de compressão dos tecidos renais funcionais adjacentes e consequente obstrução tubular local e ativação do sistema renina-angiotensina renal. Estas hipóteses encontram-se bem estabelecidas para a DRPAD, enfermidade em que os cistos renais são responsáveis por efeito de massa local capaz de determinar perda progressiva de função renal e HAS (94, 95). A redução tumoral em si poderia trazer, portanto, benefícios funcionais adicionais, além de prevenir sangramentos.

Apesar de ser evitada, a intervenção invasiva ainda possui um papel importante em tumores sintomáticos grandes ou altamente suspeitos de malignidade. Nesse contexto, a busca pela máxima preservação de massa renal funcional após a realização de nefrectomia parcial em pacientes com AMLs tem se constituído em uma preocupação histórica da comunidade nefro-urológica (9, 53, 96, 97). Vale notar, ainda, que grandes tumores constituem um fator complicador adicional *per se*, consistindo em preditor independente de pior função renal no pós-operatório tardio desses pacientes. Esse conceito foi estabelecido por estudos prévios retrospectivos, um dos quais incluindo 1169 pacientes submetidos a nefrectomia parcial (98-100). É importante destacar, ainda, que a remoção de grandes massas renais se relaciona a um maior índice de complicações perioperatórias (101).

Diante do exposto, formulamos a hipótese de que a utilização desses fármacos antecedendo a nefrectomia parcial levaria à redução da massa tumoral a ser abordada, conferindo uma condição cirúrgica potencialmente melhor e, consequentemente, uma maior preservação do tecido renal funcional. Especulamos, também, que a redução do tumor também pudesse resultar em uma diminuição das taxas de complicações peri e pós-operatórias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Central

Analisar os efeitos morfológicos quantitativos e qualitativos de inibidores de mTOR sobre angiomiolipomas renais e suas consequências clínicas potenciais.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a casuística de pacientes portadores de AMLs grandes, bilaterais e/ou múltiplos da Unidade de Nefropatias Hereditárias do Hospital das Clínicas da FMUSP, portadores de CET ou não, quanto a características demográficas, função renal, sintomas, complicações e comorbidades.
- b) Caracterizar e quantificar eventos adversos relacionados ao uso de sirolimo na casuística mencionada.
- c) Analisar e quantificar os efeitos do tratamento com sirolimo sobre as características morfológicas dos AMLs de pacientes da casuística descrita por meio de métodos imagenológicos, incluindo seus efeitos diferenciais potenciais sobre os diferentes compartimentos tumorais e suas ações específicas sobre as estruturas vasculares.
- d) Caracterizar qualitativamente e quantitativamente o acometimento renal por AMLs, o procedimento cirúrgico empregado, suas intercorrências e complicações potenciais, bem como a evolução pós-cirúrgica imediata dos pacientes.
- e) Caracterizar o curso pós-operatório tardio dos pacientes, avaliando função renal, evolução imagenológica e complicações.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A primeira etapa deste projeto consistiu em um levantamento retrospectivo de pacientes com AML(s) seguidos na Unidade de Nefropatias Hereditárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP).

3.1. Projeto Multidisciplinar de Caracterização dos Pacientes com AMLs, CET e LAM

Este projeto de doutorado foi conduzido em associação com o projeto institucional “Caracterização dos pacientes com complexo esclerose tuberosa, linfangioleiomiomatose e angiomiolipoma renal acompanhados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”. Tal projeto constitui um estudo de corte transversal amparado pela construção de um banco de dados unificado e pelo acompanhamento multidisciplinar de pacientes com LAM e/ou AMLs múltiplos esporádicos e pacientes com CET. Seu objetivo foi identificar tais pacientes em nossa instituição, prover uma melhor caracterização clínica, laboratorial e imagenológica desses indivíduos e padronizar condutas assistências entre as clínicas envolvidas. Participaram desse registro as Divisões de Nefrologia, Neurologia, Pneumologia, Dermatologia e Urologia.

Para cumprir os objetivos desse projeto, um protocolo com consultas e exames padronizados foi elaborado para cada especialidade. Os formulários eletrônicos foram construídos pela empresa Prontimed (Prontmed, São Paulo, Brasil)) e contou com o patrocínio financeiro da empresa farmacêutica Novartis (Novartis Biociências AS, São Paulo, Brasil). Construímos, além disso, um sistema de encaminhamento mais ágil, capaz de facilitar o fluxo de pacientes dentro de nosso complexo hospitalar.

3.2. Aspectos Éticos e Legais

O projeto multidisciplinar “Caracterização dos pacientes com complexo esclerose tuberosa, linfangioleiomiomatose e angiomiolipoma renal acompanhados no Hospital

das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP sob o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) nº 40476514.7.0000.0068. Dada a característica observacional do estudo, não existem riscos potenciais para os participantes.

O projeto atual “Análise comparativa de modificações histológicas de angiomiolipomas renais após uso de inibidores de mTOR”, por sua vez, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP sob o CAAE nº 44709915.1.0000.0068. Dada a natureza retrospectiva deste estudo, inexistem riscos de danos à saúde dos pacientes envolvidos.

3.3. Casuística e Levantamento dos Prontuários de Pacientes com AMLs

O levantamento dos casos de pacientes com AMLs acompanhados na Unidade de Nefropatias Hereditárias do HC-FMUSP acompanhou-se da coleta dos dados clínicos e laboratoriais registrados no prontuário eletrônico da Divisão de Nefrologia e dos dados radiológicos e laboratoriais disponíveis no sistema HCMED. Também utilizamos os dados coletados para a pesquisa multidisciplinar supracitada, ainda restritos aos do protocolo nefrológico, elaborado por nosso grupo. Os dados relativos aos protocolos das demais divisões ainda não se encontram disponíveis. Os dados e informações incluídos no estudo atual, assim como a estrutura do formulário utilizado, desenvolvidos por este pós-graduando, encontram-se na Figura 4.

Os casos de tumores renais operados no complexo HC-FMUSP de janeiro de 2010 até o presente também foram considerados para incorporação ao projeto atual, selecionando aqueles com diagnóstico clínico e/ou histológico de AML renal. Esta seleção inicial se seguiu da coleta dos dados clínicos, radiológicos e cirúrgicos mencionados na Figura 4, realizada através do levantamento dos prontuários físico e eletrônico dos pacientes.

A taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) foi calculada utilizando a equação Chronic Kidney Disease Epidemiology study (CKD-Epi)

Lista de Avaliação para Esclerose Tuberosa - Nefrologia

Primeira consulta:

Modelo: clicar para selecionar “sim” ou “não” nas perguntas

Selecionar com clique quando em múltipla escolha

Preencher com números quando solicitado (___)

Preencher com texto quando necessário (_____)

1. Angiomiolipomas

Presença de angiomiolipoma?

Associado a CET?

Idade de diagnóstico: ___ anos

Método de detecção:

USG

TC

RNM

Quantidade: ___

Data do último exame de imagem (mês e ano): ___/___ e método

Ultrassonografia (USG)

Tomografia computadorizada (TC)

Ressonância nuclear magnética (RM)

Número de lesões de acordo com tamanho (no maior eixo) das lesões:

<1cm: ___

1 – 3,9 cm: ___

> ou igual a 4 cm: ___

> ou igual a 10 cm: ___

Presença de microaneurisma?

Algum microaneurisma > 0,5 cm?

Quantos: ___

Pobre em gordura?

Intervenção previa?

Qual e quando

Causa da intervenção:

Sangramento

Suspeita de malignidade

Profilaxia de sangramento

Outras (especificar)

Sangramento prévio?

Quantos episódios e quando:

Localização desfavorável para intervenção (ex. no hilo renal) ou com dificuldade técnica (ex. múltiplas lesões/bilaterais)?

Especificar:

Dor abdominal em flanco?

Sintomas compressivos?

Litíase?

ITUs?

Associação com LAM?

1. Doença renal crônica

Creatinina sérica:

() Não realizado ou informação não disponível

Figura 4. Protocolo de atendimento para a pesquisa multidisciplinar em complexo esclerose tuberosa, linfangioleiomiomatose pulmonar e angiomiolipomas do HC-FMUSP.

Clearance de Cr estimado:

() Não realizado ou informação não disponível

Clearance de Cr calculado:

() Não realizado ou informação não disponível

Proteinúria e microalbuminúria:

() Não realizado ou informação não disponível

Urina 1:

() Não realizado ou informação não disponível

Para doentes em estágio 3 em diante:

PTH, vitamina D, Ca, P, gasometria venosa. Hemograma, perfil de ferro

Síndrome de contiguidade?

() Não realizado ou informação não disponível

2. Doença cística

Presença de cistos renais?

Complicação associada aos cistos renais:

Síndrome de contiguidade?

Exames a serem realizados no diagnóstico.

Ur, Cr, Na, K, Cai, P, Mg, gasometria venosa, Hb, Urina I, proteína e creatinina em urina isolada, microalbuminúria.

USG de abdome total ou TC se angiomiolipoma suspeito ou > 3 cm.

Seguimento:

Pelo menos Ur, Cr a cada consulta.

USG a cada 2 anos se angiomiolipoma <3 cm e anual se >3 cm.

TC ou RNM se angiomiolipoma suspeito ou > 4 cm.

(Devido à exposição à radiação, dar preferência para RNM em todos os casos em que TC e RNM são elegíveis)

Indicações Potenciais para uso de imTOR:

Massa com localização desfavorável

Massas múltiplas e bilaterais

Massas com dificuldade de dissecação com potencial preservação de massa renal em nefrectomia parcial após redução da lesão com a medicação.

Pacientes com indicação cirúrgica e sem condições clínicas para tal.

Avaliação para paciente em imTOR

Acrescentar: Proteinúria, Urina 1, Colesterol total e frações, triglicérides, nível sérico de imTOR.

Retornos mensais.

TC ou RNM imediatamente antes e de 4-6 meses após início das medicações. TC ou RNM controle após cirurgia (se realizada).

Efeitos adversos: () aftas orais, () dor abdominal, () edema periférico, (), alterações menstruais, () acne, () proteinúria, () dislipidemia, () infecções: descrever _____

CID-10

- () Hipertensão arterial (I10)
- () Doença renal crônica (N18.8)
- () Angiomiolipoma (D30.0) (neoplasia benigna do rim)
- () Cistos renais (Q61.8)

Figura 4 (continuação). Protocolo de atendimento para a pesquisa multidisciplinar em complexo esclerose tuberosa, linfangioleiomiomatose pulmonar e angiomiolipomas do HC-FMUSP.

3.4. Grupos de Pacientes Estudados

Para atingir os objetivos do estudo descritos, avaliamos três grupos iniciais de pacientes: 1) pacientes com AML(s) e CET; 2) pacientes com AML(s) e LAM; e 3) pacientes com AMLs sem CET ou LAM.

Para as avaliações sequenciais, os pacientes foram agrupados conforme a natureza de cada análise. A constituição de tais grupos encontra-se explicada nas respectivas seções dos resultados.

3.5. Eventos Adversos

Nosso levantamento incluiu pesquisa de ocorrência de efeitos adversos registrados relacionados ao uso de sirolimo, assim como de alterações laboratoriais associadas à sua utilização. Tais alterações compreenderam anormalidades lipêmicas, proteinúria patológica, dor abdominal, aftas orais, edema periférico, alterações menstruais, acne e infecções, incluídas no formulário aplicado aos casos (Figura 4). Realizamos, também, pesquisa e vigilância da ocorrência de hemorragia tumoral durante todo o período de tratamento com sirolimo.

3.6. Análise Radiológica

Reunimos os exames de tomografia computadorizada (TC) abdominal dos pacientes previamente selecionados aos dos pacientes com AMLs acompanhados em nossa Unidade. A análise adequada ao estudo desses exames requereu acesso ao formato digital. Selecionamos o exame mais recente de antes do início do tratamento nos pacientes tratados com sirolimo, desde que realizado nos 12 meses que antecederam o início desta intervenção terapêutica. Empregamos para comparação exames realizados após ao menos quatro meses de tratamento com a droga. Os exames pré e pós-tratamento foram analisados e quantificados por radiologistas especializados em trato urinário.

Nas sequências pré-contraste, os tumores foram classificados em três categorias com base na atenuação média do tumor, expressa em unidades Hounsfield (HU): rico em

gordura (<-30 HU; TRG), conteúdo de gordura intermediário (≥-30 e ≤ 30 HU; TCGI) e pobre em gordura (> 30 HU; TPG). Todos os pacientes foram rastreados para TRG, TCGI e TRG, tendo sido selecionadas, sempre que presente, uma lesão representativa de cada perfil para as análises. A resposta do volume total ao sirolimo foi quantificada para todos os tumores incluídos. Essa avaliação foi seguida pela análise de sequência com contraste, que permitiu a aferição dessa resposta em compartimentos específicos dos AMLs.

A distribuição de pixels associada a cada tumor foi inicialmente plotada de acordo com seu padrão de atenuação, dando origem a um histograma específico (Figura 5). Densidades de pixel abaixo de -30 HU corresponderam a compartimentos ricos em gordura (CRG), densidades ≥-30 e <30 HU associaram-se a compartimentos com conteúdo de gordura intermediário (CCGI), atenuações ≥ 30 e <100 HU indicaram compartimentos pobres em gordura (CPG) e densidades de pixel ≥ 100 HU identificaram compartimentos altamente vascularizados (CAV). Essa abordagem permitiu a quantificação da resposta volumétrica ao sirolimo para cada um dos compartimentos dos AMLs, caracterizando seus efeitos potencialmente diferenciais sobre cada um dos componentes do tumor.

Com o objetivo de avaliar de forma independente o efeito do sirolimo sobre o componente vascular, o maior diâmetro da maior dilatação aneurismática/vaso ectásico intratumoral também foi determinado após a fase contrastada da TC.

3.6.1. Desfecho Primário

- Variações radiológicas qualitativas e quantitativas do tumor, incluindo tamanho e composição.

3.6.2. Desfechos secundários

- Variação da depuração plasmática de creatinina após nefrectomia parcial.

- Taxas de intercorrências cirúrgicas e pós-cirúrgicas tais como sangramento relacionado à cirurgia, conversão para nefrectomia total, perda de função renal e hipertensão arterial sistêmica pós cirurgia.
- Taxa de hemorragias tumorais espontâneas.

3.7. Análise Estatística

Os dados referentes a variáveis contínuas foram testados quanto à normalidade usando os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Comparações de dois grupos de dados paramétricos foram realizados utilizando os testes t de Student pareado e não pareado para medidas repetidas e não repetidas, respectivamente. A adequação do teste foi verificada por meio da análise de diferença de variância (teste de Levene), com o objetivo de avaliar a necessidade da aplicação da correção de Welch. Comparações entre três grupos ou mais envolvendo dados paramétricos foram realizadas com análise de variância (ANOVA). Normalização dos dados não paramétricos foi realizada para realização de ANOVA de múltiplas vias. Regressão logística foi utilizada para análise de preditores em desfechos binários. Penalização de Firth foi usada nessas análises quando verificada separação completa ou quase completa e quando verificada distorção de pico de razão de verossimilhança por número de observações limitadas. Dados paramétricos encontram-se expressos como média e desvio padrão. Comparações entre dois grupos para dados não paramétricos foram realizadas utilizando o teste U de Mann-Whitney para duas amostras independentes ou o teste de Wilcoxon para medidas repetidas. Comparações entre três ou mais grupos de distribuição não paramétrica foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Tais dados são apresentados como mediana e percentis 25 e 75. Múltiplas comparações realizadas para dados contínuos foram realizadas com a aplicação da correção de Bonferroni. O teste de *qui* quadrado de Fisher foi usado para comparação de duas variáveis categóricas incluindo duas categorias cada, enquanto o *qui* quadrado de Pearson foi aplicado para comparações incluindo variável com mais de duas categorias. Nesse último teste, resíduos normalizados e ajustados foram utilizados para a análise de correlações múltiplas e foram corrigidos pelo método de Bonferroni. Dados paramétricos estão expressos como valores

absolutos e porcentagens. As correlações foram calculadas usando o teste de correlação de Pearson para dados paramétricos e o teste de classificação de Spearman para dados não paramétricos. Significância estatística foi considerada para erro $\alpha \leq 0.05$ (assintótico) e erro $\beta < 0.10$. As análises foram realizadas usando os programas SPSS 124.0 (IBM, New York, USA), STATA 16.0 (StataCorp LCC, College Station, USA) e GraphPad Prism 8.0 (Graphpad Software, La Jolla, USA),

4. RESULTADOS

4.1. Casuística e Recrutamento dos Pacientes a Partir do Projeto Multidisciplinar de AMLs, CET e LAM

O projeto “Caracterização dos pacientes com complexo de esclerose tuberosa, linfangioleiomiomatose e angiomiolipoma renais acompanhados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo” incluiu 245 pacientes com CET, LAM ou AMLs múltiplos sem CET ou LAM (MSCL). Entre esses pacientes, 87 (35,5%) apresentam LAM esporádica, 155 (63,3%) CET e três (1,2%) MSCL. Noventa e um pacientes foram encaminhados para nossa unidade com diagnóstico de AMLs, constituindo 37,1% do total, sendo 18 com LAM esporádica (20,7% dos casos de LAM), 67 com CET (43,2% dos casos de CET) e os três com MSCL. As primeiras análises de caracterização da população de pacientes seguida no HC-FMUSP foram iniciadas e o primeiro artigo científico do grupo foi recentemente publicado pela equipe da pneumologia (102) (ANEXO I).

4.2. Casuística da Unidade de Nefropatias Hereditárias do HCFMUSP

Durante os cinco anos deste estudo passamos a seguir um número considerável de pacientes encaminhados de outras especialidades, realidade que elevou a casuística de AMLs acompanhados em nossa unidade de 35 para 158 casos. Este levantamento data de maio de 2019, configurando aumento de 451,4%. Como três desses casos apresentavam AMLs esporádicos únicos não associados a CET ou LAM, os mesmos foram excluídos do estudo ora apresentado (Figura 5). Outros oito pacientes apresentavam CET, porém não associado a AMLs renais, não tendo sido também incluídos no estudo atual. Restaram para a análise final, portanto, 147 pacientes com os três diagnósticos citados anteriormente.

Figura 5. Representação esquemática da inclusão de pacientes para análise. AML: angiomiolipoma, CET: complexo esclerose tuberosa, LAM: linfangioleiomiomatose, MSCL: angiomiolipomas múltiplos sem CET e LAM.

4.3. Dados Demográficos e Comorbidades

Os dados demográficos dos 147 pacientes incluídos neste estudo estão dispostos na Tabela 2. Seu tempo de acompanhamento em nosso serviço foi de 3,6 (2,5-5,3) anos. Observa-se uma população relativamente jovem, com mediana de idade de 35,9 (25,1-51,1) anos. Os pacientes com CET se mostraram mais jovens que os dos grupos LAM e MSCL ($P < 0,001$ para ambos) (Tabela 2 e Figura 6a). Conforme esperado, há um predomínio importante do sexo feminino, compondo 78,2% dos pacientes. Os pacientes com CET (106) responderam por 72,1% do total, seguidos por LAM (29; 19,7%) e MSCL (12; 8,2%).

Tabela 2. Características categóricas demográficas e comorbidades dos pacientes com AMLs associados a CET, LAM ou múltiplos sem CET ou LAM.

	CET n (%) ou mediana (25-75%)	LAM n (%) ou mediana (25-75%)	MSCL n (%) ou mediana (25-75%)	P	Total n (%) ou mediana (25-75%)
Gênero				0,004	
Feminino	76 (71,7)	29 (100)	10 (83,3)		115 (78,2)
Masculino	30 (28,3)	0 (0,0)	2 (16,7)		32 (21,8)
Idade	29,7 (22,6-39,8) ^{a,a}	51,9 (41,1-55,6) ^a	65,1 (47,3-67,0) ^a	<0,001	35,7 (25,1-51,1)
Faixa etária				<0,001	
1 a 20 anos	12 (11,3)	0 (0,0)	0 (0,0)		12 (8,2)
20 a 39	67 (63,2)	5 (17,2)	0 (0,0)		72 (50,0)
40 a 59	23 (21,27)	21 (72,4)	4 (33,3)		48 (32,7)
60 ou mais	4 (3,8)	3 (10,3)	8 (66,7)		15 (10,2)
Raça				0,759	
Afroamericano	2 (1,9)	1 (3,4)	0 (0,0)		3 (2,0)
Caucasiano	94 (89,5)	27 (93,1)	11 (91,7)		132 (89,8)
Mulato	2 (1,9)	1 (3,4)	1 (8,3)		4 (2,7)
Pardo	5 (4,8)	0 (0,0)	0 (0,0)		5 (3,4)
Amarelo	2 (1,9)	0 (0,0)	0 (0,0)		2 (1,4)
Escolaridade				0,001	
Não	21(33,3)	3 (13,0)	1 (20,0)		25 (27,5)
Alfabetizado					
Fundamental	12 (19,0)	0 (0,0)	3 (60,0)		15 (16,5)
Ensino Médio	17 (27,0)	6 (26,1)	0 (0,0)		23 (25,3)
Superior	13 (26,0)	14 (60,9)	1 (20,0)		28 (30,8)
Origem				<0,001	
Cidade de São Paulo	48 (47,1)	10 (35,7)	7 (58,3)		65 (45,8)
Estado de São Paulo	44 (43,1)	5 (17,9)	5 (41,7)		54 (38,0)
Outros Estados	10 (9,8)	13 (46,4)	0 (0,0)		23 (16,2)
Tempo de seguimento (anos)	4,1 (2,8-5,6) ^a	2,8 (1,9-4,1) ^{a,b}	11 (3,1-12,1) ^b	0,002	3,6 (2,5-5,3)
Tabagismo	1 (3,4)	1(10,0)	0 (0,0)	0,696	2 (5,0)
Diabetes	5 (5,3)	3 (13,0)	2 (16,7)	0,222	10 (7,8)
Hipertensão	31 (33,0)	12 (41,4)	7 (63,6)	0,121	50 (34,0)
Hipotireoidismo	12 (13,2)	4 (16,0)	3 (37,5)	0,186	19 (15,4)

CET: complexo esclerose tuberosa; LAM: linfangioleiomiomatose; MSCL: angiomiolipomas múltiplos sem CET e LAM

Figura 6. Representação em *boxplot* da idade (a) e da TFG estimada (b) dos pacientes incluídos em cada grupo. A TFGe foi calculada utilizando a equação *Chronic Kidney Disease Epidemiology study* (CKD-Epi). Empregamos o teste de Kuskal-Wallis para comparar os grupos CET, LAM e MSCL, acompanhado pelo pós-teste de Bonferroni. CET: complexo esclerose tuberosa, LAM: linfangioleiomiomatose, MSCL: angiomiolipomas múltiplos sem CET e LAM.

A elevada prevalência de HAS nessa população chamou atenção, atingindo 37,3% dos pacientes. A média de idade dos pacientes com HAS, entretanto, foi de 44,1 anos (31,4-56,6), significativamente maior que a idade dos pacientes não hipertensos [31,5 anos (22,7-42,3), $P < 0,001$].

Não houve diferença significativa de creatinina plasmática entre os grupos nem entre a TFGe (Figura 6b). Todos os grupos apresentaram função renal relativamente preservada, com mediana de creatinina sérica (Cr) de 0,81 mg/dL (0,70-0,99) e TFGe de $95,5 \pm 32,6$ mL/min.1,73 m². A Cr e TFGe de CET foi de 0,81 mg/dL (0,70-1,00) e 104,1 mL/min.1,73 m² (74,1-124,1), enquanto de LAM foi 0,80 mg/dL (0,69-0,92) e 85,6 mL/min.1,73 m² (76,0-107,3), e MCSL Cr de 0,79 mg/dL (0,70-1,04) e TFGe de 88,1 mL/min.1,73 m² (57,6-101,7) (Tabela 3). Doença renal crônica (DRC) estágios três ou acima foram observados em 15,3% dos pacientes com CET (Tabela 3), enquanto em LAM essa taxa foi de 7,1% e em MSCL de 25,0%, não sendo encontrada diferença estatística entre os grupos ($P = 0,310$).

Tabela 3. Função renal dos pacientes com CET, LAM e MSCL.

	CET n (%) ou mediana (25- 75%) ou média±desvio padrão	LAM n (%) ou mediana (25- 75%) ou média±desvio padrão	MSCL n (%) ou mediana (25- 75%) ou média±desvio padrão	P	TOTAL n (%) ou mediana (25- 75%) ou média±desvio padrão
TFGe (mL/min/1.73m ²)	99,5±35,5	88,4±18,4	79,1±27,9	0,056	95,51±32,6
Creatinina (mg/dL)	0,81 (0,70-1,00)	0,80 (0,69-0,92)	0,79 (0,70-1,04)	0,761	0,81 (0,70-0,99)
Estágio de DRC				0,133	
1	65 (66,3)	13 (46,4)	6 (50,0)	-	84 (60,9)
2	17 (17,3)	13 (46,4)	3 (25,0)	-	33 (23,9)
3A	9 (9,2)	2 (7,1)	2 (16,7)	-	13 (9,4)
3B	4 (4,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	4 (2,9)
4	2 (2,0)	0 (0,0)	1 (8,3)	-	3 (2,2)
5	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	1 (0,7)
DRC estágio 3 ou mais	15 (15,3)	2 (7,1)	3 (25,0)	0,310	20 (14,5)
% Queda de TFGe anual	2,4 (1,0- 3,7)	2,5 (1,5- 7,4)	0,7 (-1,5- 3,0)		0,107
Proteinúria ou relação proteína/creatinina (g/g)	0,18 (0,08-0,48)	0,08 (0,05-0,16)	0,1 (0,02-0,54)	0,179	0,15 (0,07-0,43)
Albuminúria (mg/g)	15,1 (5,2-51,9)	5,7 (2,4-260,0)	12,6 (10,5-)	0,658	12,3 (5,1-54,2)
PCrU > 200 mg/g creatinina ou ACrU >30 mg/g de creatinina	40 (52,6)	3 (20,0)	2 (25,0)	0,033	45 (45,5)
Albumina sérica (g/dL)	4,6 (4,3-4,7)	4,5 (4,3-4,8)	4,6 (4,1-4,7)	0,808	4,6 (4,3-4,7)
Ácido úrico (mg/dL)	4,7±1,3	4,6±1,4	4,6± 1,2	0,987	4,6±1,3
Hiperuricemia	7 (10,6)	3 (20,0)	1 (14,3)	0,604	11 (12,5)
Hematúria	14 (17,5)	3 (20,0)	4 (50)	0,094	21 (20,4)
Piúria	13 (15,9)	2 (12,5)	0 (0,0)	0,461	15 (14,2)
Ureia (mg/dL)	29,0 (23,0-27,0)	31,0 (26,0-39,0)	30,0 (25,0-37,0)	0,862	29,0 (23,8-37,2)

CET: complexo esclerose tuberosa, DRC: doença renal crônica; LAM: linfangioleiomiomatose, MSCL: angiomiolipomas múltiplos sem CET ou LAM, PCrU: relação proteína/creatinina urinária; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada

A taxa de declínio percentual da TFGe foi calculada para os pacientes com seguimento de pelo menos um ano. Uma mediana elevada de perda de função renal foi observada na população [2,8%/ano (1,0-3,8)]. A análise comparativa indicou diferença na taxa de declínio entres os grupos CET, LAM e MSCL (P=0,042). Esta

taxa foi de 2,4%/ano (1,0-3,7), enquanto para LAM foi de 2,5% (1,5-7,4) e 0,01%/ano (-6,3-2,6) para MSCL. A análise pós-teste mostrou diferença entre LAM e MSCL ($P=0,038$) enquanto a comparação entre CET e MSCL atingiu valor de P marginal após a correção de Bonferroni ($P=0,096$). Não houve diferença na comparação de CET e LAM ($P=0,881$). A perda percentual de TFGe se mostrou elevada mesmo em pacientes em estágio 1 e 2 [1,5%/ano (0,2-2,6) e 3,4%/ano (1,3-7,8)] (Tabela 4 e Figura 7). Pacientes em estágio 1 apresentaram queda significativamente mais lenta que pacientes em estágio 2 e 3A e 4 ($P=0,018$; 0,031 e 0,018; respectivamente).

Tabela 4. Queda percentual de TFGe anual de acordo com estágio de DRC

Estágio de DRC	% de queda de TFGe anual
1	1,5 (0,3-2,6)
2	3,4 (1,3-7,8)
3A	3,6 (2,9-4,6)
3B	5,2 (3,1-7,5)
4	11,8 (6,9-)
5	-

DRC: doença renal crônica; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada

Figura 7. Queda percentual de TFGe anual de acordo com estágio de doença renal crônica. DRC: doença renal crônica; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada. * $P < 0,05$

A relação albumina/creatinina urinária (ACrU) ou a relação proteína/creatinina urinária (PCrU) mostrou-se elevada (>30 mg/g e $>0,2$ g/g, respectivamente) em 45,5% dos pacientes com dados disponíveis, não apresentando associação com HAS ($P=0,096$). Tais valores apresentaram, entretanto, correlação com TFG_e <60 mL/min.1,73m² (OR=11,7; $P< 0,001$). HAS, por sua vez, apresentou associação significativa com DRC estágios ≥ 3 (OR=6,0; $P=0,001$).

Os pacientes com CET apresentaram acometimentos sistêmicos consistentes com os achados de estudos prévios, excetuando envolvimento neurológico; neste caso a taxa foi discretamente menor (Tabela 5). Déficit cognitivo foi identificado em apenas 37,5% dos pacientes do grupo CET, enquanto 66,7% dos mesmos completaram ao menos o ensino fundamental. Esses dados refletem as características de nosso serviço, voltado ao atendimento de pacientes adultos.

Tabela 5. Envolvimento sistêmico relacionado ao complexo esclerose tuberosa nos pacientes com esse diagnóstico.

	n	%
História Familiar		
Pais afetados	8	9,0
Filhos afetados	8	9,0
Manifestações de pele	78	86,7
Imagem do SNC alterada	67	77,0
Epilepsia	66	73,3
Déficit Cognitivo	27	37,5
Anticonvulsivantes	34	100,0
LAM	35	39,3
Manifestações oftalmológicas	15	20,3
Rabdomioma	21	24,7
Possível síndrome de contiguidade	5	6,6

LAM: linfangioleiomiomatose; SNC: sistema nervoso central

Levantamos a suspeita diagnóstica de síndrome de contiguidade em 6,6% dos pacientes com CET. No entanto, apesar de exibirem rins altamente císticos, esses pacientes apresentaram função renal relativamente preservada, com TFG_e de 79,7(48,3-126,3) mL/min.1,73m² à idade de 28,4 (15,9-34,4) anos. Apenas 1 paciente evoluiu com necessidade de TRS. A observação de preservação relativa da

função renal na faixa etária observada reduz significativamente a probabilidade da existência da síndrome de contiguidade.

4.4. AMLs: Características Clínicas e Radiológicas Integradas

Conforme esperado, a maioria dos pacientes com CET apresentaram AMLs múltiplos (94,2%) e bilaterais (83%) (Tabela 6). Vale notar que detectamos um alto número de pacientes com LAM esporádica e múltiplos tumores renais (62,1%) e AMLs bilaterais (44,8%).

O diâmetro do maior AML de cada paciente incluído no estudo foi de 3,2 cm (1,8-6,1), valor que não diferiu entre os grupos ($P=0,866$; Figura 8). Os AMLs causaram sintomas em uma parte significativa dos pacientes (25,8%), estando a história de hemorragia tumoral presente em 10,2% dos pacientes.

AMLs ≥ 3 cm foram observados em 64,3% do total de pacientes e em 54,8% daqueles com CET. Vale destacar que este foi o critério utilizado pelo consenso internacional de CET para início de terapia com imTOR nessa doença.

Um grande número de pacientes foi submetido a procedimentos invasivos, totalizando 74 embolizações arteriais seletivas ou nefrectomias parciais em 57 pacientes (38,8% dos pacientes). Não detectamos diferença significativa entre os números de pacientes submetidos a procedimentos invasivos em cada grupo ($P=0,118$).

Cerca de 26,5% dos AMLs foram identificados como pobres em gordura, ocorrendo em percentuais próximos entre os grupos. Uma frequência numericamente maior, porém, não significantemente diferente, contudo, foi observada em pacientes com CET (35,7%) em relação a LAM (15,4%) e MSCL (22,2%). Infiltração tumoral por AMLs identificada radiologicamente ocorreu em seis pacientes (exemplo na Figura 2), incluindo cinco com CET e um com MSCL, em rins com incontáveis tumores.

Tabela 6. Características clínicas e radiológicas relacionadas aos angiomiolipomas associados a cada grupo analisado.

	CET n (%) ou mediana (25-75%)	LAM n (%) ou mediana (25- 75%)	MSCL n (%) ou mediana (25- 75%)	P	TOTAL n (%) ou mediana (25- 75%)
Pacientes	106 (72,1)	29 (19,7)	12 (8,1)	-	147 (100)
Números de AMLs				< 0,001	
1	7 (7,2)	12 (42,9)	0 (0,0)	-	19 (14)
2	5 (5,2)	4 (14,3)	2 (18,2)	-	11 (8,1)
3	2 (2,1)	0 (0,0)	4 (36,4)	-	6 (4,4)
4 ou mais	83 (85,6)	12 (42,9)	5 (45,5)	-	100 (73,5)
AMLs múltiplos	98 (94,2)	18 (62,1)	12 (100,0)	< 0,001	128 (88,3)
AMLs bilaterais	83 (83,0)	13 (44,8)	9 (75,0)	< 0,001	105 (74,5)
Sintomas				0,165	
Dor abdominal	12 (15,2)	7 (28,0)	3 (30,0)	-	22 (19,3)
Sangramentos	5 (6,3)	1 (4,0)	0 (0,0)	-	6 (5,3)
Dor abdominal e sangramento	5 (6,3)	1 (4,0)	3 (30,0)	-	9 (7,9)
Sintomas compressivos	1 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	1 (0,9)
Maior AML pré-tratamento (cm)	3,2 (1,8-6,0)	3,2 (1,8-7,1)	3,8 (1,9-4,9)	0,866	3,2 (1,8-6,1)
Volume do maior AML pré- tratamento (cm ³)	15,6 (2,5-92,1)	17,1 (1,8-113,4)	19,9 (2,5-62,5)	0,921	17,1 (2,5-92,6)
AMLs extrarrenais	26 (29,5)	6 (20,7)	0 (0,0)	0,122	32 (25,4)
AMLs hepáticos	30 (31,6)	6 (20,7)	3 (27,3)	0,523	39 (28,9)
Cistos hepáticos	6 (6,3)	3 (10,3)	1 (9,1)	0,750	10 (7,4)
Hemangiomas hepáticos	2 (2,2)	6 (20,7)	0 (0,0)	0,001	8 (6,1)
Litíase	4 (21,1)	2 (16,7)	1 (25)	0,924	7 (20)
Cistos Renais	48 (53,3)	11 (39,3)	3 (27,3)	0,153	62 (48,1)
AML pobre em gordura	30 (35,7)	4 (15,4)	2 (22,2)	0,123	36 (30,3)
Infiltração renal por AML	5 (7,7)	0 (0,0)	1 (20,0)	0,308	6 (7,1)
Cirurgia prévia	33 (33,3)	14 (50,0)	5 (50,0)	0,243	52 (38,0)
Nefrectomia parcial	20 (20,2)	9 (32,1)	3 (30,0)	-	32 (23,4)
Nefrectomia total	6 (6,1)	5 (17,9)	1 (10,0)	-	12 (8,8)
Mais que uma nefrectomia parcial	4 (4,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	-	4 (2,9)
Nefrectomia parcial e total	3 (3,0)	0 (0,0)	1 (10,0)	-	4 (2,9)
Tempo pós nefrectomia até última creatinina (dias)	2493 (1815-5759)	1609 (407-3584)	4362 (784-6683)	0,456	
Embolização	10 (12,0)	1 (4,3)	2 (28,6)	0,204	13 (11,5)
Cirurgia ou Embolização	36 (40,0)	15 (57,7)	6 (66,7)	0,118	57 (45,6)
Vascularização/Aneurisma	18 (22,0)	3 (15,8)	1 (14,3)	0,766	22 (20,4)
Tratamento imTOR	45 (42,5)	14 (48,3)	3 (25,0)	0,387	62 (42,2)

AML: angiomiolipoma, CET: complexo esclerose tuberosa, LAM: linfangioleiomiomatose, MSCL: angioliolipoma múltiplos sem CET e LAM, imTOR: inibidor da via mTOR.

Cisto renal foi detectado em 48,1% dos pacientes com CET, não tendo se associado com HAS, proteinúria/albuminúria ou TFG_e<60 mL/min.1,73m².

Figura 8. Representação em *boxplot* do maior diâmetro dos angiomiolipomas para os diferentes grupos analisados. Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos. Análise realizada aplicando o teste de Kruskal-Wallis. CET: complexo esclerose tuberosa, LAM: linfangioleiomiomatose, MSCL: angiomiolipomas múltiplos sem CET e LAM.

4.5. CET se Associa a Índice Elevado de Neoplasias Malignas

Um índice elevado de malignidade foi detectado nos pacientes com CET (Tabela 7), atingindo 7,5% dos pacientes a uma idade mediana de 38,7 anos (31,5-56,3). A neoplasia maligna mais frequente foi o CCR, acometendo 3,8% do total de pacientes com CET, seguida de tumores neuroendócrinos do pâncreas (2 casos; 1,9% do grupo CET). Identificamos ainda três casos adicionais (2,8% do grupo CET) com alta suspeita de malignidade em nódulos renais, porém, devido a dificuldades técnicas ou condição clínica desfavorável, não confirmados por exame anatomopatológico. Essas lesões eram acompanhadas de calcificação, necrose central e/ou captação em tomografia por emissão de pósitrons acoplada a TC. Um paciente faleceu durante o seguimento devido a CCR.

Tabela 5. Ocorrência de malignidade em pacientes com complexo esclerose tuberosa.

Neoplasia	n	%
Carcinomas de células renais	4	3,8
Tumor neuroendócrino de pâncreas	2	1,9
Carcinoma de endométrio	1	0,9
Total	7	6,6

Frente aos resultados preliminares e à evolução dos dados científicos demonstrando incidências aumentadas de neoplasia em CET, na parte final desse estudo passamos a indicar biópsia de tumores renais pobres em gordura. Foram realizadas cinco biopsias percutâneas de nódulos renais sem gordura macroscópica em exames de imagem com suspeita de malignidade. O exame anatomopatológico revelou que tais tumores consistiam em três AMLs, um leiomioma renal e um carcinoma de células renais cromóforo. A taxa de neoplasias malignas, portanto, foi de 20% para os tumores biopsiados.

4.6. Nefrectomia Prévia Relaciona-se com Menor TFG Estimada

Os indivíduos previamente submetidos a nefrectomia apresentaram TFGe mais baixa que os pacientes não submetidos a esse procedimento ($77,5 \pm 31,5$ versus $104,8 \pm 27,0$ mL/min.1,73m²; $p < 0,001$; Figura 9a e Tabela 8). Pacientes NF apresentaram, contudo, idade mais avançada [$43,3$ ($32,1-53,6$) versus $31,2$ ($22,8-43,4$)] anos; $P = < 0,001$; Figura 9b e Tabela 8]. Uma prevalência de nefrectomias numericamente maior foi verificada no sexo feminino, porém a diferença não foi significativa em relação ao sexo masculino ($P=0,187$). A taxa percentual de queda da TFGe, também foi maior no grupo de pacientes com nefrectomia prévia comparado a pacientes não nefrectomizados [$1,82\%$ ($0,62-2,92$) versus $2,67$ ($1,3-4,5$); $P=0,032$] (Figura 9c).

Figura 9. TFGe em pacientes submetidos a nefrectomia e pacientes não nefrectomizados (a), idades dos pacientes desses dois grupos (b) e porcentagem de queda anual de TFGe. TFGe: taxa de filtração glomerular estimada

Tabela 8. Comparação das características demográficas, clínicas e radiológicas entre pacientes submetidos e não submetidos à nefrectomia

	Nefrectomia n (%) ou mediana (25-75%)	Sem Nefrectomia n (%) ou mediana (25-75%)	P
Diagnóstico			0,198
CET	33 (63,5)	66 (77,6%)	
LAM	14 (26,9)	14 (16,5)	
AML	5 (9,6)	5 (5,9)	
Idade	43,1 (31,8-52,8)	31,2 (20,1-43,4)	<0,001
Gênero			0,187
Feminino	45 (86,5)	65 (76,5)	
Masculino	7 (13,5)	20 (23,5)	
Sintomas de AML			0,009
Dor abdominal	11(25,0)	11(16,4)	
Sangramentos	7 (15,9)	2 (3,0)	
Dor abdominal e sangramento	4 (9,1)	2 (3,0)	
Sintomas compressivos	1(2,3)	0 (0,0)	
Maior AML pré-tratamento (cm)	5,6 (3,2-8,0)	2,7 (1,4-5,6)	<0,001
AMLs múltiplos	44 (84,6)	76 (90,5)	0,412
AMLs bilaterais	31 (60,8)	69 (83,1)	0,007
Números de AMLs			0,442
1	7 (14,6)	11(13,4)	
2	6 (12,5)	4 (4,9)	
3	2 (4,2)	3 (3,7)	
4 ou mais	33(68,0)	64 (78,0)	
AML pobre em gordura	10 (22,2)	25 (34,7)	0,213
Infiltração renal	2 (6,5)	4 (7,7)	1,000
Malignidade	7 (13,5)	2 (2,4)	0,027
Tratamento imTOR	30 (57,7)	31 (36,5)	0,021
Creatinina (mg/dL)	0,9 (0,7-1,1)	0,7 (0,6-0,8)	<0,001
TFGe (mL/min/1.73 m ²)	76,2 (56,9-101,4)	107,2 (91,8-121,8)	<0,001
DRC estágio 3 ou mais	13 (26,0)	6 (7,5)	0,005
Albuminúria (mg/g)	26,1 (6,0-131,6)	8,62 (3,8-46,9)	0,051
Proteína ou relação proteína/creatinina (g/g)	0,1 (0,09-0,6)	0,1 (0,0-0,4)	0,074
Proteinúria > 200mg/g creatinina ou albuminúria >30mg/g de creatinina	18 (54,5)	25 (41,0)	0,278
Hipertensão	27 (58,7)	21 (25,6)	<0,001
Hiperuricemia	6 (18,2)	4 (7,5)	0,173
Ácido úrico (mg/dL)	5,0 (4,2-5,7)	4,3 (3,4-5,2)	0,021

AML: angiomiolipoma; CET: complexo esclerose tuberosa; DRC: doença renal crônica; LAM: linfangioleiomiomatose; MSCL: angiomiolipomas múltiplos sem CET e LAM; imTOR: inibidor da via mTOR; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada

Para analisar o impacto de nefrectomias na TFG_e da casuística analisada, levando-se em consideração os possíveis fatores de confusão citados acima, utilizamos ANOVA de múltiplas vias. Elegemos variáveis de confusão potenciais, com influência conhecida na TFG_e: faixa etária, gênero, afrodescendência e HAS. Tal análise identificou nefrectomia prévia como único fator significativamente associado a menor TFG_e (P=0,007) (Tabela 9). Vale notar que faixa etária apresentou P marginal de associação com TFG_e (P=0,056).

Tabela 9. Análise multivariável para identificar potenciais fatores influenciadores da TFG_e

	P
Faixa etária	0,111
Gênero (feminino)	0,266
Afroamericano	0,571
Hipertensão	0,016
Tipos de nefrectomias	0,002
Sem nefrectomia vs nefrectomia parcial	<0,001
Sem nefrectomia vs nefrectomia total	<0,001
Nefrectomia parcial vs nefrectomia total	0,047

TFG_e: taxa de filtração glomerular estimada

O mesmo teste, com os mesmos fatores de confusão potenciais, foi empregado para analisar se o tipo de nefrectomia, total ou parcial, apresentava especificidades para associação com TFG_e. Nessa análise, nefrectomias apresentaram novamente associação com menor TFG_e (P=0,002), assim como HAS (P=0,016). A análise pós-teste demonstrou, ainda, que tanto nefrectomia parcial quanto total se associaram com menor TFG_e quando comparados a pacientes não nefrectomizados [$88,9 \pm 27,7$ e $66,2 \pm 35,6$, respectivamente, *versus* $104,8 \pm 27,0$ (P<0,001 para ambos). Essa análise revelou, por fim, associação de nefrectomias parciais com melhor função renal quando comparadas com nefrectomias totais (P=0,047) (Tabela 9)

Cabe ressaltar, no entanto, que tanto pacientes nefrectomizados quanto não nefrectomizados apresentaram média de TFG_e > 60mL/min.1,73m², portanto

relativamente preservada. Por esse motivo conduzimos uma regressão logística para avaliar o desfecho binário de presença de DRC estágio 3 ou maior. Os fatores de confusão avaliados foram faixa etária, gênero, afro-descendência e HAS. A regressão indicou HAS como preditor independente para estágios de DRC ≥ 3 [OR=3,91 (IC: 1,1-14,0); P=0,034]. O conjunto das nefrectomias, por sua vez, alcançou valor estatístico marginal (P=0,089); nefrectomia total, no entanto, também constituiu preditor independente para o desfecho analisado [OR 4,7 (IC: 1,1-19,7); P=0,034] (Tabela 10).

Tabela 10: Regressão logística múltipla para potenciais preditores de DRC estágio 3 ou superior

	Significância	Odds ratio	IC
Faixa etária	0,524	1,3	0,6- 2,9
Gênero (feminino)	0,275	3,4	0,4- 30,4
Afroamericano	0,553	1,7	0,3- 9,0
Hipertensão	0,034	4,0	1,1- 14,0
Tipos de Nefrectomia	0,089	-	-
Parcial	0,753	1,3	0,3- 5,0
Total	0,034	4,7	1,1- 19,8

DRC: doença renal crônica; IC: intervalo de confiança

Com o objetivo de investigar se a mesma associação também se aplicava apenas a pacientes com CET, em uma etapa sequencial realizamos a mesma análise nesse grupo de pacientes. A regressão logística de Firth demonstrou a nefrectomia total como preditor independente de DRC [OR=10,3 (IC:1,5-71,8); P=0,016] (Tabela 11). Nessa população faixa etária e sexo apresentaram valores de P marginais para associação com maior risco de DRC (P=0,059 e 0,088, respectivamente), enquanto HAS não se comportou como preditor significativo (P=0,745).

Tabela 11: Regressão logística de Firth para potenciais preditores de DRC estágio 3 ou superior em pacientes com CET.

	Significância	Odds ratio	IC
Faixa etária	0,059	3,7	1,0-14,3
Gênero (feminino)	0,088	19,6	0,6-598,8
Afroamericano	0,358	2,5	0,4-16,7
Hipertensão	0,746	1,3	0,3-5,4
Tipos de Nefrectomia			
Parcial	0,353	2,2	0,4-12,1
Total	0,016	10,5	1,5-71,8

CET: complexo esclerose tuberosa; DRC: doença renal crônica; IC: intervalo de confiança

4.7. Nefrectomia Parcial se Associa a Hipertensão Arterial Sistêmica

Dada a elevada prevalência de HAS em nossa casuística, analisamos a associação de tal condição com a história de nefrectomia. Observamos uma prevalência aumentada de HAS nos pacientes nefrectomizados em comparação com os não nefrectomizados (58,7% *versus* 25,6%, $P < 0,001$). As características principais dos pacientes hipertensos e não hipertensos encontram-se na Tabela 12.

Para confirmar a associação de nefrectomias e HAS, considerando possíveis variáveis de confusão, realizamos regressão logística multivariável. Tal análise incluiu faixa etária, gênero, afro-descendência e DRC estágios ≥ 3 como variáveis de confusão potenciais. A regressão logística identificou faixa etária e DRC, fatores associados à HAS, como preditores para tal condição [OR=2,6 (IC: 1,4-4,8); $P=0,003$ e OR=3,9 (IC: 1,1-13,8); $P=0,035$, respectivamente] (Tabela 13). Nefrectomia prévia se associou com maior probabilidade de HAS, motivada pela associação de nefrectomias parciais com hipertensão [OR=4,3 (IC: 1,6-11,8); $P=0,004$]. História de nefrectomia total, no entanto, não se associou a tal condição clínica.

Tabela 12: Comparação das características demográficas, clínicas e radiológicas entre pacientes hipertensos e não hipertensos.

	Hipertensos n (%) ou mediana (25-75%) ou média±desvio padrão	Não Hipertensos n (%) ou mediana (25-75%) ou média±desvio padrão	P
Diagnóstico			0,121
CET	31 (62,0)	63 (75,0)	-
LAM	12 (24,0)	17 (20,2)	-
MSCL	7 (14,0)	4 (4,8)	
Idade	44,1 (31,4-56,6)	31,4 (23,7-42,3)	<0,001
Faixa etária			0,004
1 a 20 anos	2 (4,0)	8 (9,5)	-
20 a 39	18 (36,0)	50 (59,5)	-
40 a 59	20 (40,0)	22 (26,2)	-
60 ou mais	10 (20,0)	4 (4,8)	-
Gênero			0,384
Feminino	42 (84,0)	65 (77,4)	-
Masculino	8 (16,0)	19 (22,6)	-
Raça			0,801
Afroamericano	6 (12,0)	6 (7,1)	-
Outros	44 (88,0)	78 (92,9)	-
Diabetes	6 (13,0)	3 (4,1)	0,084
Cistos renais	25 (53,2)	31 (41,3)	0,263
Números de AMLs			0,470
1	6 (12,0)	13 (16,3)	-
2	6 (12,0)	4 (5,0)	-
3	2 (4,2)	3 (3,8)	-
4 ou mais	34 (70,8)	60 (75,0)	-
Maior AML pré-tratamento	3,8 (2,4-6,0)	2,8 (1,5-6,0)	0,705
Infiltração renal	2 (7,1)	4 (7,5)	1,000
Cirurgia prévia			0,005
Nefrectomia parcial	16 (33,3)	11 (13,8)	-
Nefrectomia total	6 (12,5)	6 (7,5)	-
Mais que uma nefrectomia parcial	3 (6,3)	1 (1,3)	-
Nefrectomia parcial e total	2 (4,2)	1 (1,3)	-
Embolização	9 (22,5)	4 (5,7)	0,013
Creatinina (mg/dL)	0,95 (0,76-1,16)	0,79 (0,66-0,92)	0,000
TFGe (mL/min/1.73 m ²)		78,5±18,3 105,6±29,7	0,000
DRC estágio 3 ou mais		13 (28,3) 5 (6,2)	0,001

Tabela 12. Continuação

	Hipertensos n (%) ou mediana (25-75%) ou média±desvio padrão	Não Hipertensos n (%) ou mediana (25-75%) ou média±desvio padrão	P
Albuminúria (mg/g)	25,1 (6,7-137,8)	5,5 (3,0-24,5)	0,004
Proteína ou relação proteína/creatinina (g/g)	0,2 (0,1-1,2)	0,10 (0,05-0,3)	0,003
Proteinúria > 200mg/g creatinina ou albuminúria >30mg/g de creatinina	23 (56,1)	20 (37,0)	0,096
Hiperuricemia	7 (18,9)	4 (8,2)	0,195

AML: angiomiolipoma; CET: complexo esclerose tuberosa; DRC: doença renal crônica; LAM: linfangioleiomiomatose; MSCL: múltiplos angiomiolipomas sem CET ou LAM; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada.

O perfil de HAS dos nossa casuística revelou que a maior parte dos pacientes (66,7) se encontrava medicado com apenas uma classe de antihipertensivo, mais frequentemente inibidores da enzima da conversão de angiotensina (IECA) ou bloqueadores de receptor de angiotensina II (BRA). HAS de difícil controle, definida pela prescrição de três ou mais classes de anti-hipertensivos ocorreu em 11,9% dos pacientes do estudo (Tabela 14).

Tabela 13. Regressão logística para Hipertensão

	Significância	Odds ratio	IC
Faixa etária	0,003	2,6	1,4- 4,8
Sexo Feminino	0,602	0,7	0,2- 2,5
Afroamericano	0,376	2,0	0,4- 9,0
Nefrectomia tipos	0,017		
Nefrectomia parcial	0,004	4,3	1,6- 11,8
Nefrectomia total	0,492	1,6	0,4- 5,8
DRC 3 ou mais	0,035	3,9	1,1-13,8

DRC: doença renal crônica; IC: intervalo de confiança

Tabela 14: Distribuição de tratamento farmacológico nos pacientes hipertensos

	n (%)
IECA/BRA	33 (78,6)
Diuréticos Tiazídicos	14 (33,3)
Bloqueadores de canais de cálcio	8 (19,0)
Beta-bloqueadores	7 (16,7)
Hidralazina	1 (2,4)
Número de classes de anti-hipertensivos	
1	28 (66,7)
2	9 (21,4)
3	3 (7,1)
4	2 (4,8)
Diurético	16 (37,2)
Furosemida	2 (4,7)

BRA: bloqueadores de receptores de angiotensina; IECA: inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina

4.7. Sirolimo no Tratamento de AMLs

Sessenta e dois dos 147 pacientes estudados encontram-se em uso de sirolimo, o que totaliza 42,2% dos casos acompanhados na Unidade de Nefropatias Hereditárias do HC-FMUSP. O maior percentual de pacientes em tratamento com esse fármaco foi observado no grupo LAM (48,3%), seguido pelo grupo CET (42,5%) e MSCL (25%) (Tabela 15). O tratamento referente a este último grupo limita-se a 3 pacientes. Os pacientes com CET tratados com sirolimo apresentaram idade inferior àqueles com LAM também tratados [$36,0 \pm 10,7$ versus $45,3 \pm 8,7$ anos, $p=0,019$) e que pacientes MSCL tratados ($62,7 \pm 19,3$; $P<0,001$); pacientes com LAM tratados com sirolimo também se mostraram mais jovens que os MSCL tratados ($P=0,040$). Não observamos diferença entre os grupos para o tamanho do maior AML antecedendo o tratamento.

Tabela 15. Comparação das características demográficas, clínicas e radiológicas entre pacientes que receberam tratamento com sirolimo e pacientes que não receberam tratamento.

	Tratamento imTOR n (%) ou mediana (25-75%)	Não-Tratamento imTOR n (%) ou mediana (25-75%)	P
Diagnóstico			0,387
CET	45 (42,5)	61 (57,5)	
LAM	14 (48,3)	15 (51,7)	
MSCL	3 (25,0)	9 (75,0)	
Idade	38,2 (30,6-48,0)	31,1 (22,5-52,4)	0,142
Faixa etária			0,012
1 a 20 anos	1 (1,6)	11(12,9)	
20 a 39	33 (53,2)	39 (45,9)	
40 a 59	25 (40,3)	23 (27,1)	
60 ou mais	3 (4,8)	12 (14,1)	
Gênero			0,009
Feminino	55 (88,7)	60 (70,6)	
Masculino	7 (11,3)	25(29,4)	
Maior AML	6,0 (4,0-7,9)	2,1 (1,3-3,0)	<0,001
Volume do maior AML (cm ³)	6,5 (31,9-162,5)	3,0 (1,0-11,5)	<0,001
AMLs múltiplos	52 (85,2)	76 (90,5)	0,434
AMLs bilaterais	42 (70,0)	63 (77,8)	0,332
Números de AMLs			0,829
1	8 (13,1)	11 (14,7)	
2	4 (6,6)	7 (9,3)	
3	2 (3,3)	4 (5,3)	
4 ou mais	47 (77,0)	53 (70,7)	
AML extrarrenal	17 (28,8)	15 (22,4)	0,421
AML pobre em gordura	18 (30,0)	18 (30,5)	1,000
Infiltração renal	4 (9,5)	2 (4,8)	0,676
Sintomas de AML			0,182
Dor abdominal	13 (25,0)	9 (14,5)	
Sangramentos	2 (3,8)	7 (11,3)	
Dor abdominal/sangramento	4 (7,7)	2 (3,2)	
Sintomas compressivos	1 (1,9)	0 (0,0)	
Nefrectomias			0,021
Parcial	19 (31,1)	13 (17,1)	
Total	6 (9,8)	6 (7,9)	
Mais que uma parcial	3 (4,9)	1 (1,3)	
Parcial e total	2 (3,3)	2 (2,6)	
Embolização	11 (21,6)	2 (3,2)	0,003

Tabela 15: Continuação

	Tratamento imTOR n (%) ou mediana (25-75%)	Não-Tratamento imTOR n (%) ou mediana (25-75%)	P
Hipertensão	28 (46,7)	22 (29,7)	0,050
TFGe (mL/min/1.73 m ²)	88,4± 30,7	101,2± 33,2	0,021
DRC estágio 3 ou mais	13 (21,3)	7 (9,1)	0,053
Percentual da queda de TFGe anual	2,4 (1,2-8,5)	2,4 (0,8-3,6)	0,715
Proteinúria > 200mg/g creatinina ou albuminúria >30mg/g de creatinina	28 (53,8)	17 (36,2)	0,106

AML: angiomiolipoma; CET: complexo esclerose tuberosa; DRC: doença renal crônica; LAM: linfangioleiomiomatose; MSCL: múltiplos angiomiolipomas sem CET ou LAM; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada.

Devido a indicação do tratamento se basear principalmente no tamanho tumoral, pacientes tratados apresentaram tamanho e volume do maior AML superior ao grupo não tratado ($P<0,001$). O percentual de mulheres foi maior no grupo tratado que nos pacientes que não receberam sirolimo ($P=0,009$). Não houve diferença entre os grupos quanto a presença de sintomas ou complicações clínicas relacionados aos AMLs. O grupo em tratamento com sirolimo apresentou maior ocorrência de embolização prévia, apesar desse procedimento ter sido pouco realizado em nossa casuística. Pacientes tratados apresentaram menor TFGe ($P=0,021$) e a associação de HAS e DRC estágio 3 ou superior com o grupo tratado apresentou valor de P marginal ($P=0,050$ e $P=0,053$) (Tabela 13).

Nossa análise revelou redução do maior diâmetro do maior AML pós-tratamento, migrando de $6,5\pm 3,7$ cm para $4,6\pm 2,8$ cm ($p<0,001$; Figura 10a). Tais dados traduziram-se na redução de 46% (11,1-68,0) do volume dos AMLs (Figura 10b). O percentual de redução não diferiu entre os grupos CET e LAM, indicando uma resposta de potência semelhante (Figura 10b). O tempo de tratamento avaliado, compreendendo da instituição terapêutica até a imagem de controle, foi de 43,4 semanas (34,1-61,8) e não diferiu entre os grupos. A mediana de nível plasmático de sirolimo foi de 8,3 ng/ml (6,0-10,7), também não diferindo entre os grupos ($P=0,560$).

O tratamento com sirolimo foi bem tolerado e apresentou um perfil de efeitos adversos compatível com estudos anteriores (Tabela 16). Não foram observados

efeitos colaterais graves. Proteinúria > 1g/24h ou relação PCrU >1 g/g foi observada pelo menos uma vez em 23,1% dos pacientes não sendo significativamente diferente dos pacientes que não receberam sirolimo.

Figura 10. Resposta volumétrica do maior AML ao tratamento com sirolimo (a) e redução percentual do maior diâmetro tumoral ao tratamento (b). Sirolimo diminuiu tal diâmetro (teste de Wilcoxon), porém sua redução percentual não diferiu entre os grupos CET e LAM e MSCL (teste Kruskal-Wallis). CET: complexo esclerose tuberosa, LAM: linfangioleiomiomatose.

Tabela 16: Efeitos adversos, dose e nível sérico do tratamento com sirolimos

Efeitos Adversos do Sirolimo	n (%)
Aftas	11 (37,9)
Alterações menstruais	12 (44,4)
Dislipidemia	34 (54,8)
(estatinas ou CT>240 ou LDL>160)	
Dor Abdominal	6 (22,2)
Infecção	4 (14,8)
Proteinúria (g/24h) ou PCrU >1 g/g	12 (23,1)
Dose inicial de Sirolimo (mg)	3,0 (1,0-4,0)
Nível sérico de Sirolimo (ng/mL)	8,3 (6,0-10,7)

CT: colesterol total; LDL: *low-density lipoprotein*; PCrU: relação proteína/creatinina urinária

4.8. Efeito do Sirolimo em Pacientes com CET Submetidos à Nefrectomia Parcial com Preservação de Massa Renal

Devido a condições específicas, alguns pacientes foram submetidos a remoção tumoral cirúrgica, realizada por meio de nefrectomia parcial com preservação de massa renal (NPMR). As condições que motivaram tal procedimento encontram-se mencionadas na Tabela 17. Cabe ressaltar que todas as cirurgias foram realizadas antes de 2015, um período em que a segurança e os efeitos benéficos e dos imTORs a longo prazo eram ainda mais incertos que nos dias atuais. Entre os pacientes operados, seis estavam em uso de sirolimo por pelo menos seis meses, período já compatível com o efeito de platô observado para redução tumoral em estudos prévios. Com o intuito de verificar se o uso de sirolimo pré-procedimento cirúrgico foi benéfico, comparamos esses pacientes (grupo sirolimo, GS) com outros seis pacientes operados no mesmo período por motivos semelhantes, porém não submetidos a tratamento prévio com esse fármaco (grupo não tratado, NT). Todos os pacientes tinham o diagnóstico definitivo de CET. Os dados demográficos e basais dos pacientes encontram-se na Tabela 18. Não foram observadas diferenças significantes para os dados clínicos e radiológicos pré-cirúrgicos entre os grupos GS e NT. Todos os pacientes foram submetidos à cirurgia visando a NPMR.

Tabela 17. Indicações para nefrectomia parcial com preservação de massa renal em pacientes com CET.

Indicação	n (%)
	n=12
Aneurisma/vaso ectásico	8 (66,7)
Diâmetro do tumor > 8 cm	7 (58,3)
Dor abdominal	6 (50)
Sangramento prévio do tumor	3 (25)
Suspeita de malignidade	1 (8,3) (
≥ 2 indicações	10 (83,3)
≥ 3 indicações	3 (25)

Tabela 18. Dados demográficos, características clínicas e dados tomográficos dos AMLs dos pacientes com CET submetidos à nefrectomia parcial com preservação de massa renal analisados no estudo caso-controle.

		GS (n=6) n (%) ou média±desvio padrão		NT (n=6) n (%) ou média±desvio padrão		P
Idade (anos)		27.7 ± 5.4		31.2 ± 12.9		0.900
Sexo	Masculino	0	-	2	33,3%	0.455
	Feminino	6	100%	4	66,7%	
LAM		5	83.3%	2	33.3%	0.242
Hipertensão		1	16.7%	0		>0.999
Diabetes mellitus		0		0		-
Creatinina sérica basal (mg/dL)		0,78±0,16		0,91±0,18		0.213
Maior diâmetro de AML (cm)		13.1±10.1		9.0 ± 4.0		0.418
Múltiplos AMLs		5 (83.3%)		6 (100.0%)		>0.999

AML: angiomiolipoma; GS: grupo sirolimo, LAM: linfangioleiomiomatose, NT: nefrectomia total.

4.9. Sirolimo como Terapia Neoadjuvante em Nefrectomia Parcial com Preservação de Massa Renal para Angiomiolipomas se Associa a Menor Frequência de Perda Aguda de TFGe.

A creatinina sérica basal não diferiu entre os grupos tratado com sirolimo e não tratado. A variação deste parâmetro 48h pós-NPMR, no entanto, foi maior nos pacientes não tratados que nos tratados ($0,37 \pm 0,09$ versus $0,12 \pm 0,23$ mg/dL; $P=0,035$; Figura 11, Tabela 19). Em linha com essa observação, os pacientes que receberam sirolimo apresentaram menor frequência de queda de pelo menos 25% da TFGe (20% versus 100%, $P=0,015$). Também observamos que pacientes pré-tratados apresentaram taxa numericamente menor de injúria renal aguda pelo critério de KDIGO (*kidney disease improving global outcomes*, elevação de pelo menos 0,3mg/dL de Cr sérica), complicação que atingiu 20% desses pacientes contra 83.3% dos pacientes não tratados; esta redução, no entanto, não foi significativa ($P=0.080$).

O mesmo padrão também foi observado aproximadamente 7 meses após a cirurgia [209,5 dias (154-288); $0,21 \pm 0,08$ versus $0,06 \pm 0,14$ mg/dL, $P=0,042$]. Análise pareada comparando os níveis séricos de creatinina antes da NPMR com os obtidos até 48 h após a cirurgia revelou um incremento em pacientes não tratados ($0,91 \pm 0,18$

versus $1,28 \pm 0,23$ mg/dL, $p < 0,001$; Tabela 19), enquanto tal variação não foi significativa no grupo sirolimo ($0,78 \pm 0,16$ *versus* $0,91 \pm 0,32$ mg/dL, $p = 0,323$). O mesmo perfil foi observado ao comparar os valores basais com os obtidos pelo menos três meses após a cirurgia ($0,91 \pm 0,18$ *versus* $1,12 \pm 0,21$ mg/dL em pacientes não tratados, $P = 0,002$; e $0,78 \pm 0,16$ *versus* $0,84 \pm 0,27$ mg/dL no grupo tratado, $P = 0,380$; Tabela 19).

Na avaliação da creatinina mais recente disponível, após o tempo médio de pouco mais de seis anos ($2274,0 \pm 541,8$ dias), não detectamos diferença da variação de creatinina entre os dois grupos ($0,15 \pm 0,26$ para o grupo tratado *versus* $0,31 \pm 0,20$ mg/dL para o grupo controle, $P = 0,252$). Os dois grupos apresentaram incremento significativo da creatinina, evoluindo de $0,91 \pm 0,18$ para $1,22 \pm 0,29$ mg/dL ($P = 0,002$) no grupo controle e $0,78 \pm 0,16$ para $0,93 \pm 0,40$ mg/dL no grupo tratado ($P < 0,001$) (Tabela 19). Tais elevações em nível sérico de creatinina se traduz em perda anual média estimada de $2,4$ mL/min. $1,73\text{m}^2$ ($0,57$ - $2,46$) no grupo controle e $0,97$ mL/min. $1,73\text{m}^2$ ($-0,09$ - $1,21$) no grupo tratado, não tendo sido observada diferença significativa entre os grupos ($P = 0,215$).

Figura 11. Variações da creatinina sérica após nefrectomia parcial com preservação de massa renal para angiomiolipomas em pacientes com CET tratados e não tratados com sirolimo pré-cirurgia, precoce (≤ 48 h) e tardiamente (>3 meses) após tal intervenção.

Embora as complicações agudas relacionadas à NPMR, representadas por sangramento intraoperatório intenso, terem sido observadas apenas em pacientes não tratados, sua ocorrência não foi significativamente diferente da dos indivíduos tratados (33,0% *versus* 0,0%; $P > 0,999$) (Tabela 19). Não houve diferença na duração da cirurgia, no tempo de clampeamento da artéria renal, na variação do nível de hemoglobina e na cicatrização de feridas entre os dois grupos.

As complicações tardias relacionadas à cirurgia foram observadas apenas em pacientes não tratados. Sua ocorrência, no entanto, também não diferiu significativamente da do grupo tratado com sirolimo (16,7% *versus* 0,0%; $P > 0,999$). Essa complicação foi representada por atrofia renal. Um dos seis pacientes tratados e dois dos seis casos não tratados evoluíram para nefrectomia total, uma vez que a remoção tumoral apropriada mostrou-se inviável por nefrectomia parcial. Três dos pacientes tratados e um dos não tratados foram submetidos a NPMR laparoscópica. O caso não tratado e um dos tratados, contudo, tiveram que ser convertidos em

cirurgia aberta. Não foram registrados efeitos adversos graves relacionados ao sirolimo ao longo do período desse estudo.

Tabela 19. Caracterização cirúrgica e complicações associadas a nefrectomia parcial com preservação de massa renal para angiomiolipomas em pacientes com CET tratados e não tratados com sirolimo pré-cirurgia.

	GS (n=6) n (%) ou média±desvio padrão	NT (n=6) n (%) ou média±desvio padrão	P
Cirurgia por videolaparoscopia	3 (50,0)	1 (16,7)	>0,999
Conversão para cirurgia aberta	1 (33,3)	1 (100)	-
Variação de hemoglobina (g/dL)	2,5±0,8	3,4±3,2	0,526
Nefrectomia total	1 (16,7)	2 (33,3)	>0,999
Necessidade de transfusão de sangue	1 (16,7)	3 (50,0)	0,546
Tempo de clampeamento (min)	22,4 ± 9.2	21,3 ± 5.9	0,835
Hemorragia relacionada à cirurgia	0 (0,0)	2 (33,3)	0,455
Complicações pós-operatórias	0 (0,0)	1 (16,7)	>0,999
Variação de creatinina sérica em 48 h (mg/dL)	0,17±0,23	0,37±0,09	0,035
Variação de creatinina sérica em 7 meses (mg/dL)	0,06 ± 0,14	0,21 ± 0,08	0,043
Variação da creatinina em 6 anos	0,15 ± 0,0,28	0,31 ± 0,20	0,215

GS: grupo sirolimo, NT: nefrectomia total.

4.10. Análise da Resposta dos Diferentes Compartimentos dos AMLs ao Tratamento com Sirolimo

4.10.1. Características dos pacientes e dos angiomiolipomas analisados

Identificamos 10 pacientes com as condições adequadas para análise radiológica. Um radiologista especializado em imagem do aparelho urinário analisou as imagens para selecionar tumores com os perfis de gordura apropriados. Em sete casos um dos três perfis de gordura dos AMLs não foi identificado, totalizando vinte e três AMLs

selecionados para análise. O tamanho médio pré-tratamento dos AMLs foi de 4,5 cm (2,3-5,1). As características basais dos pacientes analisados e dos respectivos tumores encontram-se descritos na Tabela 20.

Tabela 20. Caracterização dos pacientes e angiomiolipomas incluídos nas análises radiológicas

	n	Mediana (Percentis 25-75%)
Idade do paciente	10	34,8 (22,9- 51,6)
Nível sérico de sirolimo (ng/mL)	7	8,1(7,6-9,6)
Tempo de tratamento antes da TC (dias)	23	258,0 (199,0-332,0)
Tamanho do tumor pré-tratamento (mm)	23	40,0 (23,0-51,0)
Diâmetro do aneurisma pré-tratamento (mm)	17	2,0 (1,0-4,5)
Volume total do TRG pré-tratamento (cm ³)	7	4,8 (2,4-23,4)
Tamanho do TRG pré-tratamento (mm)	7	25,0 (19,0-40,0)
Volume total do TCGI pré-tratamento (cm ³)	6	15,7 (2,4-260,7)
Tamanho do TCGI pré-tratamento (mm)	6	40 (16,25-93,7)
Volume total do TPG pré-tratamento (cm ³)	10	35,9 (20,0-167,8)
Tamanho do TPG pré-tratamento (mm)	10	45,0 (35,8-78,0)

TC: tomografia computadorizada; TCGI: tumor com conteúdo de gordura intermediário. TPG: tumor pobre em gordura; TRG: tumor rico em gordura.

4.10.2. A eficácia do sirolimo em reduzir o volume do tumor é maior em AMLs com pouca gordura

Como esperado, o sirolimo reduziu eficazmente o volume dos AMLs, levando a uma redução mediana de -52,3% (-68,7- -12,2) (Figuras 12 e 13). A resposta do volume tumoral, no entanto, foi heterogênea entre os diferentes perfis de gordura tumoral. Os TRGs apresentaram respostas menores ao tratamento com sirolimo que os TPGs [-12,2% (-27,1-38,6) versus -65,5% (-74,3- -61,1), $P = 0,014$] (Figuras 12 e 13). Os TCGIs, por sua vez, apresentaram uma diminuição de volume de -45,2% (-58,0-6,2), valor não significativamente diferente das dos grupos TRG e TPG (Figura 12, 13 e 14).

Figura 12: Volume total do tumor antes e depois do tratamento com sirolimo. As medidas repetidas foram analisadas pelo teste de Wilcoxon, enquanto as comparações entre os perfis de gordura do tumor foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis. TPG: tumor pobre em gordura; TRG: tumor rico em gordura; TCGI: tumor com conteúdo de gordura intermediário. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

Figura 13: Variação percentual do volume total do tumor e do volume do compartimento do tumor após o tratamento com sirolimo. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis. CPG: compartimento pobre em gordura; CRG: compartimento rico em gordura; CAV: compartimento altamente vascularizado; CCGI: compartimento com conteúdo de gordura intermediário. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figura 14. Resposta dos AMLs renais ao tratamento com sirolimo. (a, b) As imagens axiais de tomografia computadorizada de fase corticomedular obtidas antes do tratamento mostram AMLs lobulados com pouca gordura em ambos os rins (setas) e um AML rico em gordura surgindo do polo inferior do rim esquerdo (ponta de seta). (c, d) As imagens de TC axial de fase corticomedular obtidas após 7 meses de tratamento mostram redução volumétrica significativa dos AMLs com pouca gordura (setas) e alteração não significativa no AML rico em gordura (ponta de seta).

4.10.3. Baixo Componente Gorduroso no Tumor Constitui Preditor Independente de Resposta ao Sirolimo

Usando regressão logística de Firth, avaliamos preditores potenciais para resposta de redução volumétrica de pelo menos 50% dos AML. As variáveis independentes incluídas formam o perfil de gordura, gênero, idade, nível sérico de sirolimo, duração do tratamento e tamanho basal do tumor. Essa análise identificou o perfil TPG como o único preditor independente de resposta de redução de pelo menos metade do volume do tumor após esse tratamento (Tabela 21).

Tabela 21. Regressão logística de Firth para pelo menos 50% de redução do volume do AML

Variável	Odds Ratio	P	95% IC
Perfil do conteúdo de gordura do AML			
TRG	1		
TCGI	12,9	0,210	0,3-197,0
TPG	129,8	0,017	2,4-7039,3
Gênero (feminino)	1,1	0,975	0,0-52,6
Idade	1,1	0,446	0,9-1,2
Nível sérico de sirolimo	0,9	0,879	0,4-2,3
Duração do tratamento	1,0	0,318	0,9-1,0
Tamanho base do tumor	1,0	0,560	0,9-1,0

IC: intervalo de confiança; TCGI: tumor com conteúdo de gordura intermediário; TPG: tumor pobre em gordura; TRG: tumor rico em gordura.

4.10.4. Sirolimo Induz Redução Maciça das Estruturas Vasculares de AMLs, enquanto sua Ação é Essencialmente Não Eficaz sobre o Compartimento Rico em Gordura

As análises de volume dos diferentes compartimentos de AMLs após tratamento com sirolimo revelaram que todos os componentes, exceto o CPG, responderam ao tratamento com redução significativa de volume (Figuras 13 e 15).

Deve-se destacar que o CAV apresentou uma enorme redução de volume após essa terapia [0,9 cm³ (0,1-33,2) para 0,10 cm³ (0,0-2,3), P = 0,002] (Figura 16a), efeito responsável por uma diminuição volumétrica de 90,0% (80,7-98,5) desse compartimento tumoral (Figura 13). As variações no tamanho dos vasos ectásicos/aneurismas foram consistentes com esse achado, revelando desaparecimento ou redução maciça da maioria das lesões vasculares avaliadas [2,0 cm (1,0-4,5) para 0,0 cm (0,0-1,0), P <0,001] (Figuras 17 e 18).

Figura 15. Alterações no volume e no padrão de gordura do AML em resposta ao sirolimo. (a) A tomografia computadorizada de fase corticomedular axial pré-tratamento mostra AML renal pobre em gordura renal direita (seta branca). (b) A imagem da TC na fase corticomedular axial pós-tratamento revela redução do volume do tumor (seta branca) enquanto o componente adiposo se torna visível (seta preta). Observe que a redução do volume total do AML (de 76,4 cm³ para 26,9 cm³) ocorreu devido à diminuição dos compartimentos pobres em gordura (de 60,1 cm³ para 13,0 cm³) e altamente vascularizados (de 15,4 cm³ para 11,3 cm³).

Conforme esperado com base na resposta robusta de AMLs pobres em gordura ao sirolimo, o CPG apresentou redução maciça de volume seguindo-se a tal tratamento [2,5 cm³ (0,3-19,0) para 0,5 cm³ (0,1-8,6), $P = 0,002$] (Figura 16b), efeito que se traduziu em uma redução de volume de 77,8% (25,0-91,9) (Figura 13). Nesse cenário, o compartimento dos AMLs com atenuação de 30 HU ou mais foi responsável por 76,7% (25,6-100,0) da redução volumétrica total dos tumores.

Surpreendentemente, o volume do CRG não apenas não diminuiu em resposta ao sirolimo, como aumentou substancialmente na maioria dos casos. De fato, esse tratamento se acompanhou de um crescimento do CRG de 1,4 cm³ (0,25-7,8) para 2,6 cm³ (0,5-18,2), $P = 0,012$ (Figura 16c), efeito responsável por um crescimento volumétrico de 105,9% (21,7-256,6) (Figura 13).

Em consistência com os achados mencionados, o volume do CCGI respondeu ao tratamento com sirolimo com um comportamento intermediário entre CRG e CPG. De fato, o volume de CCGI diminuiu de 2,5 cm³ (0,8-10,0) para 1,5 cm³ (0,3-4,9) em resposta à terapia mencionada, $P = 0,014$ (Figura 16d), resposta também expressa como redução de volume de 61,5% (-11,7-75,0) dos AMLs analisados (Figura 13).

Figura 16. Variação do volume do compartimento tumoral - CAV (a), CPG (b), CRG (c) e CCGI (d) - após tratamento com sirolimo. CAV, CPG e CCGI apresentaram redução significativa de volume enquanto CRG apresentou aumento de volume. CAV: compartimento altamente vascularizado; CCGI: compartimento com conteúdo de gordura intermediário; CPG: compartimento pobre em gordura; CRG: compartimento rico em gordura. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Figura 17. Variação do tamanho dos vasos/aneurismas dos angiomiolipomas em resposta ao tratamento com sirolimo. As comparações foram realizadas com o teste de Wilcoxon. *** $P < 0,001$.

Deve-se notar, no entanto, que a alteração do volume do CCGI foi significativamente diferente da do CRG, mas não diferiu significativamente da variação do volume do CPG (Figura 13).

Figura 18. Resposta das estruturas vasculares intralesionais ao sirolimo. Imagens tomográficas da fase nefrográfica coronal obtidas (a) antes do tratamento e (b) após o tratamento, mostram desaparecimento de uma grande estrutura vascular intralesional do rim esquerdo e redução notável de um aneurisma intralesional em resposta ao tratamento com sirolimo (setas). Também é observado um aumento no componente de gordura (ponta de seta).

Como resultado desses efeitos diferenciais do sirolimo sobre os compartimentos dos AMLs, esse tratamento leva a alterações estruturais críticas no tumor. Dentro do

escopo das transformações visíveis do perfil de gordura dos AMLs, alguns TPGs respondem ao sirolimo tornando-se TRGs (Figura 19).

Figura 19. Lipossustituição em angiomiolipoma em resposta ao tratamento com sirolimo. Imagens tomográficas da fase corticomedular coronal obtidas (a) antes do tratamento e (b) após o tratamento, mostram o efeito do tratamento com sirolimo em um AML pobre em gordura no polo superior do rim direito (seta branca), revelando o aparecimento de um tumor rico em gordura (seta preta) em substituição ao padrão anterior pobre em gordura.

5. DISCUSSÃO

Os avanços no entendimento da patogênese do CET alcançados nas últimas décadas tiveram um impacto dramático sobre o cenário dessa doença. Indícios desse processo já podiam ser observados na década de 90, com um aumento marcante do reconhecimento diagnóstico. De fato, a incidência estimada dessa enfermidade passou de aproximadamente 1:30.000 no final da década de 60 (22) para até cerca de 1:5.800 nascidos vivos no ano de 1998 (21). Essa tendência crescente se estende até os dias de hoje; um estudo asiático recente mostrou duplicação aproximada no número de pacientes com CET entre análises conduzidas em 2006 e 2010 (103). Esse estudo também revelou aumento da idade dessa população de pacientes. Em conjunto, esses fatos sugerem não apenas um aumento da capacidade diagnóstica da comunidade médica, como também melhora do suporte clínico a tais pacientes, traduzido em sobrevida progressivamente maior.

Outro avanço marcante na área ocorreu nos últimos anos, com a viabilização de tratamento específico. Em determinados AMLs associados a CET, passou-se rapidamente de um tratamento essencialmente cirúrgico, transitando por opções terapêuticas representadas por métodos minimamente invasivos, para terapia medicamentosa baseada em alvos moleculares/bioquímicos. Vale notar que esta realidade científica e médica encontra-se atualmente em processo de consolidação. O conhecimento acumulado em CET, por sua vez, produziu mudanças significativas no entendimento e na abordagem de AMLs e LAM esporádicos. De fato, o reconhecimento de semelhanças fundamentais entre seus mecanismos patogênicos moleculares possibilitou a detecção de alvos moleculares comuns e extensão do emprego de imTORs também em casos de AMLs e LAM esporádicos.

Esse novo cenário médico, biológico e farmacológico refletiu-se em mudanças profundas em nossa atuação médica junto à Unidade de Nefropatias Hereditárias do HC-FMUSP. Enquanto em 2011 acompanhávamos apenas uma paciente com CET, seguimos no presente 158 casos com CET, LAM e AMLs esporádicos.

O envelhecimento experimentado pelos pacientes com CET, no entanto, trouxe novos desafios no manejo de manifestações mais tardias. Uma maior frequência e

gravidade da LAM, surgimento de neoplasias e aumento da prevalência de DRC passaram a ocupar um espaço mais amplo no cuidado desses pacientes. Vale destacar que nosso estudo revelou um índice de malignidades na população com CET mais elevado que em relatos anteriores, em uma população relativamente jovem. A frequência de CCRs de 3,8% encontra-se em linha com as publicações mais recentes, que estimam a prevalência de 4% para essa neoplasia na CET, em contraste com estudos mais antigos em que tal prevalência era de aproximadamente 2% (104, 105). Este achado preocupante enfatiza a importância de uma vigilância ativa sobre o desenvolvimento potencial de malignidades e da necessidade de métodos acurados para identificá-las. De fato, o reconhecimento de incidência aumentada de CCR em pacientes com CET, associado à presença de AMLs pobres em gordura, motivou a recomendação atual de realizar biópsia percutânea nos casos que permanecem com diagnóstico indeterminado após exames de imagem adequados (106-108). Em nossa casuística, um dos cinco tumores biopsiados mostrou-se maligno, realidade que apoia tal recomendação. Cabe ressaltar, no entanto, que o maior estudo dirigido para vigilância de malignidades renais é retrospectivo e a biópsia tumoral foi realizada em apenas três pacientes.(109) Desse modo, os dados a serem obtidos a partir do momento em que se passou a indicar mais frequentemente biópsia de tumores suspeitos serão essenciais para conhecer com maior exatidão tanto a fração de malignidade desses tumores como para embasar a realização de estudos de correlação mais refinados entre achados radiológicos e histológicos.

Nossa casuística mostra um predomínio marcante do sexo feminino. Tal achado deve-se, em parte, ao enriquecimento da população feminina no conjunto de pacientes avaliado, devido à inclusão do grupo LAM. Outro fator contribuidor potencial é o fato de pacientes do sexo feminino apresentarem maior aderência ao acompanhamento clínico em nosso serviço, fenômeno também observado para pacientes acompanhados por DRPAD. Além disso, a incidência de AMLs é maior no sexo feminino para AMLs esporádicos. É possível, por fim, que tais tumores também predominem em mulheres na CET. De fato, enquanto alguns estudos que reportam uma prevalência de AMLs equilibrada entre os sexos na CET (59), outros mostram maior frequência e número de lesões no sexo feminino (54, 110). Tal achado é provavelmente a tradução clínica da influência dos hormônios femininos sobre o

desenvolvimento tumoral (50, 51, 111). Esse efeito de crescimento dos AMLs é ilustrado por um aumento superior a 15 cm no diâmetro de um tumor de uma de nossas pacientes submetida a estimulação ovariana para coleta de óvulos (52).

Avaliações atuais revelam que complicações renais permanecem a principal causa de morte entre os pacientes com CET (57-59), enfatizando a importância de um seguimento nefrológico. Embora as taxas relatadas de evolução para doença renal em estágio final seja baixa em pacientes com CET (112), é importante atentar que as populações estudadas são geralmente jovens. Tal cenário se altera em idades mais elevadas. Após 45 anos de idade, até 40% dos pacientes com CET desenvolvem DRC, exibindo TFG_e equivalente à de indivíduos com 30 anos a mais da população geral (110). Em concordância com tais dados, em nossa casuística de CET o percentual de pacientes com TFG_e < 60 mL/min.1,73m² foi de 34,6% na idade de 40 anos ou mais. É interessante observar que 8,2% de nossos pacientes com CET evoluíram para DRC não associada a sangramentos ou procedimentos invasivos prévios, fato também observado em outros estudos (112, 113). Tais observações evidenciam a importância clínica de outros mecanismos de perda de função renal, tais como as diversas formas de acometimento cístico, infiltração renal, glomeruloesclerose segmentar e focal e acometimento renal intersticial associado a CET (114-116). Nossos dados também demonstram uma elevada taxa de perda percentual de função renal, observação consistente com o curso para DRC em idades relativamente jovens. Essa taxa elevada de perda de função renal parece acelerar em estágios mais avançados de DRC, atingindo uma perda anual mediana próxima de 10%.

Vale destacar que a taxa de redução da TFG_e não diferiu entre os grupos CET, LAM e MSCL. O desenvolvimento de DRC em pacientes portadores de AMLs esporádicos em idades mais precoces que na população geral, recentemente reconhecido, sugere a existência de um papel específico potencial dos AMLs no desenvolvimento de DRC (117). Em nossa casuística, a DRC se associou a albuminúria ou proteinúria elevada, presente em 52,6% dos pacientes com CET e em 20 e 25% em pacientes com LAM e MSCL, respectivamente. De fato, essa taxa elevada de pacientes com albuminúria/proteinúria aumentada se associou a taxas elevadas de DRC e HAS presentes em nossa população. Adicionalmente, o emprego de imTOR em parte

significativa dos pacientes pode também ter contribuído para tal achado. Cabe ressaltar, porém, que não foi observada diferença significativa da prevalência de albuminúria/proteinúria aumentada entre pacientes tratados e não tratados com sirolimo.

A prevalência de HAS mostrou-se aumentada em nosso estudo, atingindo mais que a terça parte de uma população relativamente jovem, observação que acompanha achados anteriores (114). Apesar de vários parâmetros clínicos e radiológicos terem se associado à HAS no CET, os mecanismos envolvidos em sua patogênese ainda são amplamente desconhecidos. Causas potenciais de aumento da incidência de HAS em CET incluem os índices aumentados de DRC e HAS que se seguem a procedimentos renais invasivos. Outro mecanismo teórico de gênese de HAS consiste na compressão do tecido renal adjacente pelo crescimento tumoral ou pelo acometimento cístico associado a CET, levando a hipoperfusão tecidual e ativação do SRA. Vale mencionar que um estudo prévio mostrou aumento da expressão do receptor AT1 da angiotensina II em AMLs, e encontrou menor frequência dessas lesões em pacientes com síndrome de contiguidade com DRPAD que recebiam IECA ou BRA (47). O conjunto desses dados apoia a vigilância cuidadosa da pressão arterial nesses pacientes e o uso de IECAs como controle farmacológico preferencial dessa complicação. Tais drogas também são recomendadas para pacientes hipertensos com albuminúria ou proteinúria aumentada, condição bastante frequente na população avaliada. Em sintonia com tais achados, 78,6% de nossos pacientes hipertensos são tratados com IECA ou BRA.

Intervenções invasivas voltadas à prevenção de hemorragia tumoral, incluindo nefrectomia parcial e embolização arterial seletiva, podem se acompanhar de perda significativa de tecido renal funcional e contribuir para um declínio precoce da função renal. Esta observação adquire grande relevância, na medida em que os procedimentos invasivos não são incomuns na prática clínica, dada a letalidade potencial associada a hemorragia de AMLs. De fato, um estudo de banco de dados recente reportou que 24,2% dos pacientes com CET tinham pelo menos uma intervenção renal invasiva (58). Como os pacientes com CET geralmente apresentam múltiplos AMLs e sua incidência aumenta com a idade, uma única intervenção é geralmente insuficiente para tratar todas as lesões. Nesse cenário, tais procedimentos

são muitas vezes repetidos ao longo da vida, expondo o paciente a um risco aumentado de DRC.

Também observamos um número elevado de intervenções invasivas prévias em nossa população de pacientes, excedendo a terça parte dos indivíduos analisados. A realização de nefrectomia, mesmo que parcial com preservação de massa renal, associou-se a uma menor TFG_e. Tal relação é citada em vários artigos prévios, entretanto os mesmos não os mencionam como fizemos no estudo atual (59, 118). Nossos dados revelam, ainda, associação de nefrectomia total com menor TFG_e quando comparada com nefrectomia parcial. Vale notar que tais achados seguem o padrão observado em estudos realizados em pacientes operados por câncer renal, fora do contexto do CET (119, 120). A menor queda de TFG associada a nefrectomia parcial também pode ser observada em nossa análise de associação de nefrectomias à DRC estágios 3 ou maior. No tempo de seguimento estudado, a nefrectomia total constituiu preditor independente de evolução para DRC, enquanto o mesmo não se confirmou para nefrectomias parciais. Tal diferença decorre muito provavelmente da maior preservação de massa renal associada a nefrectomia parcial que a remoção total do rim. Vale mencionar que a relação entre evolução para DRC e nefrectomia já foi estabelecida em pacientes com CCR, populações mais idosas que a nossa (121, 122). Por outro lado, estudos em populações mais jovens, classicamente doadores renais, mostram uma baixa associação entre nefrectomia total e risco aumentado de DRC (123). Portanto, diferentes populações se comportam de formas distintas frente a cirurgias renais quanto ao potencial de desenvolvimento de DRC. Nesse cenário, nossos dados fornecem informações relevantes sobre o impacto comparativo entre nefrectomia parcial e total em pacientes com múltiplos AMLs, revelando a importância de se evitar nefrectomia total sempre que possível.

Ao contrário de nefrectomia total, nefrectomia parcial constituiu preditor independente para HAS. Tal associação, não relatada para CET, é controversa em outros cenários. Enquanto dois estudos reportaram associação entre nefrectomia parcial e progressão posterior para HAS (124), mesmo em relação a nefrectomia total (125), outro não encontrou tal associação (126) e um quarto revelou maior associação de HAS à nefrectomia radical (127). Ainda não foram completamente esclarecidos mecanismos que possam justificar tais dados aparentemente

conflitantes. Essa heterogeneidade de achados, entretanto, sugere que o desenvolvimento de HAS no escopo das nefrectomias dependa de múltiplos fatores. Por um lado, a maior perda de massa renal associada à nefrectomia total se acompanha de um maior potencial de redução crítica de TFG, condição associada à HAS (128). Nefrectomia parcial, por sua vez, apresenta risco potencial de elevação de renina sérica devido a expansão do espaço perinefrético ou subcapsular, classicamente por acúmulo sanguíneo (129). Além disso, estudos experimentais e relatos clínicos sugerem que sensibilidade ao sal e elevação do SRA contribuam para o desenvolvimento de HAS associado à nefrectomia parcial (130-133). Adicionalmente, procedimentos realizados na nefrectomia parcial, incluindo clampeamento do hilo renal, compressão da cápsula durante a renorrafia e oposição das extremidades cortadas dos vasos arteriais e venosos, apresentam potencial teórico de alterar parâmetros hemodinâmicos renais e contribuir para o desenvolvimento de HAS (125). Nossos achados trazem, portanto, dados adicionais de suporte à tendência atual de evitar a realização de nefrectomia em pacientes com AMLs múltiplos sempre que possível.

Mesmo nesse cenário, em determinados casos a intervenção cirúrgica é ainda hoje necessária. Tais casos incluem a remoção de lesões grandes contendo estruturas vasculares proeminentes, alta suspeita de malignidade e controle de sintomas associados ao volume tumoral em AMLs em que medidas clínicas ou invasivas não se mostraram suficientes. Nesses casos, medidas que minimizem a perda de função renal consequente à nefrectomia são essenciais. Nesse contexto, a menor variação da creatinina sérica seguindo-se a NPMR, observada nos pacientes tratados pré-cirurgicamente com sirolimo, sugere que esse fármaco possa constituir uma terapia neoadjuvante benéfica para essa intervenção. A ausência de aumento significativo da creatinina sérica em pacientes tratados após o período mediano de sete meses, em oposição ao aumento significativo verificado para pacientes não tratados, também apoia o efeito renoprotetor do tratamento com sirolimo precedendo a NPMR. Tal efeito baseia-se provavelmente em uma maior preservação da função renal, decorrente de uma menor remoção de tecido renal funcional. Essa menor remoção é aparentemente viabilizada pela redução pré-cirúrgica do tamanho do tumor. Após seis anos, no entanto, detectamos queda da TFGe para os pacientes tratados e não

tratados. Esses dados são consistentes com risco aumentado para a perda de função renal presente em pacientes com CET, particularmente em pacientes com AMLs grandes e múltiplos (59), condição aplicável aos pacientes incluídos nesta análise. Apesar da elevação da creatinina sérica ter sido numericamente maior nos pacientes não tratados com sirolimo, tal diferença não foi significativa. A não detecção de tal diferença pode ter decorrido do tamanho amostral e de efeitos agregados de outros fatores que influenciaram a progressão da doença renal nesse tempo maior de seguimento. Em apoio a essa opção neoadjuvante, o tratamento com sirolimo mostrou-se seguro em pacientes com CET e plano de submissão a NPMR.

Nossas análises radiológicas revelaram redução tumoral significativa em resposta ao tratamento com sirolimo, confirmando os achados de estudos prévios. De maneira geral, a diminuição do volume tumoral foi de quase 50%, embora as respostas tenham variado bastante nos três grupos avaliados. A redução tumoral, entretanto, não diferiu entre pacientes com CET, LAM e MSCL. Esse achado sugere que os AMLs associados a essas várias condições guardam potenciais semelhantes de resposta a imTORs. No entanto, apesar do efeito potente de imTORs sobre o volume de AMLs, a resposta a essas drogas também se mostrou muito variável (83). Vale destacar que AMLs são neoplasias histologicamente complexas, com componentes derivados de pelo menos três linhagens celulares fenotipicamente distintas. Tais observações embasaram nossa hipótese de que imTORs poderiam apresentar efeitos diferentes sobre componentes/compartimentos tumorais distintos. A elucidação desse efeito poderia não apenas esclarecer um problema biológico complexo, mas também trazer novas e importantes informações ao cenário clínico. Seguindo essa linha de investigação, nossas análises em pacientes com CET revelaram efeitos diferenciais do sirolimo em AMLs com diferentes proporções de gordura. Tumores pobres em gordura exibiram uma resposta dramática de redução de volume ao sirolimo, enquanto tal efeito foi muito menor nos AMLs ricos em gordura. Alinhados com esses achados, AMLs com conteúdo intermediário de gordura apresentaram um comportamento de diminuição do volume em resposta ao sirolimo intermediário entre os tumores pobres e ricos em gordura. Esse comportamento diferencial é amparado por nossa análise de desfecho para redução de ao menos 50% do volume inicial, que revelou que baixo teor de gordura em AML constitui preditor

independente de resposta mais eficaz ao sirolimo. Este achado confirma observação anterior (134), constituindo uma ferramenta potencial para avaliação de tratamento de AMLs com imTORs.

Nossos resultados revelaram, também, que o efeito diferencial do sirolimo sobre o volume de AMLs deve-se essencialmente a efeitos diferentes sobre compartimentos tumorais específicos. Nossos dados mostraram que a redução tumoral ocorre primariamente por diminuição do volume das porções pobres em gordura dos tumores. Curiosamente, o efeito acentuado do sirolimo sobre os compartimentos pobre em gordura e altamente vascularizado promoveu a transformação de alguns tumores pobres em gordura em tumores ricos em gordura, um fenômeno não relatado anteriormente. A lipossustituição observada nesses AMLs representa, de fato, a tradução mais radical dos efeitos diferenciais de imTORs sobre os diferentes compartimentos tumorais. Nossos achados também revelaram uma diminuição dramática das formações aneurismáticas/vasculares. Em linha com esse conceito, o volume do compartimento rico em gordura dos AMLs analisados não apenas não diminuiu, como aumentou em resposta ao tratamento. Nosso achado de redução maciça do componente vascular tumoral em resposta ao sirolimo, por sua vez, sugere que esse tratamento reduza o risco de sangramento de AMLs.

Nossos dados são consistentes com observações anteriores de que os efeitos *in vitro* do sirolimo diferem entre linhagens celulares distintas (135). Vale notar que pacientes com CET exibem altos níveis das moléculas pró-angiogênicas VEGF-A e VEGF-D (*vascular epithelial growth factors* A e D) (47). imTORs, portanto, poderiam atuar diferencialmente sobre componentes distintos dos AMLs, com eficiência particularmente alta sobre as formações vasculares. De fato, mTOR-complexo 1 (mTORC1) é conhecido por atuar na sinalização de HIF-1 α e VEGF-A por meio de mecanismos múltiplos que envolvem 4E-BP1, S6K1 e STAT3 (136). Em nossos pacientes, esse processo angiogênico foi potencialmente atenuado pelo sirolimo. É importante mencionar que esse fármaco associa-se a aceleração da senescência endotelial (93). É possível, portanto, que os efeitos diferenciais dos imTORs sobre compartimentos altamente vascularizados se baseie na regulação negativa de VEGF determinada pela inibição do mTORC1 (87). De forma interessante, um estudo anterior também reportou redução dos níveis circulantes do

VEGF-D em pacientes recebendo sirolimo (79). A redução marcante dos componentes vasculares de AMLs revelada por nosso estudo sugere que a atividade de mTOR seja fundamental para a manutenção de tais estruturas nesses tumores. Uma vez que o principal determinante da complicação hemorrágica de AMLs é a ruptura de aneurismas intratumorais (62), nossos achados sugerem que a inibição da manutenção e desenvolvimento de formações aneurismáticas/ectásicas induzida por sirolimo constitua-se no mecanismo responsável pela redução da ocorrência de sangramento observada no estudo EXIST-2 e em sua extensão (82, 83).

Nossos resultados sugerem, portanto, que a análise de imagem dos compartimentos de AMLs seja um instrumento útil para prever a resposta do tumor a tratamento com inibidores de mTOR. Nossos dados revelam, além disso, que o tratamento com sirolimo não apenas reduz o tamanho do tumor, mas atua seletivamente sobre componentes associados às complicações clínicas mais frequentes e mais graves, como sangramento tumoral. Nossos resultados também proveem suporte adicional à recente recomendação de tratamento crônico com imTOR em indivíduos com CET associada a AMLs maiores que 3 cm, e sugerem que a presença de grandes aneurismas/formações vasculares devam constituir um critério independente para iniciar tal terapia.

6. CONCLUSÕES

6.1. Conclusões fundamentais

- A resposta de diminuição volumétrica de angiomiolipomas determinada por sirolimo ocorre primariamente por redução de compartimentos tumorais com baixo teor em gordura.
- O tratamento com sirolimo se associa a redução da vascularização tumoral, incluindo formações aneurismáticas e ectásicas.
- Baixo conteúdo de gordura constitui preditor independente de resposta de redução de volume de AML ao sirolimo.

6.2 Conclusões adicionais

- O complexo esclerose tuberosa associa-se a uma frequência aumentada de neoplasias malignas em idade jovem.
- Nefrectomia prévia associa-se a menor taxa de filtração estimada em pacientes com angiomiolipomas múltiplos isolados ou associados a CET ou LAM.
- Nefrectomia total constitui preditor independente para desenvolvimento de doença renal crônica estágios 3 ou superior em pacientes com angiomiolipomas múltiplos isolados ou associados a CET ou LAM.
- Nefrectomia parcial constitui preditor independente para hipertensão arterial sistêmica em pacientes com angiomiolipomas múltiplos isolados ou associados a CET ou LAM.
- Nossos dados sugerem que tratamento pré-cirurgia com sirolimo seja benéfico como neoadjuvante em pacientes que apresentem indicação de nefrectomia parcial.

- Hipertensão arterial, doença renal crônica e albuminúria associam-se em pacientes com angiomiolipomas múltiplos isolados ou associados a CET ou LAM, sugerindo o uso preferencial de IECA/BRA no tratamento da hipertensão arterial nesses pacientes.

8. REFERÊNCIAS

1. Lane BR, Aydin H, Danforth TL, Zhou M, Remer EM, Novick AC, et al. Clinical correlates of renal angiomyolipoma subtypes in 209 patients: classic, fat poor, tuberous sclerosis associated and epithelioid. *The Journal of urology*. 2008;180(3):836-43.
2. Jinzaki M, Silverman SG, Akita H, Mikami S, Oya M. Diagnosis of Renal Angiomyolipomas: Classic, Fat-Poor, and Epithelioid Types. *Semin Ultrasound CT MR*. 2017;38(1):37-46.
3. Seyam RM, Bissada NK, Kattan SA, Mokhtar AA, Aslam M, Fahmy WE, et al. Changing trends in presentation, diagnosis and management of renal angiomyolipoma: comparison of sporadic and tuberous sclerosis complex-associated forms. *Urology*. 2008;72(5):1077-82.
4. Fujii Y, Ajima J, Oka K, Tosaka A, Takehara Y. Benign renal tumors detected among healthy adults by abdominal ultrasonography. *European urology*. 1994;27(2):124-7.
5. Fittschen A, Wendlik I, Oeztuerk S, Kratzer W, Akinli AS, Haenle MM, et al. Prevalence of sporadic renal angiomyolipoma: a retrospective analysis of 61,389 in- and out-patients. *Abdom Imaging*. 2014;39(5):1009-13.
6. Rule AD, Sasiwimonphan K, Lieske JC, Keddiss MT, Torres VE, Vrtiska TJ. Characteristics of renal cystic and solid lesions based on contrast-enhanced computed tomography of potential kidney donors. *American Journal of Kidney Diseases*. 2012;59(5):611-8.
7. Hajdu SI, Foote FW. Angiomyolipoma of the kidney: report of 27 cases and review of the literature. *J Urol*. 1969;102(4):396-401.
8. Koo KC, Kim WT, Ham WS, Lee JS, Ju HJ, Choi YD. Trends of presentation and clinical outcome of treated renal angiomyolipoma. *Yonsei Med J*. 2010;51(5):728-34.
9. Bissler JJ, Kingswood JC. Renal angiomyolipomata. *Kidney international*. 2004;66(3):924-34.
10. Casper KA, Donnelly LF, Chen B, Bissler JJ. Tuberous Sclerosis Complex: Renal Imaging Findings 1. *Radiology*. 2002;225(2):451-6.
11. De Pauw RA, Boelaert JR, Haenebalcke CW, Matthys EG, Schurgers MS, De Vriese AS. Renal angiomyolipoma in association with pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(4):877-83.
12. Martignoni G, Pea M, Reghellin D, Zamboni G, Bonetti F. PEComas: the past, the present and the future. *Virchows Archiv*. 2008;452(2):119-32.
13. Thway K, Fisher C. PEComa: morphology and genetics of a complex tumor family. *Ann Diagn Pathol*. 2015;19(5):359-68.
14. Arenson A, Graham R, Shaw P, Srigley J, Herschorn S. Angiomyolipoma of the kidney extending into the inferior vena cava: sonographic and CT findings. *American Journal of Roentgenology*. 1988;151(6):1159-61.
15. Park HK, Zhang S, Wong MK, Kim HL. Clinical presentation of epithelioid angiomyolipoma. *International journal of urology*. 2007;14(1):21-5.

16. Brimo F, Robinson B, Guo C, Zhou M, Latour M, Epstein JI. Renal epithelioid angiomyolipoma with atypia: a series of 40 cases with emphasis on clinicopathologic prognostic indicators of malignancy. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(5):715-22.
17. LeRoy MA, Rao P. Angiomyolipoma With Epithelial Cysts. *Arch Pathol Lab Med*. 2016;140(6):594-7.
18. Rosenkrantz AB, Hecht EM, Taneja SS, Melamed J. Angiomyolipoma with epithelial cysts: mimic of renal cell carcinoma. *Clin Imaging*. 2010;34(1):65-8.
19. Jinzaki M, Silverman SG, Akita H, Nagashima Y, Mikami S, Oya M. Renal angiomyolipoma: a radiological classification and update on recent developments in diagnosis and management. *Abdom Imaging*. 2014;39(3):588-604.
20. Silverman SG, Israel GM, Herts BR, Richie JP. Management of the Incidental Renal Mass 1. *Radiology*. 2008;249(1):16-31.
21. O'Callaghan FJ, Shiell AW, Osborne JP, Martyn CN. Prevalence of tuberous sclerosis estimated by capture-recapture analysis. *Lancet*. 1998;351(9114):1490.
22. Osborne JP, Fryer A, Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1991;615(1):125-7.
23. Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9639):657-68.
24. Crino PB, Nathanson KL, Henske EP. The tuberous sclerosis complex. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(13):1345-56.
25. Leung AK, Robson WL. Tuberous sclerosis complex: a review. *J Pediatr Health Care*. 2007;21(2):108-14.
26. Curatolo P, Moavero R, de Vries PJ. Neurological and neuropsychiatric aspects of tuberous sclerosis complex. *Lancet Neurol*. 2015;14(7):733-45.
27. Inoue Y, Nemoto Y, Murata R, Tashiro T, Shakudo M, Kohno K, et al. CT and MR imaging of cerebral tuberous sclerosis. *Brain Dev*. 1998;20(4):209-21.
28. Hallett L, Foster T, Liu Z, Bliden M, Valentim J. Burden of disease and unmet needs in tuberous sclerosis complex with neurological manifestations: systematic review. *Curr Med Res Opin*. 2011;27(8):1571-83.
29. Webb DW, Clarke A, Fryer A, Osborne JP. The cutaneous features of tuberous sclerosis: a population study. *Br J Dermatol*. 1996;135(1):1-5.
30. Yates JR, Maclean C, Higgins JN, Humphrey A, le Maréchal K, Clifford M, et al. The Tuberous Sclerosis 2000 Study: presentation, initial assessments and implications for diagnosis and management. *Arch Dis Child*. 2011;96(11):1020-5.
31. Cudzilo CJ, Szczesniak RD, Brody AS, Rattan MS, Krueger DA, Bissler JJ, et al. Lymphangioleiomyomatosis screening in women with tuberous sclerosis. *Chest*. 2013;144(2):578-85.
32. Chu SC, Horiba K, Usuki J, Avila NA, Chen CC, Travis WD, et al. Comprehensive evaluation of 35 patients with lymphangioleiomyomatosis. *CHEST Journal*. 1999;115(4):1041-52.

33. Franz D, Bissler J, McCormack F. Tuberous sclerosis complex: neurological, renal and pulmonary manifestations. *Neuropediatrics*. 2010;41(5):199-208.
34. Kingswood JC, Bissler JJ, Budde K, Hulbert J, Guay-Woodford L, Sampson JR, et al. Review of the Tuberous Sclerosis Renal Guidelines from the 2012 Consensus Conference: Current Data and Future Study. *Nephron*. 2016;133(4).
35. Henske EP, Neumann HP, Scheithauer BW, Herbst EW, Short MP, Kwiatkowski DJ. Loss of heterozygosity in the tuberous sclerosis (TSC2) region of chromosome band 16p13 occurs in sporadic as well as TSC-associated renal angiomyolipomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 1995;13(4):295-8.
36. Consugar MB, Wong WC, Lundquist PA, Rossetti S, Kubly VJ, Walker DL, et al. Characterization of large rearrangements in autosomal dominant polycystic kidney disease and the PKD1/TSC2 contiguous gene syndrome. *Kidney Int*. 2008;74(11):1468-79.
37. Carroll B, Maetzel D, Maddocks OD, Otten G, Ratcliff M, Smith GR, et al. Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *Elife*. 2016;5.
38. Hanrahan J, Blenis J. Rheb activation of mTOR and S6K1 signaling. *Methods Enzymol*. 2006;407:542-55.
39. Green AJ, Smith M, Yates JR. Loss of heterozygosity on chromosome 16p13. 3 in hamartomas from tuberous sclerosis patients. *Nature genetics*. 1994;6(2):193-6.
40. Sepp T, Yates J, Green AJ. Loss of heterozygosity in tuberous sclerosis hamartomas. *Journal of medical genetics*. 1996;33(11):962-4.
41. Giannikou K, Malinowska IA, Pugh TJ, Yan R, Tseng YY, Oh C, et al. Whole Exome Sequencing Identifies TSC1/TSC2 Biallelic Loss as the Primary and Sufficient Driver Event for Renal Angiomyolipoma Development. *PLoS Genet*. 2016;12(8):e1006242.
42. Cheng L, Gu J, Eble JN, Bostwick DG, Younger C, MacLennan GT, et al. Molecular genetic evidence for different clonal origin of components of human renal angiomyolipomas. *Am J Surg Pathol*. 2001;25(10):1231-6.
43. Saxena A, Alport EC, Custead S, Skinnider LF. Molecular analysis of clonality of sporadic angiomyolipoma. *J Pathol*. 1999;189(1):79-84.
44. Karbowiczek M, Yu J, Henske EP. Renal angiomyolipomas from patients with sporadic lymphangiomyomatosis contain both neoplastic and non-neoplastic vascular structures. *Am J Pathol*. 2003;162(2):491-500.
45. Bonsib SM, Moghadamfalahi M, Bhalodia A. Lymphatic differentiation in renal angiomyolipomas. *Hum Pathol*. 2009;40(3):374-80.
46. Yue M, Pacheco G, Cheng T, Li J, Wang Y, Henske EP, et al. Evidence Supporting a Lymphatic Endothelium Origin for Angiomyolipoma, a TSC2(-) Tumor Related to Lymphangiomyomatosis. *Am J Pathol*. 2016;186(7):1825-36.
47. Siroky BJ, Yin H, Dixon BP, Reichert RJ, Hellmann AR, Ramkumar T, et al. Evidence for pericyte origin of TSC-associated renal angiomyolipomas and implications for angiotensin receptor inhibition therapy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307(5):F560-70.

48. Logginidou H, Ao X, Russo I, Henske EP. Frequent estrogen and progesterone receptor immunoreactivity in renal angiomyolipomas from women with pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Chest*. 2000;117(1):25-30.
49. Dixon BP, Hulbert JC, Bissler JJ. Tuberous sclerosis complex renal disease. *Nephron Exp Nephrol*. 2011;118(1):e15-20.
50. Gallagher JC, Gallagher DJ. Renal hamartoma (angiomyolipoma) with spontaneous rupture during pregnancy. *Obstet Gynecol*. 1978;52(4):481-3.
51. Gould Rothberg BE, Grooms MC, Dharnidharka VR. Rapid growth of a kidney angiomyolipoma after initiation of oral contraceptive therapy. *Obstet Gynecol*. 2006;108(3 Pt 2):734-6.
52. Watanabe EH, Neves PD, Balbo BE, Sampaio CA, Onuchic LF. Giant Renal Angiomyolipoma Following Ovarian Stimulation Therapy. *Urology*. 2018;112:e3-e4.
53. Nelson CP, Sanda MG. Contemporary diagnosis and management of renal angiomyolipoma. *The Journal of urology*. 2002;168(4 Pt 1):1315-25.
54. Rakowski SK, Winterkorn EB, Paul E, Steele DJ, Halpern EF, Thiele EA. Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: Incidence, prognosis, and predictive factors. *Kidney Int*. 2006;70(10):1777-82.
55. Lienert AR, Nicol D. Renal angiomyolipoma. *BJU international*. 2012;110(S4):25-7.
56. Van Baal J, Smits N, Keeman J, Lindhout D, Verhoef S. The evolution of renal angiomyolipomas in patients with tuberous sclerosis. *The Journal of urology*. 1994;152(1):35-8.
57. Shepherd CW, GOMEZ MR, Lie J, CROWSON CS, editors. *Causes of death in patients with tuberous sclerosis*. Mayo Clinic Proceedings; 1991: Elsevier.
58. Song X, Liu Z, Cappell K, Gregory C, Said Q, Prestifilippo J, et al. Natural history of patients with tuberous sclerosis complex related renal angiomyolipoma. *Curr Med Res Opin*. 2017;33(7):1277-82.
59. Eijkemans MJ, van der Wal W, Reijnders LJ, Roes KC, van Waalwijk van Doorn-Khosrovani SB, Pelletier C, et al. Long-term Follow-up Assessing Renal Angiomyolipoma Treatment Patterns, Morbidity, and Mortality: An Observational Study in Tuberous Sclerosis Complex Patients in the Netherlands. *Am J Kidney Dis*. 2015;66(4):638-45.
60. Steiner MS, Goldman SM, Fishman EK, Marshall FF. The natural history of renal angiomyolipoma. *The Journal of urology*. 1993;150(6):1782-6.
61. Bissler JJ, Kingswood JC. Optimal treatment of tuberous sclerosis complex associated renal angiomyolipomata: a systematic review. *Ther Adv Urol*. 2016;8(4):279-90.
62. Yamakado K, Tanaka N, Nakagawa T, Kobayashi S, Yanagawa M, Takeda K. Renal Angiomyolipoma: Relationships between Tumor Size, Aneurysm Formation, and Rupture 1. *Radiology*. 2002;225(1):78-82.
63. Rimon U, Duvdevani M, Garniek A, Golan G, Bensaid P, Ramon J, et al. Large renal angiomyolipomas: digital subtraction angiographic grading and presentation with bleeding. *Clin Radiol*. 2006;61(6):520-6.

64. Malaga-Dieguez L, Spencer R, Pehrson LJ, Vento S, Menzer K, Devinsky O, et al. Early manifestations of renal disease in patients with tuberous sclerosis complex. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2017;10:91-5.
65. De Waele L, Lagae L, Mekahli D. Tuberous sclerosis complex: the past and the future. *Pediatr Nephrol.* 2015;30(10):1771-80.
66. Flynn PM, Robinson MB, Stapleton FB, Roy S, Koh G, Tonkin IL. Coarctation of the aorta and renal artery stenosis in tuberous sclerosis. *Pediatr Radiol.* 1984;14(5):337-9.
67. Patzer L, Basche S, Misselwitz J. Renal artery stenosis and aneurysmatic dilatation of arteria carotis interna in tuberous sclerosis complex. *Pediatr Nephrol.* 2002;17(3):193-6.
68. Salerno AE, Marsenic O, Meyers KE, Kaplan BS, Hellinger JC. Vascular involvement in tuberous sclerosis. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(8):1555-61.
69. Boorjian SA, Frank I, Inman B, Lohse CM, Cheville JC, Leibovich BC, et al. The role of partial nephrectomy for the management of sporadic renal angiomyolipoma. *Urology.* 2007;70(6):1064-8.
70. Oesterling J, Fishman EK, Goldman SM, Marshall F. The management of renal angiomyolipoma. *The Journal of urology.* 1986;135(6):1121-4.
71. Dickinson M, Ruckle H, Beaghtler M, Hadley H. Renal angiomyolipoma: optimal treatment based on size and symptoms. *Clinical nephrology.* 1998;49(5):281-6.
72. Byrd GF, Lawatsch EJ, Mesrobian H-G, Begun F, Langenstroer P. Laparoscopic cryoablation of renal angiomyolipoma. *The Journal of urology.* 2006;176(4):1512-6.
73. Ewalt DH, Diamond N, Rees C, Sparagana SP, Delgado M, Batchelor L, et al. Long-term outcome of transcatheter embolization of renal angiomyolipomas due to tuberous sclerosis complex. *The Journal of urology.* 2005;174(5):1764-6.
74. Lenton J, Kessel D, Watkinson AF. Embolization of renal angiomyolipoma: immediate complications and long-term outcomes. *Clin Radiol.* 2008;63(8):864-70.
75. Soulen MC, Faykus MH, Shlansky-Goldberg RD, Wein AJ, Cope C. Elective Embolization for Prevention of Hemorrhage from Renal Angiomyolipomas. *Journal of Vascular and Interventional Radiology.* 1994;5(4):587-91.
76. Lowrance WT, Yee DS, Savage C, Cronin AM, O'Brien MF, Donat SM, et al. Complications after radical and partial nephrectomy as a function of age. *J Urol.* 2010;183(5):1725-30.
77. Ouzaid I, Autorino R, Fatica R, Herts BR, McLennan G, Remer EM, et al. Active surveillance for renal angiomyolipoma: outcomes and factors predictive of delayed intervention. *BJU Int.* 2014;114(3):412-7.
78. Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, et al. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis. *New England Journal of Medicine.* 2008;358(2):140-51.
79. Dabora SL, Franz DN, Ashwal S, Sagalowsky A, DiMario FJ, Miles D, et al. Multicenter phase 2 trial of sirolimus for tuberous sclerosis: kidney angiomyolipomas and other tumors regress and VEGF- D levels decrease. *PLoS One.* 2011;6(9):e23379.

80. Davies DM, de Vries PJ, Johnson SR, McCartney DL, Cox JA, Serra AL, et al. Sirolimus therapy for angiomyolipoma in tuberous sclerosis and sporadic lymphangioleiomyomatosis: a phase 2 trial. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(12):4071-81.
81. Cabrera López C, Martí T, Catalá V, Torres F, Mateu S, Ballarín Castán J, et al. Efectos de la rapamicina en los angiomiolipomas de pacientes con esclerosis tuberosa. *Nefrología (Madrid)*. 2011;31(3):292-8.
82. Bissler JJ, Kingswood JC, Radzikowska E, Zonnenberg BA, Frost M, Belousova E, et al. Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangioleiomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013;381(9869):817-24.
83. Bissler JJ, Kingswood JC, Radzikowska E, Zonnenberg BA, Frost M, Belousova E, et al. Everolimus for renal angiomyolipoma in patients with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangioleiomyomatosis: extension of a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(1):111-9.
84. Yang P, Cornejo KM, Sadow PM, Cheng L, Wang M, Xiao Y, et al. Renal cell carcinoma in tuberous sclerosis complex. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(7):895-909.
85. Tyburczy ME, Jozwiak S, Malinowska IA, Chekaluk Y, Pugh TJ, Wu CL, et al. A shower of second hit events as the cause of multifocal renal cell carcinoma in tuberous sclerosis complex. *Hum Mol Genet*. 2015;24(7):1836-42.
86. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular cell*. 2006;22(2):159-68.
87. Guba M, Von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature medicine*. 2002;8(2):128-35.
88. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu M-M, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Research*. 2000;60(6):1541-5.
89. Gupta K, Kshirsagar S, Li W, Gui L, Ramakrishnan S, Gupta P, et al. VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Experimental cell research*. 1999;247(2):495-504.
90. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 1999;13(1):9-22.
91. Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR, Kaelin WG. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and-independent pathways. *Cancer cell*. 2003;4(2):147-58.
92. Imanishi T, Kobayashi K, Kuki S, Takahashi C, Akasaka T. Sirolimus accelerates senescence of endothelial progenitor cells through telomerase inactivation. *Atherosclerosis*. 2006;189(2):288-96.
93. Ota H, Eto M, Ako J, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, et al. Sirolimus and everolimus induce endothelial cellular senescence via sirtuin 1 down-regulation: therapeutic

implication of cilostazol after drug-eluting stent implantation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53(24):2298-305.

94. Grantham JJ, Mulamalla S, Swenson-Fields KI. Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(10):556-66.

95. Fonseca JM, Bastos AP, Amaral AG, Sousa MF, Souza LE, Malheiros DM, et al. Renal cyst growth is the main determinant for hypertension and concentrating deficit in Pkd1-deficient mice. *Kidney Int*. 2014;85(5):1137-50.

96. Harabayashi T, Shinohara N, Katano H, Nonomura K, Shimizu T, Koyanagi T. Management of renal angiomyolipomas associated with tuberous sclerosis complex. *The Journal of urology*. 2004;171(1):102-5.

97. Sooriakumaran P, Gibbs P, Coughlin G, Attard V, Elmslie F, Kingswood C, et al. Angiomyolipomata: challenges, solutions, and future prospects based on over 100 cases treated. *BJU international*. 2010;105(1):101-6.

98. Lane BR, Babineau DC, Poggio ED, Weight CJ, Larson BT, Gill IS, et al. Factors predicting renal functional outcome after partial nephrectomy. *The Journal of urology*. 2008;180(6):2363-9.

99. Qi J, Yu Y, Huang T, Bai Q, Kang J, Liang J, et al. Predictors of postoperative renal functional damage after nephron-sparing surgery. *World journal of surgical oncology*. 2013;11(1):216.

100. Mukkamala A, He C, Weizer AZ, Hafez KS, Miller DC, Montgomery JS, et al., editors. Long-term renal functional outcomes of minimally invasive partial nephrectomy for renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*; 2014: Elsevier.

101. Campbell S, Novick A, Streem S, Klein E, Licht M. Complications of nephron sparing surgery for renal tumors. *The Journal of urology*. 1994;151(5):1177-80.

102. Amaral AF, de Oliveira MR, Dias OM, Arimura FE, Freitas CSG, Acencio MMP, et al. Concentration of Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-D) and Its Correlation with Functional and Clinical Parameters in Patients with Lymphangioleiomyomatosis from a Brazilian Reference Center. *Lung*. 2019;197(2):139-46.

103. Hong CH, Tu HP, Lin JR, Lee CH. An estimation of the incidence of tuberous sclerosis complex in a nationwide retrospective cohort study (1997-2010). *Br J Dermatol*. 2016;174(6):1282-9.

104. Washecka R, Hanna M. Malignant renal tumors in tuberous sclerosis. *Urology*. 1991;37(4):340-3.

105. Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski DJ, Henske EP. Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *Am J Pathol*. 1996;149(4):1201-8.

106. Vos N, Oyen R. Renal Angiomyolipoma: The Good, the Bad, and the Ugly. *J Belg Soc Radiol*. 2018;102(1):41.

107. Kiefer RM, Stavropoulos SW. The Role of Interventional Radiology Techniques in the Management of Renal Angiomyolipomas. *Curr Urol Rep*. 2017;18(5):36.

108. Sahni VA, Silverman SG. Biopsy of renal masses: when and why. *Cancer Imaging*. 2009;9:44-55.
109. Patel U, Simpson E, Kingswood JC, Saggar-Malik AK. Tuberose sclerosis complex: analysis of growth rates aids differentiation of renal cell carcinoma from atypical or minimal-fat-containing angiomyolipoma. *Clin Radiol*. 2005;60(6):665-73; discussion 3-4.
110. Kingswood JC, d'Augères GB, Belousova E, Ferreira JC, Carter T, Castellana R, et al. TuberOus SCLerosis registry to increase disease Awareness (TOSCA) - baseline data on 2093 patients. *Orphanet J Rare Dis*. 2017;12(1):2.
111. Lee JD, Chang HC, Chu SH, Hsueh S, Soong YK. Massive retroperitoneal hemorrhage from spontaneous rupture of a renal angiomyolipoma during pregnancy. A case report. *J Reprod Med*. 1994;39(6):477-80.
112. Clarke A, Hancock E, Kingswood C, Osborne JP. End-stage renal failure in adults with the tuberous sclerosis complex. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(4):988-91.
113. Torres VE, King BF, Holley KE, Blute ML, Gomez MR. The kidney in the tuberous sclerosis complex. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 1994;23:43-70.
114. Bissler JJ, Christopher Kingswood J. Renal manifestation of tuberous sclerosis complex. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2018;178(3):338-47.
115. Schillinger F, Montagnac R. [Renal lesions in tuberous sclerosis]. *Nephrol Ther*. 2006;2 Suppl 2:S123-6.
116. Torres VE, Zincke H, King BK, Bjornsson J. Renal manifestations of tuberous sclerosis complex. *Contrib Nephrol*. 1997;122:64-75.
117. Ruud Bosch JLH, Vekeman F, Duh MS, Neary M, Magestro M, Fortier J, et al. Factors associated with the number and size of renal angiomyolipomas in sporadic angiomyolipoma (sAML): a study of adult patients with sAML managed in a Dutch tertiary referral center. *Int Urol Nephrol*. 2018;50(3):459-67.
118. Sun P, Liu J, Charles H, Hulbert J, Bissler J. Outcomes of angioembolization and nephrectomy for renal angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex: a real-world US national study. *Curr Med Res Opin*. 2017;33(5):821-7.
119. Forbes CM, Rendon RA, Finelli A, Kapoor A, Moore RB, Breau RH, et al. Disease progression and kidney function after partial vs. radical nephrectomy for T1 renal cancer. *Urol Oncol*. 2016;34(11):486.e17-.e23.
120. Mir MC, Derweesh I, Porpiglia F, Zargar H, Mottrie A, Autorino R. Partial Nephrectomy Versus Radical Nephrectomy for Clinical T1b and T2 Renal Tumors: A Systematic Review and Meta-analysis of Comparative Studies. *Eur Urol*. 2017;71(4):606-17.
121. Scosyrev E, Messing EM, Sylvester R, Campbell S, Van Poppel H. Renal function after nephron-sparing surgery versus radical nephrectomy: results from EORTC randomized trial 30904. *Eur Urol*. 2014;65(2):372-7.
122. McKiernan J, Simmons R, Katz J, Russo P. Natural history of chronic renal insufficiency after partial and radical nephrectomy. *Urology*. 2002;59(6):816-20.
123. Delanaye P, Weekers L, Dubois BE, Cavalier E, Detry O, Squifflet JP, et al. Outcome of the living kidney donor. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(1):41-50.

124. Inoue M, Fujii Y, Yokoyama M, Saito K, Numao N, Kihara K. Progression of hypertension after partial nephrectomy in patients with renal tumors: A preliminary report. *Int J Urol*. 2015;22(8):797-8.
125. Hutchinson R, Singla N, Krabbe LM, Woldu S, Chen G, Rew C, et al. Increased use of antihypertensive medications after partial nephrectomy vs. radical nephrectomy. *Urol Oncol*. 2017;35(11):660.e17-.e25.
126. Lawrentschuk N, Trottier G, Mayo K, Rendon RA. Effects of partial nephrectomy on postoperative blood pressure. *Korean J Urol*. 2012;53(3):154-8.
127. Shah PH, Leibovich BC, Van Houten H, Lyon TD, Yao X, Knoedler M, et al. Association of Partial versus Radical Nephrectomy with Subsequent Hypertension Risk Following Renal Tumor Resection. *J Urol*. 2019;202(1):69-75.
128. Judd E, Calhoun DA. Management of hypertension in CKD: beyond the guidelines. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2015;22(2):116-22.
129. Kiczek M, Udayasankar U. Page Kidney. *J Urol*. 2015;194(4):1109-10.
130. Taverner D, Bing RF, Swales JD, Thurston H. Hypertension produced by chemical renal medullectomy or partial nephrectomy in the rat: comparison of renal function and plasma volume. *J Hypertens Suppl*. 1984;2(3):S367-9.
131. Supowit SC, Katki KA, Hein TW, Gupta P, Kuo L, Dickerson IM, et al. Vascular reactivity to calcitonin gene-related peptide is enhanced in subtotal nephrectomy-salt induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(3):H683-8.
132. Zargar H, Aning J, Legiehn G, Black P. Renovascular hypertension after laparoscopic partial nephrectomy. *J Urol*. 2014;191(5):1418-20.
133. Goel RK, Hickey LT, Rendon RA. Malignant hypertension due to renal artery stenosis after open partial nephrectomy in a solitary kidney. *Urology*. 2007;69(2):385.e5-7.
134. Hatano T, Atsuta M, Inaba H, Endo K, Egawa S. Effect of everolimus treatment for renal angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex: an evaluation based on tumor density. *Int J Clin Oncol*. 2018;23(3):547-52.
135. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22(2):159-68.
136. Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR. mTORC1 drives HIF-1 α and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene*. 2015;34(17):2239-50.

ANEXO I.

Lung, 2019 Apr;197(2):139-146. doi: 10.1007/s00408-018-00191-3. Epub 2019 Jan 8.

Concentration of Serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-D) and Its Correlation with Functional and Clinical Parameters in Patients with Lymphangioleiomyomatosis from a Brazilian Reference Center.

Amaral AE¹, de Oliveira MR¹, Dias OM¹, Arimura FE¹, Freitas CSG¹, Acencio MMP¹, de Alvarenga VA¹, Kairalla RA¹, Carvalho CRR¹, Baldi BG²; Tuberous Sclerosis, Lymphangioleiomyomatosis and Angiomyolipoma Study Group, Universidade de São Paulo, Brazil.

Collaborators (9)

Balbo BEP, Watanabe EH, Samorano LP, Onuchic LF, da Matta Rivitti-Machado MC, de Manreza MLG, Cordeiro MD, Takahashi P, de Oliveira ZNP.

Author information

Abstract

INTRODUCTION: Serum vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) is a lymphangiogenic growth factor that is considered a valuable tool in the diagnosis of lymphangioleiomyomatosis (LAM). Previous studies have reported a wide variability in VEGF-D serum levels in LAM patients and it seems to be associated with pulmonary impairment and lymphatic involvement.

METHODS: We conducted a cross-sectional study from 2009 to 2017 that evaluated VEGF-D serum levels in a cohort of LAM patients who were never treated with mTOR inhibitors and compared them to healthy age-matched volunteers. Clinical and functional parameters were assessed and correlated with their respective serum VEGF-D levels.

RESULTS: One hundred and four patients were included in the analysis. Serum VEGF-D levels were higher in LAM patients compared to healthy controls: 796 (404-1588) versus 162 (117-232) pg/mL, respectively ($p < 0.001$). Patients with tuberous sclerosis complex-LAM, TSC-LAM (20%), had higher levels of VEGF-D when compared to patients with sporadic LAM (80%) [1005 (641-2732) vs. 772 (370-1383), $p = 0.05$]. Serum VEGF-D levels were weakly correlated with DL_{CO} ($r = -0.26$, $p = 0.001$) and lymphatic involvement was more frequent in those with serum VEGF-D levels equal or above 800 pg/mL (35% vs. 13%, $p = 0.02$).

CONCLUSIONS: In LAM, serum VEGF-D is weakly associated with lung function impairment and strongly associated with lymphatic involvement. VEGF-D is validated for use in Brazilian patients with LAM whose characteristics must be accounted for when evaluating their serum VEGF-D levels.

KEYWORDS: Interstitial lung disease; Lymphangioleiomyomatosis; Pulmonary function tests; Vascular endothelial growth factor

PMID: 30623243 DOI: 10.1007/s00408-018-00191-3

[Indexed for MEDLINE]

\\

ANEXO II.

Artigo publicado na revista “Urology”

Giant Renal Angiomyolipoma Following Ovarian Stimulation Therapy

Elieser H. Watanabe, MD, Precil D. Neves, MD, Bruno E. Balbo, MD, PhD, Carlos A.Sampaio, MD, Luiz F. Onuchic, MD, PhD.

Department of Medicine. Divisions of Nephrology and Molecular Medicine.

University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.urology.2017.10.039>

Accepted Manuscript

Title: Giant Renal Angiomyolipoma Following Ovarian Stimulation Therapy

Author: Elieser H. Watanabe, Precil D. Neves, Bruno E. Balbo, Carlos A. Sampaio, Luiz F. Onuchic

PII: S0090-4295(17)31182-2

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.urology.2017.10.039>

Reference: URL 20740

To appear in: *Urology*

Received date: 25-7-2017

Accepted date: 28-10-2017

Please cite this article as: Elieser H. Watanabe, Precil D. Neves, Bruno E. Balbo, Carlos A. Sampaio, Luiz F. Onuchic, Giant Renal Angiomyolipoma Following Ovarian Stimulation Therapy, *Urology* (2017), <https://doi.org/10.1016/j.urology.2017.10.039>.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Giant Renal Angiomyolipoma Following Ovarian Stimulation Therapy

Elieser H. Watanabe, MD, Precil D. Neves, MD, Bruno E. Balbo, MD, PhD, Carlos A. Sampaio, MD, Luiz F. Onuchic, MD, PhD.

Department of Medicine. Divisions of Nephrology and Molecular Medicine.
University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

Word count of abstract: 100

Word count of manuscript: 220

Key-words: **angiomyolipomas; computed tomography; estrogens;**
lymphangiomyomatosis; ovarian stimulation;

CORRESPONDING AUTHOR:

Luiz F. Onuchic, MD, PhD

Department of Medicine. Divisions of Nephrology and Molecular Medicine

University of São Paulo School of Medicine

Avenida Doutor Arnaldo, 455 – Sala 4304, São Paulo, SP, 01246-903, Brazil

Fax: 55-11-3061-8361

E-mail: lonuchic@usp.br

ABSTRACT

Renal angiomyolipomas (AML) are benign tumors with higher prevalence in women. Female hormones have been shown to induce AML enlargement. This case refers to a 40-year-old woman with four left kidney AMLs, the larger ones with 1.0 and 1.3 cm. Ten months after ovarian stimulation for egg harvesting, a computed tomography revealed an 18-cm AML with large-caliber vessels. Given her high risk of AML bleeding, the patient was submitted to selective arterial embolization, which turned out unsuccessful, supporting a plan of nephron-sparing surgery. Our case highlights the pro-growth effects of female hormones on AML, with particular emphasis to ovarian stimulation.

MANUSCRIPT

Angiomyolipomas (AMLs) are tumors composed by blood vessel, smooth muscle and fat cells^{1,2} that predominate in women and are sensitive to female hormones.^{3,4} Previous case reports described AML growth associated with pregnancy^{5,6} and estradiol administration.⁷ A 40-year-old woman under ultrasonographic monitoring for four left-kidney AMLs displayed the largest tumor as a 1.0-cm lesion in September/2013 and 1.3-cm in May/2014 (Figure 1). In August/2014 she was submitted to ovarian stimulation for egg harvesting with letrozol, follitropin- α , lutotropin- α , ganirelix, and coriogonadotropin- α . In March/2015, a contrast-enhanced computed tomography revealed 8.7 and 18-cm renal AMLs with large-caliber intratumoral vessels and smaller, scattered tumors (Figure 2). She was also diagnosed with pulmonary lymphangioleiomyomatosis, with negative screening for tuberous sclerosis complex. Her renal function was normal and no additional risk factor for AML growth was identified. She underwent selective arterial embolization but the lack of lesion regression supported nephron-sparing surgery, a procedure not yet performed due to pulmonary complications. Nuclear expression of estrogen receptor beta is detected in virtually all human AMLs^{4,8} while estrogen receptor alpha in a portion of them. Estrogen-induced exacerbation of AMLs activates Akt, confirming the involvement of mTOR pathway dysfunction in its pathogenesis.⁸ This case suggests that high estrogen levels induced by ovarian stimulation may constitute a major risk for AML enlargement, cautioning or contraindicating this approach in patients with such tumors.

REFERENCES

1. Colombat M, Boccon-Gibod L and Carton S. An unusual renal angiomyolipoma with morphological lymphangioleiomyomatosis features and coexpression of oestrogen and progesterone receptors. *Virchows Arch.* 2002;440:102–104.
2. Boorjian SA, Sheinin Y, Crispen PL, et al. Hormone Receptor Expression in Renal Angiomyolipoma: Clinicopathologic Correlation. *Urology.* 2008;72(4):927-932.
3. Logginidou H, Ao X, Russo I, et al. Frequent estrogen and progesterone receptor immunoreactivity in renal angiomyolipomas from women with pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Chest.* 2000;117:25-30.
4. Cho NH, Shim HS, Choi YD, et al. Estrogen receptor is significantly associated with the epithelioid variants of renal angiomyolipoma: A clinicopathological and immunohistochemical study of 67 cases. *Pathology International* 2004;54:510–515.
5. Lee JD, Chang HC, Chu SH, et al. Massive retroperitoneal hemorrhage from spontaneous rupture of a renal angiomyolipoma during pregnancy. A case report. *J Reprod Med.* 1994;39:477-480.
6. Gallagher JC, Gallagher DJ. Renal hamartoma (angiomyolipoma) with spontaneous rupture during pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1978;52:481-483.
7. Gould Rothberg BE, Grooms MC, Dharmidharka VR. Rapid growth of a kidney angiomyolipoma after initiation of oral contraceptive therapy. *Obstet Gynecol.* 2006;108:734-736.
8. Clements D, Asprey SL, McCulloch TA, et al. Analysis of the oestrogen response in an angiomyolipoma derived xenograft model. *Endocrine-Related Cancer.* 2009;16:59–72.

Figure 1. Renal ultrasonography evidenced 1.0 and 1.3-cm nodules consistent with angiomyolipomas. (yellow arrows)

Figure 2. Abdomen angiotomography depicted a giant left kidney angiomyolipoma with large-caliber intratumoral vessels (yellow arrows).

Accepted Manuscript

Figure1_bestsetConverted.png

Figure2_bestsetConverted.png

Accepted Manuscript

ANEXO III

Artigo submetido à revista “Cancer Medicine” em 07/02/2020

Manuscript ID: CAM4-2020-02-0465

Cancer Medicine

Open Access

The Reducing Effect of Sirolimus on Angiomyolipoma is Determined by Decrease of Its Fat-Poor Compartments and Is Associated with Striking Reduction of Vascular Structures

Journal:	Cancer Medicine
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Research
Search Terms:	urological oncology
Abstract:	<p>Background: Renal angiomyolipomas hemorrhage is strongly associated with their size and vascular constitution. Since previous studies showed that mTOR inhibitors can differentially act in distinct cell lines, we analyzed the effects of sirolimus on the volume of different components of angiomyolipomas in patients with tuberous sclerosis complex, including vascular structures.</p> <p>Methods: We retrospectively analyzed 23 angiomyolipomas from 10 patients treated with sirolimus. An approach based on a Hounsfield-unit threshold was used to classify angiomyolipomas in fat-rich, fat-poor and intermediate-fat tumors, as well as to categorize tumor compartments in fat rich, fat poor, intermediate fat and highly vascularized. Measurement of diameter variations was employed to assess the effects on aneurysmatic/ectatic vascular formations.</p> <p>Results: Volume reduction following treatment with sirolimus was higher in fat-poor than fat-rich angiomyolipomas. Tumor reduction was mainly determined by decrease of the fat-poor and highly-vascularized compartments, with a lesser contribution of the intermediate-fat component, while the volume of the fat-rich compartment increased. Massive reduction of aneurysmatic/ectatic vascular structures was observed, with disappearance of such lesions in most cases.</p> <p>Conclusions: Our study showed that sirolimus reduces the size of angiomyolipomas by decreasing primarily their highly-vascularized and fat-poor compartments. This effect is associated with a remarkable reduction of tumoral aneurysms/ectatic vessels and other vascular structures. Our findings revealed, therefore, the likely mechanism responsible for the reported risk-decreasing effect of mTOR inhibitors on angiomyolipoma bleeding. Our findings also expand the understanding the biology of this tumor, supporting a role for mTOR in maintenance, and maybe assembling, of blood vessels in angiomyolipomas.</p>

The Reducing Effect of Sirolimus on Angiomyolipoma is Determined by Decrease of Its Fat-Poor Compartments and Is Associated with Striking Reduction of Vascular Structures

Running title: Sirolimus and angiomyolipoma reduction

Abstract

Background: Renal angiomyolipomas hemorrhage is strongly associated with their size and vascular constitution. Since previous studies showed that mTOR inhibitors can differentially act in distinct cell lines, we analyzed the effects of sirolimus on the volume of different components of angiomyolipomas in patients with tuberous sclerosis complex, including vascular structures.

Methods: We retrospectively analyzed 23 angiomyolipomas from 10 patients treated with sirolimus. An approach based on a Hounsfield-unit threshold was used to classify angiomyolipomas in fat-rich, fat-poor and intermediate-fat tumors, and to categorize tumor compartments in fat rich, fat poor, intermediate fat and highly vascularized. Diameter variations were measured to assess the effects on aneurysmatic/ectatic vascular formations.

Results: Volume reduction following treatment with sirolimus was higher in fat-poor than fat-rich angiomyolipomas. Tumor reduction was mainly determined by decrease of the fat-poor and highly-vascularized compartments, with a lesser contribution of the intermediate-fat component, while the volume of the fat-rich compartment increased. Broad liposubstitution was observed in some tumors. Massive reduction of aneurysmatic/ectatic vascular structures was observed, with disappearance of such lesions in most cases.

Conclusions: Our study showed that sirolimus reduces the size of angiomyolipomas by decreasing primarily their highly-vascularized and fat-poor compartments. This effect is associated with a remarkable reduction of tumoral aneurysms/ectatic vessels and other vascular structures. Our findings revealed, therefore, the likely mechanism responsible for the reported risk-decreasing effect of mTOR inhibitors on angiomyolipoma bleeding. Our findings also expand the understanding the biology of this tumor, supporting a role for mTOR in maintenance, and maybe assembling, of blood vessels in angiomyolipomas.

Keywords: Aneurysm, Angiomyolipoma, Hemorrhage, Sirolimus, Tuberous sclerosis.

Introduction

Renal angiomyolipomas (AMLs) are neoplasms originated from the perivascular epithelium, containing adipocyte-like, muscle-like and epithelioid cells as well as dysmorphic blood vessels.^{1, 2} AMLs affect up to 2.2% of general adult population³ and are usually sporadic, however approximately 10% of the cases are associated with tuberous sclerosis complex (TSC).⁴ TSC is characterized by the development of neoplasm in various organs and tissues, particularly skin, central nervous system, kidneys, lungs and heart.^{5, 6} Notably, AMLs have been reported in 49-60% of TSC patients evaluated by renal imaging.^{7, 8} Renal AMLs have also been associated with pulmonary lymphangioleiomyomatosis (LAM) both in the scope of TSC and in sporadic cases.^{9, 10} Interestingly, LAM affects almost exclusively females, is present in ~30% of the TSC patients, and 47-60% of its sporadic cases develop AMLs.^{11, 12}

Although small AMLs rarely cause relevant complications or symptoms, larger tumors may compress adjacent structures and lead to abdominal discomfort or pain.^{4, 13, 14} AML-related complications also include kidney impingement, vena cava and retroperitoneal infiltration, and hemorrhage secondary to aneurysm rupture, a potentially lethal event.^{4, 14-18}

Sporadic and TSC-associated AMLs share a common molecular pathogenetic mechanism, characterized by loss of suppression of mammalian (mechanistic) target of rapamycin (mTOR).^{19, 20} This signaling pathway promotes protein synthesis, cell hypertrophy and proliferation.^{19, 21} Its inappropriate hyperactivation, therefore, favors tumor development and growth. Based on this mechanism, clinical trials with mTOR

inhibitors (mTORi) were carried out, showing striking reduction of AML size in a safe setting.²²⁻²⁶

The effects of mTORi on the different AML components, however, are not well characterized. A recent study reported a heterogeneous volume-reducing effect of the mTORi everolimus on AMLs. A more efficient reduction was observed in fat-poor tumors²⁷, however, the effects on the different tumor compartments have not been assessed. Since hemorrhage is strongly associated with tumor vascularization and presence of intra-tumoral aneurysms larger than 0.5 cm^{28, 29}, the response of this compartment to mTORis is critical to understand the role of mTOR in AML vascular structure. Moreover, given that bleeding is the most relevant clinical aspect associated with AMLs, it is essential to evaluate the effect of these drugs on the patient's bleeding risk. In this study we unraveled different effects of sirolimus on the distinct AML compartments as well as its remarkable reduction effect on the vascular tumor component.

Materials and Methods

Study Population and Radiologic Analyses

We retrospectively identified nine patients followed at the University XXXX between April/2010 and March/2018 treated with sirolimus for at least three months due to large AMLs. All patients were submitted to computed tomography scan (CT) prior and after the mentioned period of sirolimus therapy and had pre- and post-contrast imaging.

In non-contrasted sequences we classified the lesions in three categories based on the average tumor attenuation, expressed in Hounsfield units (HU): fat-rich (<-30 HU; FRT), intermediate-fat (≥ -30 and ≤ 30 HU; IFT) and fat-poor (>30 HU; FPT). All patients were screened for FRT, IFT and FPT, having one representative lesion of each profile been selected for analysis whenever identified. Total volume response to sirolimus was quantified for all included tumors. This evaluation was followed by corticomedullary-phase analysis, which allowed the measurement of such a response in specific AML compartments.

The pixel distribution associated with each tumor was initially plotted according to their attenuation pattern, giving rise a specific histogram (Figure S1). Pixel densities below -30 HU corresponded to fat-rich compartments (FRC), densities ≥ -30 and <30 HU were associated with intermediate-fat compartments (IFC), attenuation ≥ 30 and <100 HU indicated a fat-poor compartment (FPC), and pixel densities ≥ 100 HU identified highly-vascularized compartments (HVC). This approach allowed the quantification of volume response to sirolimus for each of the AML compartments, characterizing its potentially differential effects upon each of the tumor components. To improve the assessment of sirolimus actions on the AML vascular structures, each of the analyzed tumors had the diameter of its largest aneurysmatic/ectatic vessel determined following the CT corticomedullary-phase.

Statistical Analyses

Data on continuous variables were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Since this analysis revealed non-parametric distributions, these data are presented as median and 25 and 75 percentiles. Categorical data are expressed as absolute values

and percentages. Non-parametric data were compared using the Mann-Whitney U test for two independent samples or the Wilcoxon test for two-time measures. Non-parametric data associated with multiple groups were compared using the Kruskal-Wallis test, while multiple comparisons were corrected applying the Bonferroni method.

Given the limited number of cases, multivariable analyses for binary endpoints were performed using logistic regression with Firth's penalization³⁰. Statistical significance was considered for asymptotic $P < 0.05$. The analyses were performed using SPSS 24.0, GraphPad Prism 8.0 and Stata 16.0.

Results

Baseline Patient and Angiomyolipoma Features

We selected 10 patients that fulfilled all inclusion criteria. Twenty-three AMLs from these patients were selected for analyses, since in seven cases one of the AML fat profiles was not identified. The mean AML pre-treatment size was 4.5 cm (2.3-5.1). The baseline features of analyzed patients and respective tumors are depicted in Table 1.

Sirolimus Reduces Tumor Volume More Effectively in Fat-Poor AMLs

As expected, sirolimus effectively reduced tumor volume, leading to a median AML volume reduction of -52.3% (-68.7- -12.2) (Figure 1). The tumoral volume response, however, was heterogeneous among the different tumor fat profiles. FRTs presented

milder responses to sirolimus than FPT [-12.2% (-27.1-38.6) *versus* -65.5% (-74.3- -61.1), $P=0.014$] (Figure 2). IFTs, in turn, displayed a volume decrease of -45.2% (-58.0- -6.2), a value not significantly different from the FRT and FPT groups (Figure 1).

AML Fat Poorness Predicts a Better Response to Sirolimus

Using the Firth's logistic regression for an at-least-50% response of volume reduction, we evaluated fat profile, gender, age, serum sirolimus level, treatment length and tumor size at baseline as potential predictors of volume response to sirolimus. This analysis identified the FPT pattern as the sole predictor of an at-least-50% decrease in tumor volume following this treatment (Table 2).

Sirolimus Induces Massive Reduction of AML Vascular Structures and Is Essentially Not Effective in the Fat-Rich Compartment

Volume analyses of the different AML compartments following sirolimus revealed that all components, except for FRC, responded to treatment with significant volume reduction (Figure 3 and 4). Notably, HVC presented a remarkable volume decrease following this therapy [0.9 cm^3 (0.1-33.2) *versus* 0.10 cm^3 (0.0-2.3), $P=0.002$] (Figure 5a), an effect that represented a 90.0% (80.7-98.5) volume reduction among the evaluated AMLs (Figure 3). The variations in ectatic vessel/aneurysm size were consistent with this finding, revealing disappearance or massive reduction in most of the assessed vascular lesions [2.0 cm (1.0-4.5) *versus* 0.0 cm (0.0-1.0), $P<0.001$] (Figure 6 and 7).

As expected based on the robust response of fat-poor AMLs to sirolimus, FPC presented massive volume reduction following this treatment [2.5 cm^3 (0.3-19.0) to 0.5 cm^3 (0.1-8.6), $P=0.002$] (Figure 5b), a response of 77.8% (25.0-91.9) volume decrease among the tumors (Figure 3). The AML compartment with attenuation of 30 HU or more was, in fact, responsible for 76.7% (25.6-100.0) of total tumor reduction.

Surprisingly, FRC volume not only did not decrease in response to sirolimus but also substantially increased in most cases. FRC volume, in fact, grew from 1.4 cm^3 (0.25-7.8) to 2.6 cm^3 (0.5-18.2) following this treatment, $P=0.012$ (Figure 5c), an effect reflected in a 105.9% growth (21.7-256.6) (Figure 3).

Consistently with the aforementioned findings, IFC volume responded to treatment with sirolimus with an intermediate behavior between FRC and FPC. Indeed, the IFC volume decreased from 2.5 cm^3 (0.8-10.0) to 1.5 cm^3 (0.3-4.9) after the mentioned therapy, $P=0.014$ (Figure 5d), a response also expressed as 61.5% (-11.7-75.0) volume reduction among the analyzed AMLs (Figure 3). It must be noted, however, that the IFC volume change was significantly different from the FRC one but did not significantly differ from the FPC volume variation (Figure 3).

As a result of these differential effects of sirolimus on the AML compartments, this treatment leads to critical tumor structural changes. Within the scope of visible transformations of the tumor fat profile, some FPTs respond to sirolimus becoming FRTs (Figure 8).

Discussion

Renal complications constitute the main cause of death among TSC patients.³¹⁻³³ A significant portion of such complications include AML hemorrhage. Although end-stage renal disease is reported at low rates in TSC patients^{34, 35}, the studied populations are usually young. Notably, up to 40% of the TSC patients develop chronic kidney disease (CKD), exhibiting an estimated glomerular filtration rate equivalent to 30-year-old subjects from the general population.³⁶ While the pathogenesis of TSC-associated CKD remains not completely understood, several factors are known to contribute to renal function decline, including tumor bleeding, tumor encroaching to normal surrounding renal tissue, renal cystic involvement, focal and segmental glomerulosclerosis and tubulointerstitial disease. A molecular mechanism involving *TSC1* or *TSC2* loss of function in renal parenchyma has also been proposed to play a role in reducing glomerular filtration rate.^{2, 37} Invasive interventions to prevent tumor hemorrhage, moreover, including partial nephrectomy and selective arterial embolization, can also impact on early loss of renal function as a consequence of loss of functional renal tissue.³² It should be noted that these invasive procedures are not uncommon in clinical practice^{32, 36}, given the potential lethality associated with AML hemorrhage. A recent databank study reported that 24.2% of TSC patients had at least one invasive kidney intervention.³⁸ Because TSC patients usually present multiple AMLs, and the incidence increases with age, such interventions usually cannot treat all lesions. Invasive procedures, therefore, are often repeated along life, leading to increased risk of CKD.³²

In response to this scenario, clinical studies have shown efficacy of mTORi in reducing AML volume, supporting these drugs as first-line therapy of asymptomatic AMLs larger than 3 cm in TSC patients.³⁷ Such studies, however, had the primary end-point focused on tumor size reduction, not addressing whether the verified AML shrinkage lowers the bleeding rate and preserves renal function. Interestingly, however, no event of AML bleeding was reported in the extension of the phase 3 study “Everolimus for renal angiomyolipoma in patients with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangioleiomyomatosis (EXIST-2)”³⁹, a trial that followed 112 patients treated with everolimus for a median period of 28.9 weeks. This finding suggests a bleeding protective role of mTORi.

Despite the recognition of this effect of mTORi on AML volume, the response to these drugs has been shown to significantly vary among such tumors.³⁹ In addition, AMLs are neoplasms histologically complex, with components derived from at least three distinct cellular phenotypes. Based on these two observations, we raised the hypothesis that mTORis might have different effects on distinct tumor components and compartments, and investigated this possibility in AMLs with different constitutions from a series of TSC patients. Of note, the elucidation of this effect might not only clarify a complex biological problem but also bring novel, important information to the clinical scenario. Clinical benefits could potentially include the development of predictors for AML response to mTORi as well as risk modifications associated with disease complications.

As expected, AMLs responded to sirolimus with volume reduction, a response that significantly varied among the tumors. Interestingly, our CT analyses revealed differential effects of sirolimus on AMLs with distinct proportions of fat. Fat-poor

AMLs displayed a dramatic volume reduction response to sirolimus while such an effect was much milder in fat-rich tumors. In consistency with these findings, intermediate-fat AMLs presented an intermediate volume decrease behavior between fat-poor and fat-rich tumors. An important clinical derivative of this analysis was the finding that in AMLs fat poorness predicts a more effective response to sirolimus.

Our findings also revealed that the differential effect of sirolimus on AMLs is essentially based on differential effects on specific tumor compartments. Our data showed a primary reduction of the fat-poor portions of the tumors. Interestingly, the profound effect of sirolimus on the FPCs and HVCs promoted the transformation of some FPTs into FRTs, a finding not yet reported. The liposubstitution observed in such AMLs represents, in fact, the most striking translation of the remarkable differential actions of mTORi in the different AML compartments. Our findings also unraveled a dramatic decrease of vascular aneurysmatic formations. In line with this concept, the volume of the AML fat-rich compartment did not decrease, but instead increased, in response to treatment. Our findings of massive reduction of the vascular tumor components in response to sirolimus, in turn, suggest that this treatment is likely protective against AML bleeding.

Our data are in line with previous observations that *in vitro* effects of sirolimus differ among distinct cell lineages⁴⁰ and TSC patients display high levels of the pro-angiogenic molecules VEGF-A and VEGF-D (vascular epithelial growth factors A and D).⁴¹ mTOR inhibitors, therefore, could differentially act in the different components of AML, with particularly high efficiency on vascular formations. mTOR complex 1 (mTORC1), in fact, is known to drive HIF-1 α and VEGF-A signaling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3, an

angiogenic process potentially attenuated by sirolimus.⁴² Interestingly, this mechanism is associated with acceleration of endothelial senescence.⁴³ It is possible, therefore, that the molecular basis of the differential mTORi effects on the AML compartments is based on VEGF downregulation induced by sirolimus through inhibition of mTORC1.⁴⁴ Reduction of VEGF-D circulating levels was also reported in patients receiving rapamicyn.²⁴ The remarkable reduction of AML vascular components shown in our study suggests that mTOR activity is fundamental to the maintenance of such structures in AMLs. Moreover, since aneurysms are the main determinant for tumor hemorrhage²⁸, the inhibition of maintenance and development of aneurysmatic/ectatic formations induced by mTORi is the likely mechanism responsible for the reduction of bleeding occurrence observed in the EXIST-2 study and its extension.^{22, 39}

Our findings suggest, therefore, that image analysis of AML compartments is likely helpful to predict tumor response to mTORi. Our data revealed, moreover, that treatment with sirolimus not only reduces the tumor size but selectively acts on components associated with more often and more severe clinical complications, such as AML bleeding. Our results provide additional support to the recent recommendation of chronic treatment with mTORi of TSC individuals with AMLs > 3 cm, and suggest that the presence of large aneurysms/vascular formations should be an independent criterium to initiate this therapy.

References

1. Lienert AR, Nicol D. Renal angiomyolipoma. *BJU international*. 2012;110: 25-27.
2. Dixon BP, Hulbert JC, Bissler JJ. Tuberous sclerosis complex renal disease. *Nephron Exp Nephrol*. 2011;118: e15-20.
3. Rule AD, Sasiwimonphan K, Lieske JC, Keddiss MT, Torres VE, Vrtiska TJ. Characteristics of renal cystic and solid lesions based on contrast-enhanced computed tomography of potential kidney donors. *American Journal of Kidney Diseases*. 2012;59: 611-618.
4. Bissler JJ, Kingswood JC. Renal angiomyolipomata. *Kidney international*. 2004;66: 924-934.
5. Samuelli S, Abraham K, Dressler A, et al. Tuberous Sclerosis Complex: new criteria for diagnostic work-up and management. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2015: 1-12.
6. Leung AK, Robson WL. Tuberous sclerosis complex: a review. *J Pediatr Health Care*. 2007;21: 108-114.
7. Rakowski SK, Winterkorn EB, Paul E, Steele DJ, Halpern EF, Thiele EA. Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: Incidence, prognosis, and predictive factors. *Kidney Int*. 2006;70: 1777-1782.
8. Casper KA, Donnelly LF, Chen B, Bissler JJ. Tuberous Sclerosis Complex: Renal Imaging Findings 1. *Radiology*. 2002;225: 451-456.
9. McCormack FX. Lymphangioleiomyomatosis: a clinical update. *CHEST Journal*. 2008;133: 507-516.
10. Avila NA, Dwyer AJ, Rabel A, Moss J. Sporadic lymphangioleiomyomatosis and tuberous sclerosis complex with lymphangioleiomyomatosis: comparison of CT features. *Radiology*. 2007;242: 277-285.
11. Chu SC, Horiba K, Usuki J, et al. Comprehensive evaluation of 35 patients with lymphangioleiomyomatosis. *CHEST Journal*. 1999;115: 1041-1052.

12. Bernstein SM, Newell Jr JD, Adamczyk D, Mortenson RL, King Jr TE, Lynch DA. How common are renal angiomyolipomas in patients with pulmonary lymphangiomyomatosis? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995;152: 2138-2143.
13. Dickinson M, Ruckle H, Beagler M, Hadley H. Renal angiomyolipoma: optimal treatment based on size and symptoms. *Clinical nephrology*. 1998;49: 281-286.
14. Harabayashi T, Shinohara N, Katano H, Nonomura K, Shimizu T, Koyanagi T. Management of renal angiomyolipomas associated with tuberous sclerosis complex. *J Urol*. 2004;171: 102-105.
15. Kutcher R, Rosenblatt R, Mitsudo S, Goldman M, Kogan S. Renal angiomyolipoma with sonographic demonstration of extension into the inferior vena cava. *Radiology*. 1982;143: 755-756.
16. Camunez F, Lafuente J, Robledo R, et al. CT demonstration of extension of renal angiomyolipoma into the inferior vena cava in a patient with tuberous sclerosis. *Urologic radiology*. 1988;9: 152-154.
17. Fegan JE, Shah HR, Mukunyadzi P, Schutz MJ. Extrarenal retroperitoneal angiomyolipoma. *Southern medical journal*. 1997;90: 59-62.
18. Steiner MS, Goldman SM, Fishman EK, Marshall FF. The natural history of renal angiomyolipoma. *J Urol*. 1993;150: 1782-1786.
19. Kenerson H, Folpe AL, Takayama TK, Yeung RS. Activation of the mTOR pathway in sporadic angiomyolipomas and other perivascular epithelioid cell neoplasms. *Human pathology*. 2007;38: 1361-1371.
20. El-Hashemite N, Zhang H, Henske EP, Kwiatkowski DJ. Mutation in TSC2 and activation of mammalian target of rapamycin signalling pathway in renal angiomyolipoma. *Lancet*. 2003;361: 1348-1349.
21. Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet*. 2005;37: 19-24.

22. Bissler JJ, Kingswood JC, Radzikowska E, et al. Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangioleiomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2013;381: 817-824.
23. Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, et al. Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioleiomyomatosis. *New England Journal of Medicine*. 2008;358: 140-151.
24. Dabora SL, Franz DN, Ashwal S, et al. Multicenter phase 2 trial of sirolimus for tuberous sclerosis: kidney angiomyolipomas and other tumors regress and VEGF- D levels decrease. *PLoS One*. 2011;6: e23379.
25. Cabrera López C, Martí T, Catalá V, et al. Effects of rapamycin on angiomyolipomas in patients with tuberous sclerosis. *Nefrologia*. 2011;31: 292-298.
26. Davies DM, de Vries PJ, Johnson SR, et al. Sirolimus therapy for angiomyolipoma in tuberous sclerosis and sporadic lymphangioleiomyomatosis: a phase 2 trial. *Clin Cancer Res*. 2011;17: 4071-4081.
27. Hatano T, Atsuta M, Inaba H, Endo K, Egawa S. Effect of everolimus treatment for renal angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex: an evaluation based on tumor density. *Int J Clin Oncol*. 2018;23: 547-552.
28. Yamakado K, Tanaka N, Nakagawa T, Kobayashi S, Yanagawa M, Takeda K. Renal Angiomyolipoma: Relationships between Tumor Size, Aneurysm Formation, and Rupture 1. *Radiology*. 2002;225: 78-82.
29. Rimon U, Duvdevani M, Garniek A, et al. Large renal angiomyolipomas: digital subtraction angiographic grading and presentation with bleeding. *Clin Radiol*. 2006;61: 520-526.
30. Wang X. Firth logistic regression for rare variant association tests. *Front Genet*. 2014;5: 187.

31. Shepherd CW, GOMEZ MR, Lie J, CROWSON CS. Causes of death in patients with tuberous sclerosis. *Mayo Clinic Proceedings: Elsevier*, 1991;792-796.
32. Eijkemans MJ, van der Wal W, Reijnders LJ, et al. Long-term Follow-up Assessing Renal Angiomyolipoma Treatment Patterns, Morbidity, and Mortality: An Observational Study in Tuberous Sclerosis Complex Patients in the Netherlands. *Am J Kidney Dis*. 2015;66: 638-645.
33. Amin S, Lux A, Calder N, Laugharne M, Osborne J, O'callaghan F. Causes of mortality in individuals with tuberous sclerosis complex. *Dev Med Child Neurol*. 2017;59: 612-617.
34. Clarke A, Hancock E, Kingswood C, Osborne JP. End-stage renal failure in adults with the tuberous sclerosis complex. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14: 988-991.
35. Vekeman F, Magestro M, Karner P, et al. Kidney involvement in tuberous sclerosis complex: the impact on healthcare resource use and costs. *J Med Econ*. 2015;18: 1060-1070.
36. Kingswood JC, Bruzzi P, Curatolo P, et al. TOSCA - first international registry to address knowledge gaps in the natural history and management of tuberous sclerosis complex. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9: 182.
37. Kingswood JC, Bissler JJ, Budde K, et al. Review of the Tuberous Sclerosis Renal Guidelines from the 2012 Consensus Conference: Current Data and Future Study. *Nephron*. 2016;133.
38. Bissler J, Cappell K, Charles H, et al. Rates of interventional procedures in patients with tuberous sclerosis complex-related renal angiomyolipoma. *Curr Med Res Opin*. 2015;31: 1501-1507.
39. Bissler JJ, Kingswood JC, Radzikowska E, et al. Everolimus for renal angiomyolipoma in patients with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangioleiomyomatosis: extension of a randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31: 111-119.
40. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22: 159-168.

41. Siroky BJ, Yin H, Dixon BP, et al. Evidence for pericyte origin of TSC-associated renal angiomyolipomas and implications for angiotensin receptor inhibition therapy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;307: F560-570.
42. Dodd KM, Yang J, Shen MH, Sampson JR, Tee AR. mTORC1 drives HIF-1 α and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene.* 2015;34: 2239-2250.
43. Ota H, Eto M, Ako J, et al. Sirolimus and everolimus induce endothelial cellular senescence via sirtuin 1 down-regulation: therapeutic implication of cilostazol after drug-eluting stent implantation. *Journal of the American College of Cardiology.* 2009;53: 2298-2305.
44. Guba M, Von Breitenbuch P, Steinbauer M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature medicine.* 2002;8: 128-135.

Tables

Table1. Characterization of patients and angiomyolipomas

	N	Median (Percentiles 25-75%)
Patient age	10	34.8 (22.9- 51.6)
Sirolimus serum level (ng/mL)	7	8.1(7.6-9.6)
Time of treatment before CT (days)	23	258.0 (199.0-332.0)
Pre-treatment tumor size (mm)	23	40.0 (23.0-51.0)
Pre-treatment aneurysm diameter (mm)	17	2.0 (1.0-4.5)
FRT pre-treatment total volume (cm ³)	7	4.8 (2.4-23.4)
FRT pre-treatment size (mm)	7	25.0 (19.0-40.0)
IFT pre-treatment total volume (cm ³)	6	15.7 (2.4-260.7)
IFT pre-treatment size (mm)	6	40 (16.25-93.7)
FPT pre-treatment total volume (cm ³)	10	35.9 (20.0-167.8)
FPT pre-treatment size (mm)	10	45.0 (35.8-78.0)

CT: computed tomography; FPT: fat-poor tumor; FRT: fat-rich tumor, FP; IFT: intermediate-fat tumor.

Table 2. Firth's logistic regression for an at-least-50% tumor volume reduction

Variable	Odds Ratio	P	95% CI
AML fat profile			
FRT	1		
IFT	12.9	0.210	0.3-197.0
FPT	129.8	0.017	2.4-7039.3
Gender	1.1	0.975	0.0-52.6
Age	1.1	0.446	0.9-1.2
Sirolimus serum level	0.9	0.879	0.4-2.3
Treatment length	1.0	0.318	0.9-1.0
Tumor size at baseline	1.0	0.560	0.9-1.0
CI: confidence interval; FPT: fat poor tumor; FRT: fat rich tumor; IFT: intermediated fat tumor.			

Figure Legends

Figure 1. Total tumor volume pre- and post-treatment with sirolimus. Repeated measures were analyzed using the Wilcoxon test, whereas comparisons among tumor fat profiles were performed with the Kruskal-Wallis test. FPT: fat-poor tumor; FRT: fat-rich tumor; IFT: intermediate-fat tumor. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Figure 2. Response of renal AMLs to treatment with sirolimus. (a,b) Axial corticomedullary-phase CT images obtained before treatment show lobulated fat-poor AMLs in both kidneys (arrows) and a fat-rich AML arising from the lower pole of the left kidney (arrowhead). (c,d) Axial corticomedullary-phase CT images acquired after 7 months of treatment show significant volumetric reduction of the fat-poor AMLs (arrows) and nonsignificant change in the fat-rich AML (arrowhead).

Figure 3. Percent variation of total tumor volume and tumor compartment volume following treatment with sirolimus. Comparisons among groups were performed using the Kruskal-Wallis test. FPC: fat-poor compartment; FRC: fat-rich compartment; HVC: highly-vascularized compartment; IFC: intermediate-fat compartment. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 4. Change in AML volume and fat-containing pattern in response to sirolimus. (a) Pre-treatment axial corticomedullary-phase CT scan shows a right renal fat-poor AML (white arrow). (b) Post-treatment axial corticomedullary-phase CT image reveals tumor volume reduction (white arrow) while the fat component becomes visible (black arrow). Note that the AML total volume reduction (from 76.4

cm³ to 26.9 cm³) occurred due to diminishment of the fat-poor (from 60.1 cm³ to 13.0 cm³) and highly-vascularized (from 15.4 cm³ to 11.3 cm³) compartments.

Figure 5. Variation of tumor compartment volume - HVC (a), FPC (b), FRC(c) and IFC (d) - following treatment with sirolimus. HVC, FPC and IFC presented significant volume reduction while FRC displayed volume increase. FPC: fat-poor compartment; FRC: fat-rich compartment; HVC: highly-vascularized compartment; IFC: intermediate-fat compartment. * P<0.05, ** P<0.01.

Figure 6. Size variation of angiomyolipoma ectatic vessels/aneurysms in response to treatment with sirolimus. Comparisons were performed with the Wilcoxon test. *** P<0.001.

Figure 7. Response of intralesional vascular structures to sirolimus. Coronal nephrographic-phase CT images obtained (a) before the treatment and (b) after the treatment show disappearance of a left kidney large intralesional vascular structure and remarkable reduction of an intralesional aneurysm in response to treatment with sirolimus (arrows). An increase in the fat component is also seen (arrowhead).

Figure 8. Liposubstitution in angiomyolipoma in response to treatment with sirolimus. Coronal corticomedullary-phase CT images obtained (a) before treatment and (b) after treatment show the effect of sirolimus treatment on a fat-poor AML in the upper pole of the right kidney (white arrow), revealing the appearance of a fat-rich tumor (black arrow) in substitution to the previous fat-poor pattern.

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.

Figure 4.

Figure 5.

Figure 6.

Figure 7.

Figure 8.