Daniel Kanda Abe

**Análise da expressão dos genes CD105 (endogлина),
VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no carcinoma de células
renais e correlação com fatores prognósticos**

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

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Abe, Daniel Kanda

Análise da expressão dos genes CD105 (endoglin), VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no carcinoma de células renais e correlação com fatores prognósticos / Daniel Kanda Abe. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Urologia.

Orientador: Marcos Francisco Dall'Oglio.

Descritores: 1.Neoplasias renais 2.Angiogênese patológica 3.Marcadores biológicos 4.Prognóstico

USP/FM/DBD-196/13

*À minha esposa **Michele** pela ajuda e compreensão. Amiga e
companheira de todas as horas.*

*Aos meus **pais e irmãs** que entenderam estes momentos de ausência e pelo
incentivo constante à minha formação profissional.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Marcos Francisco Dall'Oglio**

Meu orientador, cujo exemplo de competência, empolgação e determinação me auxilia no desejo de seguir a carreira acadêmica. Pela orientação, apoio e confiança na realização deste trabalho, mas principalmente, pelos seus ensinamentos e exemplo de um grande mestre.

À Prof. Dra. **Kátia Ramos Moreira Leite**

Agradeço pelo cuidado especial em ensinar a maneira crítica pela qual a ciência deve ser encarada, pelo rigor na realização do nosso trabalho, pelo exemplo de dedicação à carreira acadêmica e pela excelência com que me auxiliou na condução deste projeto.

Ao Dr. **Alexandre Crippa Sant'Anna** pela amizade, oportunidades e exemplo de profissional de alta competência.

Ao Prof. Dr. **Miguel Srougi**, Chefe do serviço de Urologia, por sua liderança e incentivo à titulação.

Aos Drs. **Carlos Alberto Lenzi** e **Nelson Gaspar Dip Junior** amigos excepcionais que contribuem com meu dia-a-dia de urologista e que sem a ajuda dos mesmos teria sido muito difícil a conclusão desta tese.

Aos Drs. **Adriano João Nesrallah** e **Daher Cesar Chade** pela excelente recepção e incentivo.

Aos colegas **Endric Hasegawa** e **Emanoela Batista Feitosa** pela ajuda nos momentos certos.

Aos **médicos e colegas** do Laboratório de Investigação Médica **LIM-55** pelo auxílio e colaboração.

A Dra. **Sabrina Thalita dos Reis** uma profissional excelente, por ter me ensinado de forma competente e dedicada o dia-a-dia de um laboratório de investigação médica e me apoiado muito na realização desta tese.

Aos Membros da Banca de Qualificação: **Dr. Gustavo Cardoso Guimarães, Dr. Pierre Damião Gonçalves e Dr. José Roberto Colombo Junior** pelas correções e comentários muito importantes para a realização do texto final.

Ao **Grupo de pesquisa da Uro-Oncologia** e a **Rita de Cássia Ortega Borges** pela presteza e estímulo.

Aos **membros da Uro-Oncologia** do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: médicos, pós-graduandos, residentes e funcionários pela compreensão e apoio.

*“É muito melhor arriscar coisas grandiosas,
alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a
derrota, do que formar fila com os pobres de
espírito que nem gozam muito nem sofrem muito,
porque vivem nessa penumbra cinzenta que não
conhece vitória nem derrota”.*

Theodore Roosevelt

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações Gerais	2
1.2 Diagnóstico	2
1.3 Tratamento	6
1.4 Fatores Prognósticos	6
1.4.1 Sistema de Estadiamento TNM	6
1.4.2 Subtipos Histológicos	7
1.4.3 Grau nuclear de Fuhrman	9
1.4.4 Invasão Microvascular	10
1.4.5 Nomogramas	10
1.5 Biologia Molecular do Câncer Renal	11
1.6 Angiogênese e câncer	12
1.6.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e seus receptores	13
1.6.2 Endoglin	15
2 OBJETIVOS	19
2.1 Primário	20
2.2 Secundários	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Pacientes	23
3.2 Exame Macro e Microscópico	24
3.3 Processamento das Amostras	25
3.3.1 Extração do RNA	25
3.3.2 Síntese de cDNA	26
3.3.3 Amplificação do RNA	22
3.4 Análise dos Resultados	28

3.5 Análise Estatística	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 e estadiamento patológico (T)	33
4.2 Expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 e grau nuclear de Fuhrman	33
4.3 Expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 e invasão microvascular (IMV)	35
4.4 Expressão dos quatro genes em relação aos grupos prognósticos	35
4.5 Expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 e metástases	38
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	49
7 ANEXOS	51
8 REFERÊNCIAS	63
APÊNDICES	

Lista de Abreviaturas

CCR	- Carcinoma de Células Renais
VEGF	- Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR1	- Receptor 1 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR2	- Receptor 2 do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
CD 105	- Endoglina
TNM	- Classificação dos Tumores Malignos
qRT-PCR	- Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em Tempo Real
USG	- Ultrassonografia
RM	- Ressonância Magnética
TC	- Tomografia Computadorizada
VHL	- Von Hippel Lindau
IMV	- Invasão Microvascular
cDNA	- Ácido Desoxirribonucleico complementar
AJCC	- <i>American Joint Committee on Cancer</i> (Comitê da Junta Americana do Câncer)
V-CAM 1	- Molécula de Adesão Celular Vascular-1
TGF-β	- Fator de Crescimento Tumora Beta
UICC	- <i>Union for International Cancer Control</i> (União Internacional de Controle do Câncer)
LRP-2	- Proteína-2 Relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade
CBLN	- Fator Intrínseco de Receptores de Cobalamina
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade
PDGF	- Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PlGF	- Fator de Crescimento Placentário
MMP-9	- Metaloproteinase 9
MAP	- Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
FISH	- Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
PAI-1	- Inibidor de Plasminogênio Ativado 1
DMV	- Densidade Microvascular

Lista de Figuras

Figura 1 – Papel da Endoglina no endotélio vascular tumoral	18
Figura 2 – Síntese do DNA complementar	26
Figura 3 – Amplificação do RNA pelo método TaqMan®	26
Figura 4 – Metodologia resumida do estudo	29
Figura 5 – Expressão quantitativa dos genes CD 105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 nos 56 pacientes portadores de CCR	32
Figura 6 – Expressão quantitativa dos genes CD 105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no grupo de bom prognóstico	36
Figura 7 – Expressão quantitativa dos genes CD 105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no grupo de prognóstico intermediário	36
Figura 8 – Expressão quantitativa dos genes CD 105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no grupo de mau prognóstico	37

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparações das alterações no sistema TNM realizadas pela AJCC 2010	8
Tabela 2 – Demonstração dos genes e suas principais funções moleculares	14
Tabela 3 – Expressão de Endogлина (CD105) em tecidos humanos normais	16
Tabela 4 – Características demográficas dos grupos estudados.....	23
Tabela 5 – Dados demográficos dos pacientes com CCR e do grupo controle ...	24
Tabela 6 – <i>Primers</i> utilizados para quantificação da expressão dos genes CD-105, VEGF, VEGFR1 e 2 no câncer renal	27
Tabela 7 – Média de expressão dos quatro genes estudados.....	32
Tabela 8 – Expressão dos quatro genes de acordo com o estadiamento patológico	42
Tabela 9 – Expressão dos quatro genes de acordo com o grau de Fuhrman.....	34
Tabela 10 – Expressão dos quatro genes de acordo com a invasão microvascular	35
Tabela 11 – Comparação de expressão dos quatro genes estudados nos três grupos prognósticos	37
Tabela 12 – Expressão dos quatro genes em relação à presença ou ausência de metástase.....	38

RESUMO

Abe DK. *Análise da expressão dos genes CD105 (endogлина), VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no carcinoma de células renais e correlação com fatores prognósticos*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

INTRODUÇÃO: A angiogênese tem sido proposta como um marcador de prognóstico em uma variedade de tumores incluindo o renal. No avanço da compreensão da biologia molecular do carcinoma de células renais (CCR) os genes CD105 (endogлина), VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 são seletivamente expressos em células endoteliais vasculares sendo estudados como potenciais alvos terapêuticos. **OBJETIVOS:** Este estudo analisou a expressão destes quatro genes no tecido renal normal e CCR e suas correlações com os fatores prognósticos para a neoplasia. **MÉTODOS:** Os níveis de expressão de CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 foram analisados por Reação da Transcriptase Reversa em tempo real (qRT-PCR) em amostras de tumor fresco congelado coletados de 56 pacientes submetidos à nefrectomia parcial ou radical por CCR. Neste estudo foram avaliados os níveis de expressão dos genes em tecidos normais e tumorais e comparados com fatores prognósticos como tamanho tumoral ($>$ ou ≤ 7 cm), Grau de Fuhrman (1-2 e 3-4) e invasão microvascular (presente ou ausente). **RESULTADOS:** A análise dos quatro genes demonstrou que CD105 está subexpresso em 94,7% dos casos e a superexpressão de VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 ocorreu em 53,6%, 85,7% e 64,3% dos casos respectivamente. A expressão de endogлина foi significativamente maior em pacientes com doença metastática ($p=0,05$) em relação ao grupo sem metástases. Além disso, o gene do VEGFR2 foi associado com estadiamento T, apresentando uma média de expressão maior nos pacientes portadores de doença pT1-2 ($p=0,04$). **CONCLUSÕES:** Nossos experimentos demonstraram que a endogлина está subexpressa em carcinoma de células renais em relação com o tecido renal normal e a presença de níveis mais elevados está relacionada à doença metastática. Os genes VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 encontram-se superexpressos no CCR e uma maior expressão do gene VEGFR2 está relacionada com estadiamento T1 e T2.

Descritores: Neoplasias renais, Angiogênese patológica, Marcadores biológicos, Prognóstico.

SUMMARY

Abe DK. *Expression analysis of CD105 (endoglin), VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 in kidney cancer and relationship with prognostic factors* [thesis]. Sao Paulo: University of Sao Paulo Medical School; 2013.

INTRODUCTION: Angiogenesis has been proposed as a prognostic marker in a variety of human malignancies, including renal cancer. Due to a better understanding of the underlying biology of Renal Cell Carcinoma (RCC) the genes expression of CD105 (endoglin), VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 that are selectively expressed in vascular endothelial cells are being studied as potential therapeutic targets. **OBJECTIVES:** This study analyzed the expression of these four genes in normal kidney tissue and RCC and relationship with prognostic factors. **METHODS:** CD105, VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 expression levels were analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in fresh-frozen malignant tissue specimens collected from 56 patients submitted to radical or partial nephrectomy. This study assessed the expression of genes in normal and tumor tissues, and compared with classic prognostic parameters in CCRCC, such as tumor size (larger or smaller than 7 cm) Fuhrman grade (1-2 and 3-4) and microvascular invasion (this or absent). **RESULTS:** The analysis of these four genes showed that CD105 is subexpressed in 94.7% of cases and the overexpression of VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 occurred in 53.6%, 85.7% and 64.3% of cases respectively in tumor tissues compared to controls. The expression of endoglin was significantly higher in patients with metastatic disease ($p = 0.05$). In addition, VEGFR2 gene was associated with stage T, with an average of expression higher in patients with stage T1-T2 ($p = 0.040$). **Conclusions:** These experiments demonstrated that endoglin was underexpressed in RCC compared to normal kidney and the presence of enhanced expression is associated with metastatic disease. VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 were overexpressed in the CCRCC and a higher VEGFR2 expression was related with stage T1-2.

Keywords: Kidney Neoplasm, Pathological angiogenesis, Biological markers, prognosis

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

O Carcinoma de Células Renais (CCR) corresponde a aproximadamente 3% dos tumores malignos em adultos. Nos Estados Unidos da América, são diagnosticados cerca de 64.770 novos casos anualmente e aproximadamente 13.570 morrem pela doença (Siegel et al., 2012). Recentes estudos demonstram um declínio na incidência e na mortalidade por câncer de rim em países europeus e nos Estados Unidos a partir da década de 90, principalmente em homens (Levi et al., 2008; Jemal et al., 2010). Trabalhos recentes evidenciam uma queda maior na incidência em relação à mortalidade pela doença, indicando que as melhorias no diagnóstico e no tratamento do CCR ainda estão longe do esperado e novas estratégias devem ser traçadas na tentativa de redução desses índices e melhor controle da neoplasia (Levi et al., 2008; Siegel et al., 2012).

Outro fenômeno identificado nas últimas décadas e que implicou na evolução dos métodos de tratamento do CCR relaciona-se ao tamanho tumoral. Nos últimos 14 anos, o tamanho médio do CCR diagnosticado por exames de imagem diminuiu em média de 66,8 para 58,6 mm. O que pode parecer uma diminuição modesta contribuiu para vantagem de sobrevida quando se compara estudos no período de 1988-1992 e 1993-2002 (Nguyen et al., 2006). O tamanho do tumor em sua apresentação, além de permitir cirurgia de menor porte, é um forte preditor de sobrevida, com menores tamanhos levando a maiores taxas de cura. Atualmente acredita-se que as melhores possibilidades de tratamento curativo ocorram em pacientes com CCR menores que quatro centímetros, e estes achados resultaram em mudanças no estadiamento TNM, quando os tumores T1 foram subdivididos em T1a – tumores menores que 4 cm e T1b – tumores maiores que 4 cm e menores que 7cm (Dall'Oglio et al., 2003; Sobin, 2003).

1.2 Diagnóstico

O CCR em estágios iniciais geralmente não apresenta sinais ou sintomas. Mesmo tumores maiores, em estágios mais avançados, podem ser assintomáticos até

as fases tardias da doença (Lee et al., 2002). Alguns sintomas que podem levar à descoberta do CCR são: hematúria, dor lombar, fadiga e perda de peso (Decastro et al., 2008). A tríade clássica (dor em flanco, hematúria macroscópica e massa palpável) é encontrada em um número reduzido de casos e gira em torno de 6% a 10% (Lee et al., 2002). Infelizmente, estes sinais muitas vezes são ignorados pelo paciente ou confundidos com sintomas de outras doenças.

As síndromes paraneoplásicas são encontradas em 30% dos pacientes com CCR sintomático, sendo a maioria dos sintomas correlacionados com piora de sobrevida. Segundo Kim et al. (2003), em estudo associando a presença de síndrome paraneoplásica à sobrevida, observaram que hipoalbuminemia, perda de peso e anorexia são preditores de piores resultados.

Atualmente mais de 50% dos CCR são detectados incidentalmente em função de exames de imagem realizados para investigação de sintomas inespecíficos (Decastro et al., 2008; Sun; Pedrosa, 2009). Os exames de imagem como a Ultrassonografia (USG), Ressonância Magnética (RM) e Tomografia Computadorizada (TC) são as principais ferramentas para um diagnóstico preciso, dispensando na maioria das vezes a necessidade de métodos invasivos como a biópsia renal (Pedrosa et al., 2009).

Embora apresente baixa sensibilidade na detecção de pequenas lesões renais incidentais, a USG foi a grande responsável pelo aumento nas taxas de incidência da doença em fases precoces devido à sua ampla utilização na propedêutica abdominal. Esse método diagnóstico faz parte de praticamente todos os protocolos de medicina preventiva e seu emprego na oncologia aumentou cerca de 10 vezes nas últimas duas décadas (Dinan et al., 2010). Assim, após cada suspeita de alteração em qualquer órgão abdominal levantada pela USG, realiza-se um estudo complementar pormenorizado com TC ou RM, que, por sua vez, tem diagnosticado um número maior de alterações renais mais relevantes.

A TC continua a ser a modalidade mais amplamente disponível e mais eficaz para o estadiamento de pacientes com CCR, com acurácia entre 80-95% (Catalano et al., 2003; Hallscheidt et al., 2004) sendo atualmente o padrão-ouro para detectar, caracterizar e estadiar as neoplasias renais.

Kim et al. em 2002, correlacionaram pela TC os tipos histológicos do tumor de acordo com seu padrão de realce e formato da lesão, sendo o primeiro o parâmetro mais importante. O CCR do tipo células claras tende a apresentar realce intenso e heterogêneo, enquanto que o do tipo papilífero tende a ser hipovascular e homogêneo. Os carcinomas de células cromóforas e os oncocitomas, por sua vez, apresentam frequentemente realce homogêneo. A partir de uma análise cuidadosa da forma da lesão e dos coeficientes de atenuação, a TC é útil para diferenciar tumores benignos de malignos. No entanto, se os achados de imagem são duvidosos, uma biópsia dirigida é fundamental para a definição do diagnóstico final (Neuzillet et al., 2004).

A maior vantagem da RM em relação à USG e TC é que ela possui um melhor padrão de definição de partes moles dos tecidos em relação a qualquer outra modalidade de imagem transversal. O CCR possui uma apresentação variada na RM que se dá pela existência de múltiplos subtipos histológicos, e à variabilidade interna devido à necrose, hemorragia, ou à presença de lipídios no interior do tumor (John et al., 1997; Shinmoto et al., 1998). Na RM, o CCR se apresenta com sinal hipointenso ou isointenso em relação ao parênquima renal em sequências ponderadas em T1, e heterogeneamente hiperintenso em imagens de T2. Embora o realce dos tumores renais aumente com a administração intravenosa do gadolínio, eles tendem a aumentar menos do que o parênquima renal normal, e muitas vezes são mais facilmente identificados na fase pós-contraste em T1 (Yamashita et al., 1995).

As biópsias de tumores renais têm sido utilizadas atualmente para elucidação dos casos duvidosos à TC e seguimento de pacientes submetidos a tratamentos ablativos. Além disso, recentes descobertas na genética do CCR têm fornecido a possibilidade de novas terapias de alvo molecular em pacientes com doença metastática, onde o sucesso do tratamento depende de uma exata avaliação histológica dos tumores. A biópsia percutânea é um método adequado para fornecer um diagnóstico pré-operatório em pacientes selecionados, embora imprecisões da avaliação da histologia tumoral possam ocorrer em taxas que chegam até 26% na amostra do tumor primário (Lebret et al., 2007). Até o momento, não existem biomarcadores confiáveis que sejam capazes de identificar a doença em qualquer dos seus estágios.

Mesmo com o diagnóstico cada vez mais precoce e a despeito de todos os esforços para a prevenção desta doença, entre 25% e 45% dos tumores renais são metastáticos no momento de sua detecção (Parkin et al., 2005) e recorrência ocorre em cerca de 40% dos pacientes tratados por tumores localizados (Lam et al., 2005). Desse modo, existe a necessidade de melhorias no manejo do CCR que permitam prever com segurança seu padrão evolutivo, a fim de contribuir com melhores resultados de sobrevida.

1.3 Tratamento

A abordagem terapêutica para o CCR é guiada pela probabilidade de cura, que está diretamente relacionada com o estágio ou grau de disseminação do tumor. Mais de 50% dos pacientes com doença em estágio inicial são curados, mas os resultados são ruins para estágios mais avançados.

A ressecção cirúrgica continua sendo o único tratamento eficaz para o CCR unilateral localizado com rim contralateral normal, e também é aplicada no controle paliativo da doença metastática. Robson e colaboradores, em 1969 estabeleceram a nefrectomia radical como o método curativo padrão-ouro para o CCR localizado observando 66% e 64% de sobrevida global para os estádios I e II, respectivamente. Estudos recentes indicam taxas de sobrevida em cinco anos de 80% ou mais após a nefrectomia radical para o estágio I (T1-2) (Tharsher et al., 1993).

Atualmente, a nefrectomia parcial aberta está se consolidando como tratamento cirúrgico de eleição para pequenas massas renais com resultados oncológicos semelhantes à nefrectomia radical em tumores de até quatro centímetros com a vantagem de preservação renal (Lee et al., 2000; Uzzo; Novick, 2001; Gill et al., 2005; Lucas; Cadeddu, 2010). A nefrectomia radical está associada a um risco aumentado de doença renal crônica e dados recentes mostram uma associação entre esta e morbimortalidade cardiovascular (Go et al., 2004). Desse modo, a ressecção parcial poupadora de néfrons vem se estabelecendo como opção tecnicamente segura e com melhores resultados a longo prazo.

Uma vez que o CCR é altamente resistente à quimioterapia e radioterapia, a interleucina-2 e o interferon- α foram amplamente utilizados para o tratamento da doença metastática. A taxa de resposta para estas citocinas, contudo, é baixa e varia entre 5% e 10% com sobrevida média de 12 meses (Fisher et al., 2000; Yang et al., 2003). O CCR do tipo células claras expressa altos níveis de uma série de receptores relacionados à angiogênese e à manutenção da microvasculatura tumoral. Drogas como o sunitinibe, o sorafenibe e o bevacizumabe atuam desregulando as atividades de receptores de fatores de crescimento angiogênico e demonstraram resultados favoráveis em estudos envolvendo pacientes com doença avançada. Essas novas drogas constituem estratégias promissoras para o tratamento do CCR metastático (Motzer et al., 2007).

1.4 Fatores Prognósticos

Considerando-se a resposta não satisfatória da doença ao tratamento não cirúrgico, é extremamente desejável identificar os pacientes com as melhores chances de benefício frente a um tratamento adjuvante específico para determinado tipo tumoral. A determinação do risco de recidiva ou da sobrevida desses pacientes tem se baseado em uma série de modelos preditivos que interagem fatores de risco determinados clinicamente. Os fatores mais utilizados são:

1.4.1 Sistema de Estadiamento TNM

O sistema mais comumente utilizado atualmente é o TNM do *American Joint Committee Against Cancer* e do *American Joint Committee on Cancer* que avalia extensão tumoral (T), linfonodos (N) e metástases locorregionais e à distância (M). O estadiamento do tumor permanece como o melhor indicador prognóstico independente para o CCR e segundo a sétima edição de 2009 definiu-se melhor sua habilidade prognóstica. Esta última atualização apresenta mudanças em relação à anterior que incluiu uma subclassificação para os tumores pT2 sendo subdivididos

em pT2a (> 7 e ≤ 10 cm) e pT2b (> 10 cm), reclassificou o envolvimento da adrenal ipsilateral (T4 se invasão contígua e M1 se não contígua), reclassificou o envolvimento da veia renal como T3a e simplificou o envolvimento linfonodal em N0 e N1. Utilizando o sistema TNM 2002, a sobrevida câncer-específica em 5 anos é de cerca 97% para o estágio pT1a e 20% para pT4. Metástases distantes para pulmões, osso, cérebro ou outros órgãos estão associadas a taxas de sobrevida de 50%, 5% a 30% e 0% a 5% para um, cinco e 10 anos, respectivamente.

O TNM sofreu algumas modificações na versão de 2002 para 2010 sendo observadas algumas mudanças, principalmente em relação aos linfonodos (Tabela 1).

Segundo Ficarra et al. (2002) em estudo avaliando os fatores independentes de mortalidade no CCR utilizando o sistema TNM observaram que o estágio patológico do tumor primário, o envolvimento linfonodal, presença de metástases à distância e grau nuclear são fatores prognósticos independentes de mortalidade câncer-específica para a neoplasia.

1.4.2 Subtipos Histológicos

O CCR é conhecido como uma doença heterogênea que exhibe inúmeras apresentações clínicas e patológicas. Diversos tipos histológicos foram descritos, incluindo o CCR tipo células claras, que ocorre em 75% dos diagnósticos histológicos, o papilar (15%) e o cromóforo (5%) (Crundwell et al., 2004). Outros subtipos menos frequentes como os carcinomas de ductos coletores e medular, e tumores não classificáveis, frequentemente demonstram um comportamento mais agressivo (Dall'Oglio et al., 2008). Algumas alterações gênicas são específicas de determinados tumores como as anormalidades do gene de Von Hippel-Lindau (VHL) no cromossomo 3p25, cuja mutação implica na doença de Von Hippel-Lindau, uma condição onde os pacientes desenvolvem tumores múltiplos e bilaterais. Genes ligados ao desenvolvimento do tumor também foram identificados em pacientes com CCR papilar hereditário, síndrome de Birt-Hogg-Dubé e leiomiomatose hereditária associada ao CCR (Takahashi; Shibuya, 2005).

Tabela 1 – Comparações das alterações no sistema TNM realizadas pela AJCC 2010

Estádio (T)	TNM 2002	TNM 2010
T2	Tumor ≥ 7 cm confinado à cápsula renal	Lesões T2 foram divididas em T2a (superior a 7 cm, mas inferior ou igual a 10 cm) e T2b (maior que 10 cm)
T3a	Tumor com extensão aos tecidos perirrenais ou à adrenal ipsilateral, porém limitado à fáscia de Gerota	O envolvimento da adrenal ipsilateral foi reclassificada como T4 (invasão contígua) ou M1 (invasão não contígua)
T3b	Invasão da veia renal ou invasão da veia cava inferior infra-diafragmática	Envolvimento da veia renal é reclassificado como T3a
Linfonodos (N)	TNM 2002	TNM 2010
N0	Sem linfonodos acometidos	Sem linfonodos acometidos
N1	Metástase em único linfonodo < 2 cm	Único linfonodo positivo em região de drenagem primária
N2	Metástase em único linfonodo entre 2 e 5 cm ou múltiplos < 5 cm	Múltiplos linfonodos positivos em regiões de drenagem
N3	Metástase em linfonodo > 5 cm	Cadeia ilíaca comum positiva

Contudo, somente 4% dos pacientes com CCR desenvolvem a doença dentro de um contexto de síndromes familiares. Esta pequena porcentagem, porém, pode não refletir a realidade da doença e muitos outros fatores genéticos envolvidos na carcinogênese do CCR provavelmente ainda não são conhecidos.

Além dos tipos histológicos determinados existe o carcinoma de padrão sarcomatoso que constitui indiferenciação de qualquer um dos subtipos característicos e que tem comportamento mais agressivo (Dall'Oglio et al., 2005).

1.4.3 Grau Nuclear de Fuhrman

Vários sistemas de diferenciação têm sido propostos para o CCR. No entanto, não há consenso sobre qual deles deve ser usado (Fuhrman et al., 1982; Klöppel et al., 1986; Delahunt; Nacey, 1987). As diretrizes da UICC e AJCC sugerem que um sistema de classificação sobre o diagnóstico e prognóstico do CCR deve ser baseado em critérios padronizados e reprodutíveis, que reconhecem a heterogeneidade de um tumor (Lohse et al., 2002). O sistema mais comumente utilizado é o proposto por Fuhrman et al., em 1982, e emprega uma escala multiparamétrica de quatro pontos baseada somente nas características nucleares de tamanho, irregularidade da membrana nuclear e proeminência nucleolar (Kattan et al., 2001). As características histológicas como arquitetura e necrose, que são utilizadas na classificação de tumores em outros locais do corpo, são irrelevantes no sistema de Fuhrman.

O grau histológico também possui importância relevante para o prognóstico de pacientes com CCR. Segundo Ficarra et al. (2002), de acordo com o grau de Fuhrman, a sobrevida câncer-específica em cinco e 10 anos observada em estudo retrospectivo com 675 pacientes foi de 94 e 88% em tumores grau 1, 86 e 75% em grau 2, 59 e 40% em grau 3 e 31% e 31% em grau 4.

Nos últimos anos, uma série de ensaios clínicos envolvendo tratamento adjuvante para o CCR com "alto risco de recorrência" têm sido iniciados. O grau de Fuhrman seria um parâmetro importante para se estratificar pacientes. A compreensão dos mecanismos que levam à estrutura anormal nuclear em células tumorais pode gerar maior entendimento da carcinogênese e fornecer biomarcadores mais específicos (True, 2002).

1.4.4 Invasão Microvascular

A presença de invasão microvascular intratumoral é fator prognóstico anatomopatológico de alta relevância (Van Poppel et al., 1997), constatando-se que mesmo nos casos de CCR em estágio inicial ocorre recorrência da doença em 50% dos pacientes quando esse fator é positivo (Gonçalves et al., 2004). Mais recentemente, foi destacado o grande valor desse parâmetro, ao identificarmos uma sobrevida em cinco anos de 88% na ausência de invasão microvascular intratumoral. Já a sobrevida câncer-específica e livre de doença foram, respectivamente, de 40% e 27% nos tumores que apresentavam essa característica (Dall'Oglio et al., 2007).

A neovascularização produzida pelo tumor e a invasão microvascular têm sido propostas como importantes preditores de evolução do CCR. Van Poppel et al. (1997) demonstraram que houve progressão da doença em 39% dos tumores com invasão microvascular intratumoral, enquanto que a progressão observada em pacientes sem invasão foi de apenas 6%. Recentemente Dall'Oglio et al. (2007) descreveram a presença da invasão microvascular como um dos fatores prognósticos mais importantes relacionados ao CCR.

1.4.5 Nomogramas

Os nomogramas constituem uma das mais disseminadas ferramentas disponíveis atualmente para a tomada de decisão em medicina através de sua capacidade em prever prognósticos de doenças ou resultados de tratamento (Mor et al., 1984; Elson et al., 1988), facilitando a inclusão/exclusão de pacientes em estudos. Para o câncer de próstata, por exemplo, existem mais de 42 nomogramas publicados (Ross et al., 2001), e para o CCR os nomogramas elaborados por Kattan, Sorbellini e Lam são os mais citados na literatura. Neles estão incorporados fatores prognósticos como estágio TNM, combinado com tamanho tumoral, invasão vascular, grau nuclear de Fuhrman, subtipos histológicos e apresentação clínica.

1.5 Biologia Molecular do Câncer Renal

Nos últimos anos, avanços em biologia molecular têm fornecido uma melhor compreensão das alterações genéticas relacionadas às vias moleculares de vários tipos de tumores renais. O estudo molecular da carcinogênese tumoral permite análises mais aprofundadas e certamente direcionará pesquisadores à obtenção de desfechos mais eficazes em relação ao comportamento do CCR.

A identificação do gene supressor tumoral VHL levou à elucidação de seu papel na regulação dos fatores de crescimento associados à angiogênese, uma descoberta que ampliou o conhecimento da biologia molecular do CCR e possibilitou o desenvolvimento de drogas-alvo (Motzer et al., 2007). Ambas as formas, esporádica ou hereditária do CCR, estão associadas a mutações nesse gene, localizado no cromossomo 3p (Latif et al., 1993). Indivíduos que herdam uma cópia defeituosa do gene de VHL têm um risco significativamente maior para o desenvolvimento de CCR e uma variedade de outras neoplasias. (Motzer et al., 2006).

Em estudo avaliando a expressão gênica da Molécula de Adesão Celular Vascular-1 (VCAM-1) em tumores renais tipo células claras, observou-se uma expressão aumentada em tumores renais com estágio avançado enquanto que menores níveis são encontrados no tecido normal não tumoral (Hemmerlein et al., 2000). Vasselli et al. (2003), avaliando a expressão gênica em tumores renais metastáticos, observaram que VCAM-1 foi o único gene preditor de sobrevida em pacientes com pior prognóstico.

Segundo Takahashi et al. (2001), em estudo de perfil de expressão gênica no carcinoma de células renais identificou entre os achados que o gene *Sprouty*, um inibidor da angiogênese, está superexpresso em pacientes com tumores renais de melhores características prognósticas enquanto que o fator transformador de crescimento β (TGF- β) encontra-se subexpresso naqueles de pior prognóstico.

Em estudo de *microarray*, Schuetz et al. (2005) demonstraram um perfil molecular que pode ser utilizado para classificar CCR do tipo células claras que caracteristicamente apresentam maior expressão de genes marcadores de néfrons proximais, incluindo o Fator Intrínseco de Receptores de Cobalamina (CBLN) e

Proteína-2 Relacionada a Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade (LRP2). Esses genes estão relacionados a fatores envolvidos na angiogênese e resposta imune (como os membros do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II) e podem compreender alvos terapêuticos.

1.6 Angiogênese e Câncer

A ação da angiogênese na biologia tumoral foi preconizada por Folkman em 1971. Segundo o autor, a maioria dos tumores e metástases origina-se como pequenas estruturas celulares avasculares que induzem a neoformação vascular, após poucos milímetros de tamanho. Atualmente, existem evidências experimentais e clínicas de que a microvasculatura tumoral exerce importante função no crescimento, disseminação, progressão, latência e apoptose de células tumorais (Makhni et al., 2003).

Polverini (2002) postulou que a angiogênese tumoral pode ter diversas origens: a) expansão dos vasos do hospedeiro para o espaço intratumoral; b) formação de vasos tumorais a partir do estímulo de células endoteliais pré-existentes no tecido adjacente ao tumor; c) formação dos vasos tumorais a partir de precursores endoteliais embrionários (vasculogênese).

Trabalhos prévios direcionados à angiogênese demonstraram que vasos sanguíneos recém-formados em tumores ofertam nutrientes e oxigênio, eliminam resíduos metabólicos, além de gerar estímulos parácrinos que continuam a promover a proliferação da célula neoplásica e invasão. Existem evidências clínicas que definem a densidade microvascular como um importante preditor do comportamento do tumor (Page; Jensen, 1995; Fox et al., 1996).

Nas últimas décadas, inúmeros estudos foram desenvolvidos a fim de correlacionar os fatores angiogênicos e a densidade vascular do tumor com os aspectos clinicopatológicos da doença (Folkman, 1990; Albo et al., 1994; Schimming et al., 2004).

Fonsati et al. (2001) indicaram a endoglina como o marcador endotelial mais apropriado no monitoramento terapêutico anti-angiogênico em neoplasias malignas e

salientaram que inúmeras pesquisas evidenciam esse marcador como um importante fator preditivo de metástases regionais e sobrevida dos pacientes oncológicos.

1.6.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e seus Receptores

O VEGF consiste em um fator de sobrevivência para as células endoteliais (Carmeliet, 2005). Está localizado no gene 6p21.3 em humanos (Ferrara; Davis-Smyth, 1997), sendo importante regulador da vasculogênese e angiogênese (Shibuya et al., 2006). Ele pertence a uma família de mitógenos estruturalmente denominados fatores de crescimento derivados de plaquetas (*Platelet-derived Growth Factor – PDGF*) (Carmeliet, 2005). O VEGF também age como um fator de permeabilidade vascular e está envolvido no remodelamento da angiogênese e sobrevida de células endoteliais (Shinkai et al., 1998).

As famílias do VEGF e de seus receptores (VEGFR) são responsáveis pela regulação do endotélio vascular e linfático (Tabela 2) e igualmente exercem um papel-chave na formação do tumor com a ativação da angiogênese e linfangiogênese (Bando, 2007). Além disso, a família de VEGFR tem um papel crítico no desenvolvimento e manutenção da rede vascular de tumores que, por sua vez, expressam o VEGF promovendo o crescimento e a metastatização. A mediação do VEGF na permeabilidade vascular direciona o acúmulo de barreira de fibrina em torno do tumor e limita as propriedades malignas do tecido. *In vivo*, o crescimento tumoral é atenuado por anti-VEGF, um gene que atua bloqueando as funções proliferativas de VEGF, promovendo maiores níveis de isquemia e edema teciduais (Weis; Cheresh, 2005).

Tabela 2 – Genes estudados e suas principais funções moleculares

Nome	Símbolo	Principais Funções Moleculares
Fator de Crescimento Endotelial Vascular	VEGF	Permeabilidade vascular, angiogênese, vasculogênese, crescimento das células endoteliais, migração celular, apoptose e inibição
Receptor para o Fator de Crescimento Endotelial Vascular 1	VEGFR1	Migração celular, angiogênese e vasculogênese.
Receptor para o Fator de Crescimento Endotelial Vascular 2	VEGFR2	Proliferação endotelial, sobrevivência, migração, morfogênese tubular e brotamento vascular.

O VEGF-A, ou simplesmente VEGF, apresenta seis isoformas: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 e VEGF206 (Bando, 2007). Além disso, a isoforma VEGF165 pode ser clivada por plasmina e várias metaloproteinases, gerando VEGF110 e VEGF113 – dois fragmentos bioativos NH2-terminal (Ferrara; Davis-Smyth, 1997; Ferrara et al., 2003; Carmeliet, 2005; Kowanetz; Ferrara, 2006).

Existem três tipos de receptores tirosina quinase para VEGF presentes nas células endoteliais vasculares: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3, e estes necessitam de dimerização para induzir a sinalização intracelular (Takeda et al., 2002; Shibuya; Claesson-Welsh, 2006). A hipóxia tem sido considerada a maior indutora da expressão local do gene VEGF em tumores, exercendo um papel importante na regulação da expressão de VEGFR (Ferrara; Davis-Smyth, 1997).

VEGFR1 ou Flt-1 de 180 kDa foi o primeiro receptor tirosina quinase identificado como receptor para VEGF. Este receptor é expresso por células endoteliais, monócitos, macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, pericitos e

trofoblastos placentários (Clauss et al., 1996; Takahashi; Shibuya, 2005). O VEGFR1 tem sido relacionado à migração celular sendo um regulador negativo da angiogênese durante fases precoces do desenvolvimento embrionário, mas tem papel importante na angiogênese em condições patológicas (Takeda et al., 2002). Ligantes como o VEGF, VEGF-B e PlGF podem se acoplar em VEGFR1, promover sua dimerização e induzir a cascata de sinalização via segundo mensageiro intracelulares. Este mecanismo em células endoteliais pulmonares tem sido atribuído à produção de metaloproteinase 9 (MMP-9) e facilitação do processo metastático no pulmão (Ferrara et al., 2003).

O VEGFR2, KDR (*Kinase Domain Region*) ou Flk-1 de 200-230 kDa (Takahashi; Shibuya, 2005), consiste no marcador mais precoce do desenvolvimento de células endoteliais (Shibuya; Claesson-Welsh, 2006) sendo o maior mediador dos efeitos de VEGF na mitogênese, angiogênese e permeabilidade vascular. É responsável pela transdução de sinais de proliferação, sobrevivência, apoptose, migração e degradação de matriz extracelular (Ferrara et al., 2003; Takahashi; Shibuya, 2005; Shibuya; Claesson-Welsh, 2006). Em um estudo realizado por Takahashi et al. em 2001, foi sugerido que a autofosforilação de uma região de VEGFR2 denominada Y1175 pode ser crucial para a proliferação da célula endotelial via MAP quinase. Além das células endoteliais, células-tronco hematopoiéticas, células neuronais, osteoblastos, células do ducto pancreático, células progenitoras de retina e megacariócitos também expressam VEGFR2 (Shibuya; Claesson-Welsh, 2006).

1.6.2 Endoglina

A endoglina, também conhecida como o grupo de diferenciação (*Cluster of Differentiation*) número 105 (CD105) (Gougos et al., 1988) é uma glicoproteína presente em níveis elevados no endotélio da microvasculatura humana (Cheifetz et al., 1992) e em células endoteliais de tecidos que estão em angiogênese ativa, tecidos em regeneração, processos inflamatórios e tumores (Tabela 3) (Lomonte; Gutiérrez, 1989; Kudo et al., 1993; Fuh et al., 1998; Fonsatti et al., 2003). O gene codificador

da endoglina encontra-se localizado no cromossomo 9q34 e foi identificado utilizando hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (Fernandez-Ruiz et al., 1993).

A descoberta de que os níveis de CD105 regulam a expressão de diferentes componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina, colágeno, inibidor de plasminogênio ativado 1 (PAI-1) e lumican (Rabin, 2006; Service, 2008; Aachmann; Aune, 2009) também sugere que o CD105 possa estar envolvido no processo de migração celular (Kerbel, 2008).

Tabela 3 – Expressão de Endoglina (CD105) em tecidos humanos normais

Localização	Tipo Celular
Sistema Cardiovascular	Células endoteliais
	Musculatura lisa das células endoteliais
Sistema Hematológico	Fibroblastos estromais da medula óssea
	Células progenitoras B
	Precursos eritróides
	Células CD34 + circulantes
Sistema Reticuloendotelial	Macrófagos intersticiais da polpa vermelha do baço
	Monócitos ativados
	Macrófagos diferenciados
	Células dendríticas foliculares em órgãos linfóides
Sistema Geniturinário	Células intersticiais da região extraglomerular do rim
	Células mesangiais da região glomerular do rim
	Células basais dos túbulos seminíferos

Adaptado de Dallas et al., 2008

O CD105 possui uma atividade funcional como componente do complexo receptor de fator transformador de crescimento β (TGF- β) (Cheifetz et al., 1992; Barbara et al., 1999), uma citocina envolvida na proliferação celular, diferenciação e migração (Massague, 1987). A ação do CD105 se pauta na supressão do sinal de TGF- β 1 e TGF- β 3 e bloqueio de seus receptores, promovendo modulação de suas

respostas. Desse modo, a inibição de expressão de CD105 reforça a capacidade supressora de TGF- β 1 sobre o crescimento celular, diminuindo a migração e a habilidade de formação de tubos capilares em cultura de células endoteliais (Figura 1). Na ausência de TGF- β 1, CD105 apresenta um efeito anti-apoptótico em células endoteliais sob estresse hipóxico, sugerindo seu papel na manutenção da sobrevivência celular. A hipóxia é um potente estimulador da expressão gênica de CD105 nas células endoteliais e também potencializa sua interação com receptores de TGF- β 1 (Duff et al., 2003). Acredita-se que o desenvolvimento da resposta angiogênica também possa depender de um balanço entre os níveis de ativação de TGF- β e a expressão de CD105 (Li et al., 2000).

O CD105 é amplamente expresso em pequenos vasos de tumores sólidos de diferentes tipos histológicos, como mama, próstata, estômago e endométrio (Kumar et al., 1999; Veikkola et al., 2000; Saad et al., 2003; El-Gohary et al., 2007; Nikiteas et al., 2007). Estudos utilizando anticorpos monoclonais anti-CD105 mostraram que a expressão antigênica foi identificada quase que exclusivamente no endotélio venoso e arterial dos vasos peri e intratumorais (Bodey et al., 1998; Kumar et al., 1999; Fonsatti et al., 2001). Pesquisas têm mostrado uma imunomarcacão forte para CD105 nos vasos ao redor do tumor, e nenhuma marcação tem sido detectada nos grandes vasos ou vasos sanguíneos dos tecidos normais (Bodey et al., 1998; Kumar et al., 1999). Por isso, tem-se sugerido que o CD105 é um marcador mais específico e sensível para vasos neoformados em relação aos outros anticorpos pan-endoteliais (CD31, CD34 e fator VIII) nos carcinomas de colo de útero, cólon, endométrio e mama (Bodey et al., 1998; Saad et al., 2003).

Figura 1 – Papel da Endogлина no endotélio vascular tumoral. Fonte: López-Novoa e Bernabeu, 2010.

As interações moleculares entre CD105, VEGF e seus receptores estão bem descritas na literatura, e suas relações foram estudadas em alguns tipos de tumor, como o câncer colorretal e de próstata (Mysliwiec et al., 2009a; Dassoulas et al., 2010). Foi observado que VEGF e CD105 estiveram positivamente relacionados, mas não ficou evidente nenhuma associação significativa entre eles.

De acordo com esta revisão, embora muitos trabalhos estejam sendo realizados na tentativa de compreensão do mecanismo de ação de VEGF e de angiogênese (representados pela quantificação de CD105), ainda não está totalmente clara suas relações com tumores sólidos malignos como o CCR. Desta forma se faz importante avaliar se os níveis de expressão dos genes VEGF e CD105 estariam associados com o comportamento e progressão do CCR, correlacionando-os com fatores prognósticos já estabelecidos como o estadiamento clínico, a graduação nuclear de Fuhrman e a invasão microvascular.

2 OBJETIVOS

2.1 Primário

Avaliar os níveis de expressão dos genes CD105, VEGF e VEGFR-1 e VEGFR-2 no carcinoma de células renais.

2.2 Secundários

Correlacionar os níveis de expressão destes genes com os fatores prognósticos do carcinoma renal do tipo células claras:

- Estádio tumoral
- Grau nuclear de Fuhrman
- Invasão microvascular

Estudar a associação desses níveis de expressão gênica com os grupos classificados segundo os fatores prognósticos (baixo, intermediário e alto risco) e com a evolução da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foi analisado o perfil de expressão de quatro genes em 59 amostras provenientes de pacientes em acompanhamento urológico, divididos em dois grupos: 56 pacientes com CCR tipo células claras submetidos à nefrectomia radical ou parcial e três pacientes controles do sexo masculino submetidos à nefrectomia por causa não oncológica (estenose de junção uretero-piélica). Foram avaliados os seguintes parâmetros prognósticos:

- a. Estadiamento patológico TNM segundo a AJCC 2010
- b. Grau nuclear de Fuhrman
- c. Invasão microvascular tumoral

A subdivisão dos grupos em bom, intermediário e mau prognóstico foi feita segundo os critérios descritos por Dall'Oglio et al. (2007), que inclui tamanho tumoral (menor ou maior que 7 cm), grau nuclear de Fuhrman (1-2 ou 3-4) e invasão microvascular (ausente ou presente). Critérios de alto risco são definidos por tamanho tumoral maior que 7 cm, grau nuclear de Fuhrman 3-4 e invasão microvascular presente. Em contrapartida, os de baixo risco são caracterizados por tamanho do tumor menor ou igual a 7 cm, grau nuclear de Fuhrman 1-2 e ausência de invasão microvascular. Conforme os critérios de risco acima descritos, os pacientes foram classificados em grupos prognósticos, como demonstrado na tabela 4. Para essa classificação, 13 pacientes foram excluídos porque apresentaram características diferentes das utilizadas por Dall'Oglio et al. (2007), totalizando 43 pacientes para esta análise específica.

Foram relacionados então os níveis de expressão dos genes CD105, VEGF e VEGFR1 e 2 com os fatores prognósticos do CCR tipo células claras e com a evolução da doença.

Tabela 4 – Classificação dos pacientes em grupos prognósticos, segundo os critérios de Dall'Oglio et al., 2007

	Bom (n = 19)	Intermediário* (n = 17)	Mau (n = 7)
Tamanho	≤ 7 cm	$\leq$ ou > 7 cm	> 7 cm
Fuhrman	1-2	1-2 ou 3-4	3-4
IMV	Ausente	Ausente ou presente	Presente

* os pacientes desse grupo apresentaram um ou dois dos critérios de mau prognóstico

Todos os pacientes foram operados e seguidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), no período de janeiro de 2008 a março de 2010. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMUSP, tendo sido aprovado sob protocolo 0049/10.

Os pacientes foram acompanhados por um período médio de 24,1 meses, com mediana de 24 meses (variando de 12 a 36). O seguimento foi realizado através de exames físico e de imagem, como radiografia de tórax, USG e TC do abdômen. Para pacientes que apresentaram dor óssea ou elevação dos níveis séricos de fosfatase alcalina, foi solicitada cintilografia óssea. As características cirúrgicas, histopatológicas e demográficas considerando todos os casos de CCR estão demonstradas na tabela 5. Não houve diferenças estatísticas para a faixa etária entre os grupos estudados ($p = 0,7$).

Tabela 5 – Dados demográficos e patológicos dos pacientes com CCR e do grupo controle

Casos de CCR (n = 56)	Características
Sexo	
Masculino	39 (70%)
Feminino	17 (30%)
Idade (anos)	
Média	61,1
Mediana (mín-máx)	61 (34-82)
Tipo de Nefrectomia	
Parcial	16 (29%)
Radical	40 (71%)
Grau de Fuhrman	
1-2	29 (52%)
3-4	27 (48%)
Invasão Microvascular	
Ausente	43 (77%)
Presente	13 (23%)
Estádio Patológico (T)	
T1-T2	33 (59%)
T3-T4	23 (41%)
Estádio Patológico (N)	
N0	54 (96 %)
N1	2 (4%)
Estádio Patológico (M)	
M0	44 (79%)
M1	12 (21%)

3.2 Exame Macro e Microscópico

Os espécimes cirúrgicos foram examinados a fresco pelo patologista e o pesquisador executante deste trabalho, imediatamente após sua ressecção, sendo seccionado fragmento de 1 cm², armazenado imediatamente em criotubo *Eppendorf* de 1,5 ml com 1 ml de RNA *holder*[®] (fixador de RNA) e mantidos em freezer -80° C no Laboratório de Investigação Médica Urológica (LIM-55) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Após a secção do fragmento para extração do RNA, os espécimes cirúrgicos foram fixados em formalina 10% por um período de até 24 horas. Todas as peças provenientes de nefrectomia para doença maligna (casos) ou não (controles) foram submetidas a estudo histológico. As peças foram habitualmente processadas e incluídas em parafina, seccionadas em cortes de 4 a 6 μm , coradas por hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio óptico pelo mesmo patologista, garantindo a presença de tumor em pelo menos 75% da amostra.

3.3 Processamento das Amostras

3.3.1 Extração do RNA

O RNAm de cada amostra foi isolado com o kit *RNAqueous*[®] (Ambion) de acordo com as recomendações do fabricante. Os espécimes congelados a -80°C foram macerados e colocados em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril. Ao tecido macerado foi adicionado 10x o seu volume de solução de lise e igual volume de etanol 64%. Repassamos a solução para uma coluna GFX, e centrifugamos a 10.000g por 1 minuto. À coluna adicionamos 700 μl de uma solução de lavagem própria do kit. Centrifugamos novamente nas mesmas condições e fizemos duas lavagens com 500 μl de outra solução de lavagem. Descartamos o filtrado, centrifugamos por mais 1 minuto a 10.000g para secagem da coluna, repassamos a coluna para um novo tubo e adicionamos 50 μl de solução de eluição pré-aquecida a 80°C no centro da coluna. Após 1 minuto à temperatura ambiente, centrifugamos a coluna e o RNA foi armazenado a -80°C até sua utilização. A pureza e concentração do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop[®] (ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280 nM).

3.3.2 Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 5µg de RNA utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems) o qual utiliza a Transcriptase reversa MultiScribe™ e *primers* randômicos (Figura 2).

O RNA total foi diluído em H₂O livre de nucleases em um volume final de 20µL. A este volume foram acrescentados 4µL de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6 µL do mix de dNTPs (25X), 4µL do tampão da enzima (10X), 2µL (50U/µl) da enzima transcriptase reversa e 8,4µl de água livre de nucleases. A solução foi então submetida a ciclos de temperaturas (25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos) em termociclador Veriti® (Applied Biosystems). Ao final da reação, o cDNA foi armazenado a -20 °C até o uso.

Figura 2 – Síntese do DNA complementar.

3.3.3 Amplificação do RNA

A expressão dos genes estudados (Tabela 6) foi avaliada a partir do cDNA utilizando a metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) (plataforma ABI 7500) utilizando-se o protocolo TaqMan® (Applied Biosystems). Este protocolo utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve a luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela *Taq* polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* da fluorescência emitida que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda permite a quantificação indireta do RNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR (Figura 3).

Tabela 6 – *Primers* utilizados para quantificação da expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e 2 no câncer renal

GENE	ENSAIO
CD-105	Hs00923996_m1
VEGF	Hs00900055_m1
VEGFR2	Hs01052961_m1
VEGFR2	Hs00911700_m1

Para amplificação dos fragmentos desejados utilizamos as seguintes condições de reação: 5 µl do MasterMix TaqMan, 0,5 µl de *primer* (contendo a sonda marcada), 3,5 µl de água destilada deionizada e 1 µl de cDNA, somando um total de 10 µl para cada reação. A condição usual de programação dos ciclos foi um passo a 50°C por dois minutos, um passo a 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

Figura 3 – Amplificação do RNA pelo método TaqMan®

3.4 Análise dos Resultados

Os níveis de expressão dos RNA foram obtidos pela quantificação relativa dos níveis de expressão determinados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak, Schmittgen, 2001), para o qual $\Delta\Delta CT = dCT_1 - dCT_2$, onde $dCT_1 = CT$ do RNA-alvo, (amostra tumoral) - CT da média do controle endógeno (amostra tumoral), e $dCT_2 = CT$ da média dos

controles (amostras de tecido renal normal) – CT da média do controle endógeno (amostra de tecido renal normal). No gráfico logarítmico, esse método padroniza a expressão do controle normal como uma linha basal (representada pelo número 1) e a expressão relativa de cada RNA para cada amostra tumoral é demonstrada em vezes o normal para mais nos casos de superexpressão e para menos nos de subexpressão.

Todas as reações foram realizadas em duplicata e gene β 2-microglobulina (B2M) (Applied Biosystems, CA, USA) utilizado como controle endógeno. Para análise de expressão, além do controle endógeno, analisamos a expressão dos níveis dos mesmos RNA em tecido renal normal não neoplásico como demonstrado na equação acima.

A figura 4 demonstra de modo esquemático a metodologia aplicada e desenvolvida neste estudo.

Figura 4 – Metodologia resumida do estudo.

3.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do *software* SPSS 19.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, EUA). Os testes T e Mann-Whitney foram usados para comparar a relação entre a expressão de CD 105, VEGF e VEGFR com os fatores prognósticos tumorais (estadiamento patológico, graduação nuclear de Fuhrman e invasão microvascular) e metástase, quando as variáveis eram homogêneas ou não, respectivamente.

Um valor de p inferior ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo para todos os cálculos. Os dados foram transformados em gráficos logarítmicos para análise e a expressão de cada amostra para um determinado RNA é relativa ao controle e expressa em vezes.

4 RESULTADOS

A análise dos quatro genes através do método de qRT-PCR no tecido tumoral demonstrou que CD105 está subexpresso em 94,7% dos casos, se tratando da diferença mais significativa encontrada. A superexpressão de VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 ocorreu em 53,6%, 85,7% e 62,5% dos casos respectivamente em tecidos tumorais em comparação com o controle (Figura 5 e Tabela 7).

Figura 5 – Expressão quantitativa dos genes CD 105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 nos 56 pacientes portadores de CCR.

Tabela 7 – Média de expressão dos quatro genes estudados

	CD 105	VEGF	VEGFR1	VEGFR2
Média	0,46	3,61	7,27	4,73
Mediana (mín-máx)	0,21 (0,006-7,92)	1,24 (0,04-64,53)	3,31 (0,38-45,71)	1,91 (0,13-62,12)
Superexpressão	5,4%	53,6%	85,7%	62,5%
Subexpressão	94,6%	46,4%	14,3%	37,5%

4.1 Expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 e estadiamento patológico (T)

Os resultados de acordo com o estágio patológico estão apresentados na tabela 8. O gene do VEGFR2 apresentou níveis de expressão 2,9 vezes maior nos pacientes estadiados pT1-2 em relação aos pT3-4, com diferença estatística significativa ($p = 0,04$). Não encontramos diferenças estatísticas quando comparamos os genes CD105, VEGF e VEGFR1 com o estadiamento patológico T.

Tabela 8 – Expressão dos quatro genes de acordo com o estadiamento patológico

	pT1-2 (n=33) Média Mediana (mín-máx)	pT3-4 (n=23) Média Mediana (mín-máx)	p
CD 105	0,35 0,23 (0,006-1,65)	0,61 0,13 (0,03-7,92)	0,38
VEGF	2,26 0,91 (0,04-14,88)	5,53 1,3 (0,25-64,53)	0,61
VEGFR1	7,77 3,75 (0,38-45,71)	6,55 2,7 (0,4-26,27)	0,61
VEGFR2	6,48 2,31 (0,13-62,12)	2,22 0,93 (0,2-10,24)	0,04

4.2 Expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 e grau nuclear de Fuhrman

Não houve diferença estatística significativa quando comparamos a expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e 2 entre os pacientes que apresentavam grau de Fuhrman 1-2 e aqueles que apresentavam grau de Fuhrman 3-4 (Tabela 9).

Tabela 9 – Expressão dos quatro genes de acordo com o grau de Fuhrman

	Fuhrman 1-2 (n=29) Média Mediana (mín-máx)	Fuhrman 3-4 (n=27) Média Mediana (mín-máx)	p
CD 105	0,28 0,19 (0,006-0,95)	0,65 0,23 (0,03-7,92)	0,2
VEGF	2,43 0,84 (0,04-14,88)	4,87 1,58 (0,25-64,53)	0,32
VEGFR1	8,53 4,51 (0,38-45,71)	5,92 3,14 (0,4-26,27)	0,27
VEGFR2	3,57 2 (0,13-34,32)	5,98 1,04 (0,2-5,98)	0,35

4.3 Expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 e invasão microvascular (IMV)

De acordo com a presença de invasão microvascular, os resultados estão apresentados na tabela 10. Não encontramos diferenças estatísticas entre pacientes que apresentavam ou não invasão microvascular quanto à expressão dos quatro genes estudados. Porém, o gene do VEGF apresentou uma diferença marginal quando se considera IMV presente ou ausente ($p = 0,08$).

Tabela 10. Expressão dos quatro genes de acordo com a invasão microvascular

	IMV Ausente (n=43) Média Mediana (mín-máx)	IMV Presente (n=13) Média Mediana (mín-máx)	p
CD 105	0,33 0,22 (0,006-1,07)	0,88 0,16 (0,03-7,92)	0,1
VEGF	2,42 1,26 (0,04-14,88)	7,54 1,13 (0,09-64,53)	0,08
VEGFR1	8,1 3,9 (0,38-45,71)	4,54 1,95 (0,4-26,27)	0,2
VEGFR2	5,17 2,17 (0,13-62,12)	3,27 0,57 (0,22-18,56)	0,54

4.4 Expressão dos quatro genes em relação aos grupos prognósticos

De acordo com a divisão em grupos de bom, intermediário e mau prognóstico, não encontramos nenhuma diferença estatística significativa quando comparamos a expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 (Figuras 6, 7 e 89 e Tabela 11).

Figura 6 – Expressão quantitativa dos genes CD 105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no grupo de bom prognóstico.

Figura 7 – Expressão quantitativa dos genes CD 105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no grupo de prognóstico intermediário.

Figura 8 – Expressão quantitativa dos genes CD 105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no grupo de mau prognóstico.

Tabela 11 – Comparação de expressão dos quatro genes estudados nos três grupos prognósticos

	Bom (n=19) Média Mediana (mín-máx)	Intermediário (n=17) Média Mediana (mín-máx)	Mau (n=7) Média Mediana (mín-máx)	<i>p</i>
CD 105	0,08 0,27 (0,006-0,95)	0,28 0,13 (0,04-0,83)	1,01 0,34 (0,03-7,92)	0,46
VEGF	2,59 0,88 (0,04-14,88)	1,97 1,21 (0,09-10,35)	7,53 1,54 (0,27-64,53)	0,94
VEGFR1	7,70 4,64 (0,38-25,43)	6,91 3 (0,66-45,71)	4,38 3,22 (0,4-26,27)	0,69
VEGFR2	2,44 2,18 (0,13-8,28)	7,59 1,14 (0,20-62,12)	4,23 1,85 (0,22-18,56)	0,76

4.5 Expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 e metástases

A análise da expressão dos quatro genes de acordo com a presença ou ausência de metástases está demonstrada na tabela 12. Encontramos diferenças significativas apenas no gene CD105 que mostrou níveis 3,2 vezes maiores no subgrupo metastático em relação ao que não cursou com metástases ($p = 0,05$).

Não encontramos diferenças quanto à expressão de VEGF, VEGFR1 e 2 quando comparamos pacientes com e sem metástases. Embora superexpresso nos dois subgrupos, as concentrações de VEGF foram 3,3 vezes maiores naquele que apresentou metástases, com diferença estatística marginal ($p=0,06$).

Tabela 12 – Expressão dos quatro genes em relação à presença ou ausência de metástase

	Ausente (n=44) Média Mediana (mín-máx)	Presente (n=12) Média Mediana (mín-máx)	p
CD 105	0,31 0,18 (0,006-1,65)	0,98 0,22 (0,03-7,92)	0,05
VEGF	2,4 1,18 (0,04-23,01)	8,02 1,32 (0,25-64,53)	0,06
VEGFR1	6,84 3,31 (0,38-45,71)	8,85 3,81 (0,4-26,27)	0,48
VEGFR2	5,06 1,91 (0,13-62,12)	3,52 1,9 (0,16-10,24)	0,63

5 DISCUSSÃO

O CCR era considerado uma doença única, mas sabe-se hoje que existem diferentes tipos de câncer renal, cada um possuindo base genética distinta. A identificação do gene supressor de tumor VHL e suas mutações foram fundamentais à elucidação de seu papel na regulação de fatores de crescimento associados com a angiogênese e seu envolvimento nas vias carcinogênicas renais. O entendimento da via do VHL e outras vias moleculares podem fornecer bases para o melhor manejo da doença e desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas.

Considerando a entidade tumoral CCR do tipo células claras, encontramos subexpressão de CD105 em quase todos os casos estudados (94,7%). Além disso, observamos que VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 apresentaram-se superexpressos em 53,6%, 85,7% e 62,5% dos pacientes, respectivamente. Este fato é relevante e reforça a ideia do aumento de atividade desses três genes no processo carcinogênico renal, através da indução da neoformação microvascular, fundamental à sobrevivência e progressão tumoral.

Os tecidos controles utilizados neste estudo foram derivados de pacientes portadores de estenose da junção ureteropielica que foram nefrectomizados devido ao quadro obstrutivo. Por este motivo, seria racional supormos que a expressão dos genes estudados nesses tecidos seja diferente daquela em rins totalmente normais, uma vez que a obstrução promove alterações fisiológicas renais, incluindo, dentre outras causas, o dano por hipóxia. Contudo, essa alteração decorrente de uma doença benigna não interferiu nos nossos achados aqui encontrados principalmente em relação à expressão de VEGF e seus receptores, os quais refletem um padrão de expressão gênica relativa concordante com a literatura mundial.

O gene CD105 está envolvido em diversos processos como a regulação de expressão dos componentes da matriz celular, proliferação, diferenciação e migração (Rabin, 2006; Service, 2008; Aachmann; Aune, 2009), com altos níveis de expressão em microvasos de tecidos benignos ou malignos em franca atividade metabólica (Lomonte; Gutierrez, 1989; Kudo et al., 1993; Fuh et al., 1998; Fonsatti et al., 2003). Embora a superexpressão de CD105 seja a regra em várias neoplasias humanas (Tang et al., 2006), no CCR esses achados são conflitantes. A expressão protéica de CD105 no tecido tumoral é correlacionada com invasão microvascular, mas parece haver uma correlação inversa entre a densidade vascular e a progressão do tumor.

Nas últimas décadas, numerosos estudos têm sido desenvolvidos para correlacionar os fatores angiogênicos e densidade microvascular (DMV) do tumor, com suas características clínicas e patológicas (Folkman, 1990; Albo et al., 1994; Schimming et al., 2004). A DMV foi determinada com anticorpo anti-CD105 e estabelecida como um fator independente de prognóstico, com níveis mais elevados relacionando-se diretamente com menor sobrevida câncer-específica. A intensidade da angiogênese medida pela densidade de microvasos tem sido associada com pior prognóstico em tumores de mama invasivo, próstata, ovário, colo de útero, carcinoma hepatocelular e endometrial (Kumar et al., 1999; Polverini et al., 2002; Saad et al., 2003; Yang et al., 2006; El-Gohary et al., 2007). Entretanto, parece bem estabelecido que a DMV em tumores renais, mesmo se apresentando diminuída, também exerce efeitos inibitórios no crescimento tumoral através da geração de inibidores de angiogênese (como a endostatina e a tumstatina) pela clivagem de componentes da matriz extracelular (Kalluri, 2003). Yildiz et al. (2008) relataram que a densidade microvascular no CCR foi inversamente associada à metástases, sobrevida do paciente, diâmetro do tumor e estágio, mas a DMV não foi um fator prognóstico. Da mesma forma, Imao et al., em 2004, relataram que DMV foi inversamente relacionada com a agressividade do tumor, mas não conseguiram defini-la como um fator prognóstico independente. MacLennan e Bostwick (1995) também pontuaram que a expressão da DMV não acrescentou informações prognósticas em CCR. Outros estudos, porém, observaram diferença significativa favorável na curva de sobrevida quando existia maior DMV em tumores de células claras (Hemmerlein et al., 2001; Rioux- Leclercq et al., 2001).

Nossos achados de subexpressão em quase a totalidade dos casos estudados podem ser explicados. Primeiro, a maioria dos CCR aqui estudados apresentou volume tumoral considerável e assim poderíamos supor menor densidade microvascular associada à fibrose e necrose do tumor. Segundo, tumores de grandes dimensões desenvolvem vasos sanguíneos de grande diâmetro e, consequentemente, menor expressão de CD105. Terceiro, o tecido utilizado como controle foi o rim normal, que, por sua própria fisiologia, apresenta alta taxa metabólica. Assim, quando analisamos mais criticamente nossos resultados, poderíamos sugerir que altos níveis de *turnover* celular seriam condições de ambos os tecidos, isto é, o neoplásico

maligno e o renal normal. Quarto, a expressão de CD105 poderia estar sob controle estrito pós-transcricional e, portanto, os níveis de RNAm não refletiriam a síntese protéica, como já proposto por Gomez-Esquer et al. (2004) em tumores de mama. Quinto, observações concordam com a hipótese de que o processo de crescimento e expansão tumoral ocorra na periferia e não propriamente no interior do tumor (Vajkoczy et al., 1999). Esse fato nos levaria a entender facilmente que maiores concentrações de CD105 estariam presentes na periferia ao invés da porção tumoral interna.

No presente estudo também examinamos a expressão de VEGF, VEGFR1 e VEGFR2, fatores angiogênicos determinantes no desenvolvimento e progressão da doença. Esses três genes mostraram um padrão de superexpressão na maioria dos casos, e este achado era por nós esperado, uma vez que esses efetores estão envolvidos no processo de neoformação microvascular tumoral.

O VEGF tem sido reconhecido como um componente importante da vascularização e do crescimento de tumores sólidos. Os níveis aumentados observados corroboram os achados da literatura, onde o CCR é caracterizado pela superprodução de VEGF devido à mutação de VHL e perda de função desse importante gene supressor de tumor (Kusmartsev et al., 2008). Altas taxas de produção de VEGF por células malignas levam à promoção do crescimento tumoral através dos efeitos angiogênicos e mitogênicos. A via tumorigênica renal tem sido amplamente estudada (Staehler et al., 2005; Ajaz et al., 2011). Na literatura, trabalhos avaliaram a relação do VEGF em CCR e correlacionaram esses resultados com as características clínicopatológicas e sobrevida. A maioria deles observou que a expressão proteica de VEGF estava presente em grande parte das células neoplásicas, mas não houve diferença de expressão entre os diferentes tipos da doença. A correlação entre a expressão de VEGF, o estadiamento do tumor e o prognóstico indica a importância deste gene no crescimento tumoral e progressão do CCR (Jacobsen et al., 2000; Jacobsen et al., 2004).

A superexpressão de VEGFR1 em 85,7% dos casos sugere um papel importante deste gene em tecidos neoplásicos e suporta o conceito de que tumores podem apresentar diferentes vias angiogênicas para estabelecer uma neovascularização. Ainda mais, a hiperatividade de VEGFR1 poderia estar

relacionada a um mecanismo adicional onde carcinomas de células claras subvertem os controles fisiológicos de regulação (Nicosia, 1998; Gunningham et al., 2001; Kusmartsev et al., 2008). Já está demonstrado que existe superexpressão de VEGFR1 em células epiteliais e estromais neoplásicas em relação ao tecido não tumoral. Além disso, também se observou que sua expressão é maior em carcinoma de células claras comparado ao cromóforo (Gunningham et al., 2001; Rivet et al., 2008). O VEGFR1 está relacionado a um aumento da regulação do ativador do plasminogênio do tipo uroquinase e seu inibidor (PAI-1) sugerindo um papel na migração de células endoteliais e remodelamento da matriz, e pode também ser encontrado no tecido neoplásico maligno e linfonodos de pacientes com câncer de pulmão, mama e linfomas (Kaplan et al., 2005; Ruan et al., 2006; Kusmartsev et al., 2008). Muitos estudos em CCR sugerem um papel direto do VEGFR1 na indução de neovascularização, migração de células neoplásicas e promoção de metástase (Shibuya; Claesson-Welsh, 2006), e este fato também é suportado por esta análise.

Avaliando a expressão do gene VEGFR2, encontramos superexpressão em praticamente dois terços dos casos. A atividade mais angiogênica do VEGF se propaga via VEGFR2, que é predominantemente expresso nas células endoteliais e seus precursores. A expressão do VEGFR2 é 3 a 5 vezes maior na vasculatura do tumor em relação à normal e, em células endoteliais, o VEGF estimula a expressão gênica de VEGFR2 por meio de um mecanismo de *feedback* negativo (Plate et al., 1994; Ferrara; Davis-Smyth, 1997). Por outro lado, em alguns tipos de tumores hematológicos como leucemias e linfomas, os níveis de expressão de VEGFR2 são praticamente nulos, mas células neoplásicas de sarcoma de Kaposi em pacientes com AIDS podem apresentar baixos níveis de VEGFR2 e 3 por possuírem um fenótipo intermediário entre células vasculares e linfáticas (Montaldo et al., 2000).

Um dos objetivos principais deste estudo foi o de analisar o comportamento de expressão desses quatro genes em relação aos fatores prognósticos bem estabelecidos para o CCR. Dessa forma, comparamos os níveis de expressão gênica com cada fator isoladamente no intuito de encontrar uma relação entre eles. De um modo geral, CD105 encontrou-se subexpresso e VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 estiveram superexpressos para estadiamento, grau nuclear de Fuhrman e invasão

microvascular, independente do subgrupo analisado, isto é, pT1-2 *versus* pT3-4, Fuhrman 1-2 *versus* 3-4 e IMV ausente *versus* presente.

Em relação ao estadiamento patológico, embora tenham sido pontuadas baixas concentrações de CD105 em ambos os grupos, os níveis de expressão gênica foram 74% maiores nos tumores pT3-4. Uma vez que VEGF, VEGFR1 e 2 estão envolvidos na formação de novos vasos tumorais, realmente esperávamos superexpressão desses genes.

No presente estudo apresentamos a expressão de CD105 em epitélio renal e, pela primeira vez, sua associação com fatores prognósticos do CCR do tipo células claras. Na literatura poucos trabalhos referenciam a utilidade da associação de CD105 com fatores prognósticos no intuito de se estabelecer ou prever o comportamento da doença. De acordo com Gasparini et al. (2000), existem diferenças estruturais em vasos intra-tumorais em comparação com outros vasos sangüíneos do organismo e normalmente a arquitetura da vasculatura tumoral é caracterizada por baixa diferenciação endotelial, malformação da membrana basal e fragilidade capilar. Em estudos imuno-histoquímicos, esta proteína aparece fortemente marcada no endotélio dos vasos sangüíneos de tecido neoplásico comparado aos tecidos normais, indicando que CD105 pode ser um poderoso marcador de neovascularização em tumores sólidos (Cheifetz et al., 1992).

Mesmo sem diferenças estatísticas, podemos verificar um aumento dos níveis de expressão de VEGF conforme o tumor progride para maior estágio. Estudos têm demonstrado que a expressão de VEGF pode estar associada à densidade microvascular e estadiamento (Takahashi et al., 1994; Nakagawa et al., 1997; Nicol et al., 1997; Tomisawa et al., 1999). A expressão proteica aumentada de VEGF tem sido relacionada à elevada densidade microvascular e estágio do tumor (Paradis et al., 2000). Outros trabalhos avaliando a expressão do VEGF e seus receptores concluíram que sua expressão se correlaciona com estadiamento e sobrevida, mas não se constituíram como fatores prognósticos independentes.

VEGFR2 foi associado com estadiamento, apresentando uma média de expressão quase três vezes maior no subgrupo pT1-2 em relação ao pT3-4. Esses achados podem estar ligados ao mecanismo de expressão através do qual as células tumorais e estromais ativadas expressam altos níveis de VEGF, mas baixas

concentrações de VEGFR2, ao mesmo tempo em que as células endoteliais da vasculatura tumoral exibem uma superexpressão do receptor. Estes padrões de expressão sugerem fortemente um *loop* parácrino de VEGF e VEGFR2 entre as células tumorais e endoteliais para a estimulação da angiogênese patológica, uma vez que expressão aumentada de VEGF leva a uma baixa expressão de VEGFR2 e vice-versa (Ferrara; Davis-Smyth, 1997; Carmeliet et al., 2001; Alitalo, Carmeliet, 2002). Ao contrário de nossos achados, Huang et al. (2011) demonstraram que alta expressão de VEGFR2 no carcinoma hepatocelular foi relacionado pior prognóstico e sobrevida reduzida.

A graduação nuclear de Fuhrman é outro fator prognóstico que auxilia na previsibilidade do comportamento da doença e tomada de decisões. Uma vez que graus mais elevados indicam maior indiferenciação nuclear e taxas mais altas de mitose e proliferação celular, seria lógico esperarmos níveis maiores de expressão em tumores de pior comportamento. Se levarmos em consideração o racional discutido anteriormente para o estadiamento patológico, fica claro entendermos que a graduação nuclear de Fuhrman segue os mesmos princípios e, quando analisamos os subgrupos Fuhrman 1-2 e 3-4, verificamos um aumento de praticamente 132%, 100% e 67% na expressão de CD105, VEGF e VEGFR2, respectivamente, conforme o grau nuclear evolui.

Poucos trabalhos estudaram a associação entre o grau nuclear de Fuhrman e o perfil de expressão dos genes relacionados com CCR. Embora não existam estudos que associem a expressão de CD105 com a graduação de Fuhrman, Djordjevic et al., em 2007, observaram que imuno-marcação de VEGF maior que 75% nas células neoplásicas de CCR se associaram com maiores graus de Fuhrman, com difusa distribuição citoplasmática de VEGF. Desse modo, concluem que maior imuno-expressão de VEGF é parâmetro de pior prognóstico.

Evidências instituem a invasão microvascular como um fator prognóstico de fundamental importância na previsão de comportamento tumoral (Dall'Oglio et al., 2007). Os achados aqui encontrados demonstram desempenhos bastante coerentes para CD105 e VEGF, onde níveis de expressão maiores estão associados à presença de IMV. Mesmo sem observarmos diferenças estatísticas para CD105 e uma diferença marginal para VEGF, é interessante pontuarmos um aumento aproximado

de 167% e 212% na expressão de CD105 e VEGF respectivamente, quando esse fator negativo de prognóstico está presente, e pode indicar casos mais agressivos de câncer renal.

Yildiz et al. (2008) avaliando 48 espécimes de CCR quanto à expressão de VEGF e Ki-67 demonstraram uma associação entre invasão microvascular e superexpressão de VEGF e Ki-67 concluindo que a maior expressão desses genes pode ser forte indicador de prognóstico desfavorável.

Segundo os critérios de Dall'Oglio et al. (2007), pode-se antecipar o comportamento de tumores renais através da análise dos fatores prognósticos envolvidos neste estudo. Desse modo, pacientes podem ser enquadrados em grupos de bom, intermediário e mau prognóstico e essa classificação permite uma previsibilidade específica de sobrevida.

Observações importantes podem ser inferidas sobre o gene CD105. Um perfil de subexpressão é observado nos grupos de prognóstico bom e intermediário, enquanto que, para o grupo de prognóstico ruim, o nível médio de expressão é igual ao do tecido renal não neoplásico. Embora a subexpressão seja a regra, verificamos uma expressão crescente conforme piora o comportamento do tumor. Todos os três pacientes que apresentaram este gene superexpresso se encontravam no grupo de pior prognóstico podendo, desta forma, a superexpressão ser um marcador de gravidade nesse grupo de comportamento ruim. Quando comparamos os perfis de expressão de CD105 entre os três grupos, observamos que ele foi capaz de distinguir os grupos de prognóstico bom e intermediário do grupo de mau prognóstico. Este fato tem relevância quando consideramos as características relativas à agressividade tumoral e à evolução da doença e seus impactos diretos na sobrevida do paciente. Assim, poderíamos sugerir a utilização dessa molécula na prática clínica como um marcador prognóstico. Além disso, confirmamos os achados já estabelecidos na literatura quando mostramos evidente progressão positiva da expressão de CD105 conforme o tumor evolui para pior comportamento e prognóstico. Esse evento certamente está diretamente relacionado ao papel crucial da endogлина na neovascularização, crescimento e progressão do CCR. Portanto, seria possível supor que estratégias de biologia molecular para bloqueio da atividade biológica de CD105 são cabíveis, na tentativa de inibição de sua expressão e consequente redução e controle da doença.

Diferente de CD105, VEGFR1 mostrou progressão decrescente de seus níveis médios de expressão conforme a evolução da doença, embora diferenças não tenham sido observadas. Os genes VEGF e VEGFR2 não apresentaram um comportamento linear racional segundo o esperado, quando analisamos os grupos classificados pelos três fatores prognósticos aqui estabelecidos e, desse modo, eles não foram capazes de definir comportamento do CCR.

Encontramos associação entre a expressão de CD105 e metástases, que apresentou uma expressão três vezes maior em pacientes que possuíam metástases presentes. Este achado torna-se de grande importância quando discutimos o papel da angiogênese no processo metastático, vislumbrando um potencial marcador prognóstico em CCR avançado.

Alguns autores já confirmaram nossos achados. Schimming e Marmé (2002), em estudo imuno-histoquímico também observaram maior expressão de CD105 em carcinoma espinocelular de cavidade oral com metástases regionais. Já Li et al. (2000), avaliando as concentrações plasmáticas de CD105 demonstraram que a endoglina pode ser um marcador angiogênico valioso em pacientes com câncer de mama e que valores elevados associaram-se à doença metastática.

Considerando a associação entre CD105 e a presença de CCR disseminado, alguns autores apresentaram achados opostos aos nossos resultados. Em 2006, Sandlund et al., através de técnica de *microarray*, ressaltaram que a superexpressão de CD105 traduziu melhor comportamento e prognóstico do CCR. Contudo, outros trabalhos não observaram diferenças quando analisaram o perfil plasmático de atividade gênica de CD105 em portadores de tumores gástricos e colorretais (Mysliwiec et al., 2008; Mysliwiec et al., 2009b).

VEGF apresentou-se 3,3 vezes mais superexpresso quando metástases estiveram presentes com diferença estatística marginal ($p = 0,06$). Seguindo a mesma linha, VEGFR1 também mostrou aumento de expressão quando a doença tornou-se metastática. O comportamento de VEGFR2 foi inverso, demonstrando diminuição dos níveis de expressão com a evolução para doença disseminada metastática. O que podemos observar mais uma vez é uma relação inversa de expressão de CD105 e VEGFR2, conforme discutido anteriormente.

Parece existir uma atividade complementar de VEGF e CD105 e antagônica de VEGF e VEGFR2 sobre o fenômeno de neoformação da microvasculatura tumoral. Esses achados associam CD105 e VEGF ao pior comportamento e maior progressão tumoral e, ao mesmo tempo, relacionam VEGFR2 com estágio mais precoce da doença.

Algumas limitações do presente estudo merecem ser comentadas. Não foram realizadas em nossa análise curvas de sobrevida relacionadas à expressão dos genes aqui avaliados porque nosso banco de tumores é uma aquisição recente, ainda não permitindo seguimento adequado para uma correta correlação entre a expressão dos genes e sobrevida. O acompanhamento dos pacientes continuará sendo feito e uma análise futura de sobrevida será realizada para complementar nossos achados.

Mesmo com essas limitações, acreditamos que nosso estudo apresenta dados relevantes que caracterizam não só o perfil de expressão destes marcadores de angiogênese no CCR, como também suas relações com os fatores prognósticos e doença metastática.

Por fim, uma vez que identificamos a importância do CD105 e suas associações positivas com os grupos prognósticos, especulamos a utilização da expressão gênica de CD105 como marcador prognóstico, na tentativa de distinguir pacientes que evoluirão de forma não satisfatória e com sobrevida reduzida daqueles com bom comportamento tumoral e prognóstico favorável. Esse fato poderia futuramente permitir a identificação mais precoce dos grupos de risco e um manejo mais adequado para o controle dessa doença.

6 CONCLUSÕES

O gene CD105 mostrou-se subexpresso, enquanto que VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 demonstraram um padrão de superexpressão na grande maioria dos casos de CCR do tipo células claras.

Maiores níveis de CD105 estiveram significativamente relacionados com mau prognóstico e com doença metastática.

Maior expressão de VEGFR2 foi associada com estágios mais precoces (pT1-2) do carcinoma de células renais.

Anexo A – Termo de Aprovação da CAPPesq

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28/04/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0049/10**, intitulado: **"ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES CD105, VEGF E VEGFR NO CARCINOMA RENAL: IMPLICAÇÕES PROGNÓSTICAS "** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa [Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c"].

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio**
Pesquisador (a) Executante: **Daniel Kanda Abe, Sabrina Abe, Katia R.M. Leite, José Pontes Junior, Juliana Sousa Canavez, Alberto Azoubel Antunes, Alexandre Crippa Sant'anna, Miguel Srougi**

CAPPesq, 30 de Abril de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo B – Termo de Mudança de Título **Serviço de Pós-Graduação**

Rua Teodoro Sampaio, 115 – 1º andar
Prédio do Instituto Oscar Freire
CEP 05405-000 - São Paulo – SP – Brasil
Fone: (11) 3061-8203/04/05 – Fax: 3061-8215

São Paulo, 04 de outubro de 2012.

À
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

ASSUNTO: MUDANÇA DE TÍTULO

Nome: Daniel Kanda Abe
Orientador/a: Prof. Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio
Programa: . Programa de Urologia. Curso: () Mestrado (X) Doutorado

Solicito a V. S^{as}. análise de mudança do título da minha () Dissertação de Mestrado (X) Tese de Doutorado.

DE: Análise da expressão dos genes CD105, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no carcinoma de células renais: Implicações prognósticas.

PARA: Análise da expressão dos genes CD105 (endoglin), VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no carcinoma de células renais e correlação com fatores prognósticos.

JUSTIFICATIVA: Sugestão da banca examinadora durante a qualificação.

Prof. Dr. Marcos F. Dall'Oglio
Assinatura do(a) Orientador(a)

Assinatura do Coordenador(a)
Prof. Dr. Homero Bruschini
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em
Ciências - Urologia

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : _____ SSP/ SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: / /

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____

CIDADE: _____

TELEFONE: DDD () _____

2. RESPONSÁVEL LEGAL: _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:, Nº

BAIRRO:

CIDADE:

TELEFONE: DDD.....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Análise da Expressão de CD105 (endoglina), VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 em Carcinoma de Células Renais e correlação com Fatores Prognósticos

2. PESQUISADOR : Dr. Marcos Francisco Dall'Oglio

CARGO/FUNÇÃO: Médico Urologista, chefe do Setor de Uro-oncologia do ICESP/FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: Nº 84860

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Cirurgia, disciplina de Urologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

- 1 – O objetivo desse estudo é avaliar um novo marcador para definir o prognóstico do câncer de Rim.
- 2 – O trabalho será realizado utilizando parte do tecido que foi retirado durante a sua cirurgia, não acarretará nenhum prejuízo a sua pessoa ou ao próprio material que continuará preservado para seu interesse futuro.
- 3 – Não será necessário fazer nenhum procedimento adicional.
- 4 – Portanto esta pesquisa não lhe traz nenhum desconforto e nenhum risco.
- 5 – Não há benefício direto para o senhor, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício para os pacientes, que poderá ser uma nova ferramenta para a descoberta ou para descartar a hipótese do câncer de Rim, ou ainda definir qual o grau de malignidade do seu tumor.
- 6 – Como não há procedimentos adicionais a serem feitos, não existem procedimentos alternativos.
- 7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dr. **Marcos Francisco Dall'Oglio**, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255- 7º andar, Telefone (011) 3069 – 8080. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- 09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.
- 10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
- 11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer

despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Análise da Expressão dos genes CD105 (endoglin), VEGF, VEGFR1, VEGFR2 no Carcinoma de Células Renais e correlação com Fatores Prognósticos”. Eu discuti com o Dr **Marcos Francisco Dall’Oglio** ou seus assistentes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Dr. Marcos Francisco Dall’Oglio
(responsável pelo estudo)

Data ____ / ____ / ____

Anexo D – Protocolo de Extração de RNA

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE TECIDO CONGELADO

RNAqueous™ RNA Isolation Kit (Ambion®)

1. Medir ou estimar o peso da amostra
2. Macerar o tecido em nitrogênio líquido ou macerador
3. Adicionar 10 volumes da solução de lise (Lysis/Binding Buffer)
4. Adicionar igual volume de etanol 64%
5. Deixar a mistura no gelo por 10 minutos
6. Vortex 30-60 segundos
7. Transferir a solução para coluna GFX (volume máximo de 700 µL)
8. Centrifugar a 10.000 rpm por 1 minuto
9. Adicionar 700 µL de *wash solution* 1 e centrifugar 5-10 segundos
10. Adicionar 500 µL de *wash solution* 2/3 e centrifugar 5-10 segundos (1ª vez)
11. Adicionar 500 µL de *wash solution* 2/3 e centrifugar 5-10 segundos (2ª vez)
12. Depois de descartar o filtrado, centrifugar por 1 minuto a 10.000g temperatura ambiente, os tubos vazios para secar e remover resíduos
13. Transfira o FILTRO para um novo tubo e adicionar 50 µL de H₂O pré aquecida a 80 °C (Elution Solution) e fechar o tubo
14. Centrifugar 10.000g temperatura ambiente por 20-30 segundos
15. Quantificar as amostras e armazenar em freezer – 80° C

Anexo E – Dados demográficos, características tumorais e valores de expressão dos genes nos 56 pacientes com câncer renal participantes do estudo

R.G.H.C	Nome	Sexo	Idade	Tamanho (cm)	Componente sarcomatoide	Grau De Fuhrman	Invasão Microvascular	T	N	M	CD105	VEGF	VEGFR1	VEGFR2
13480478I	EJBR r41	M	52	1.5	Ausente	1	Ausente	1.1	x	0	0,63	0,32	2,94	3,98
13873028C	EN r79	M	81	3.7	Ausente	1	Ausente	1.1	x	0	0,07	0,86	2,45	1,13
1385755J	FCD r73	M	75	5.5	Ausente	2	Ausente	1.2	0	0	0,15	0,26	2,23	0,70
293713D	FCN r52	M	78	4.5	Ausente	2	Ausente	1	x	0	0,33	3,08	25,43	2,17
13495818B	HAFH r60	M	81	5	Ausente	2	Ausente	1.2	x	0	0,19	1,31	5,58	1,70
13845316D	IMN r28	M	55	6.0	Ausente	2	Ausente	1.2	x	0	0,40	4,36	13,28	3,22
13793143D	JMF r50	M	62	3.5	Ausente	2	Ausente	1.2	x	0	0,14	0,08	0,38	0,13
60001871G	JLNR r81	M	52	6.5	Ausente	2	Ausente	1.1	x	0	0,14	0,71	1,82	0,49
3286490F	OM r15	M	61	3.5	Ausente	2	Ausente	1.1	x	0	0,01	1,26	6,48	1,94
2921262H	PNC r30	F	63	3.5	Ausente	2	Ausente	1.1	x	0	0,95	0,39	12,12	2,60
13888650B	RAS r89	M	52	5,5	Ausente	2	Ausente	1.2	x	0	0,81	6,91	15,62	6,96
13858102I	TRF r17	F	48	2.5	Ausente	2	Ausente	1.1	x	0	0,06	0,77	17,57	8,28
55373257F	EG r13	M	38	7.0	Ausente	2	Ausente	1.1	x	0	0,23	14,88	14,38	4,62
13848644C	MBSF r6	F	68	3.5	Ausente	2	Ausente	1.1	x	0	0,01	0,53	0,66	0,81
88220871J	ARO r56	F	58	5,8	Ausente	2	Ausente	1.2	x	0	0,29	3,86	10,57	3,43

60001927A	MLAS r91	F	56	5,5	Ausente	2	Ausente	1	x	0	0,03	0,04	0,42	0,15
13776288	MLN r140	F	58	1,4	Ausente	2	Ausente	1.1	x	0	0,22	1,23	3,70	2,20
13834404	MSBS r142	F	78	2.8	Ausente	1	Ausente	1	x	0	0,09	0,57	0,61	0,61
60002340	FSG r124	M	42	4.1	Ausente	1	Ausente	1.1	x	0	0,46	2,85	10,17	3,20
60002073J	PSS r107	M	73	7.6	Ausente	2	Ausente	1.2	x	0	0,39	0,91	3,60	2,31
13827901A	CV r53	M	60	5.5	Ausente	3	Ausente	1	x	0	0,08	2,00	2,26	1,02
13844192H	MAB r25	F	62	7.0	Ausente	4	Ausente	3.1	x	0	0,44	3,33	12,53	4,31
2601668H	PP r47	M	57	4.5	Ausente	3	Ausente	1.2	x	0	0,47	0,77	3,30	16,59
55710170A	REM r49	M	52	4.0	Ausente	3	Ausente	1	x	0	0,49	0,51	2,34	7,43
13888576E	WM r95	M	76	8.5	Ausente	4	Ausente	4	0	0	0,13	0,52	1,51	0,20
5216047A	AD r117	M	64	6.0	Ausente	3	Ausente	3.1	x	0	0,13	0,77	2,70	1,04
60002875	MBP r132	M	69	14.0	Ausente	2	Ausente	3.1	x	0	0,11	1,30	2,47	0,48
60003231	JAA r148	M	82	4.5	Ausente	3	Ausente	1.2	x	0	0,79	2,63	19,03	6,23
13890019H	LDB r103	M	61	3.0	Ausente	3	Ausente	1.1	x	0	0,83	1,58	3,89	62,12
60002298B	WTJ r111	M	43	9.0	Ausente	2	Presente	2.1	x	0	0,03	0,09	0,69	0,30
13921091K	JJS R159	M	56	11.5	Ausente	3	Ausente	3.2	x	0	0,10	4,56	2,29	0,33
60003951	EL R180	M	62	6.1	Ausente	3	Presente	3.1	0	0	0,04	1,13	0,66	0,24

13876700	JIS R181	M	52	9	Ausente	3	Ausente	2.1	x	0	0,23	4,79	8,59	1,89
2942110A	ACA r82	F	48	11	Ausente	2	Ausente	2	0	0	0,16	0,56	4,51	2,00
60002562	JAO r144	M	67	7.5	Ausente	2	Ausente	2.1	x	0	0,34	0,25	45,70	34,32
60003400	NRO r154	F	64	16	Ausente	3	Ausente	4	x	0	0,13	1,52	1,43	0,99
13857604C	CLFMM r9	F	56	10.0	Presente	4	Presente	4	x	1	7,92	64,53	26,27	2,55
13833035E	CLB r10	M	45	5.5	Ausente	3	Presente	1.2	x	0	1,65	3,21	3,75	18,56
60001395F	NES r59	F	65	11	Ausente	3	Presente	3.1	0	0	0,29	23,00	3,33	0,57
13870101E	VBR r34	M	59	15.0	Ausente	3	Presente	2	0	1	0,61	1,34	1,95	9,67
55724209E	FBAB r108	M	79	6	Ausente	3	Presente	3.2	0	1	0,23	1,28	3,143	6,94
60001237D	MNA R45	M	69	12.0	Ausente	2	Ausente	3.1	x	1	0,69	0,54	1,73	1,15
2449545	MCO R150	F	59	7.3	Ausente	4	Ausente	3.1	1	0	0,44	3,34	6,37	3,82
3356401J	EAM R151	F	56	12.5	Ausente	3	Presente	3.2	0	0	0,13	0,30	1,02	0,22
13882415	RSL R152	F	70	16.0	Ausente	3	Ausente	3.1	x	1	1,07	3,30	24,46	6,08
60003439	IMN r149	F	72	4.0	Presente	4	Ausente	3.1	x	0	0,69	1,74	16,29	7,44
13908732	JFO r147	M	65	11.0	Presente	4	Presente	4	x	0	0,10	0,28	1,10	0,49
60001779C	SGC r86	M	67	15.0	Ausente	3	Presente	3.2	0	0	0,16	1,88	3,30	0,92
60002111	MMM R166	F	72	13.8	Presente	4	Presente	4	x	1	0,03	0,27	0,40	0,27

60003363	JBA r158	M	53	8	Ausente	3	Presente	3.1	x	0	0,17	0,39	1,91	0,50
12009903053	BJC r67	M	64	6.0	Ausente	2	Ausente	1.2	0	1	0,03	0,84	0,59	0,16
2205451A	JSC r44	M	52	5.5	Ausente	2	Ausente	1.2	x	1	0,21	10,94	9,81	2,92
13769482B	RDA r88	M	34	10	Ausente	4	Ausente	3	1	1	0,07	0,25	1,46	0,59
60004062	OCOC R162	M	59	10.5	Ausente	2	Presente	3.1	0	1	0,10	0,27	11,51	1,25
60002481	AT r118	M	58	7.0	Ausente	3	Ausente	4	x	1	0,11	2,29	4,48	0,37
13911883	JNS R156	M	64	12.4	Ausente	2	Ausente	3.1	x	1	0,72	10,35	20,41	10,24

8 *REFERÊNCIAS*

Aachmann FL, Aune TEV. Use of cyclodextrin and its derivatives for increased transformation efficiency of competent bacterial cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;83(3):589-96.

Ajaz S, Khaliq S, Abid A, Hassan AS, Hashmi A, Sultan G, Mohsin R, Mubarrak M, Naqvi SA, Rizvi SA, Mehdi SQ. Association of a Single-Nucleotide Polymorphism in the Promoter Region of the VEGF Gene with the Risk of Renal Cell Carcinoma. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011;15(9):653-7.

Albo D, Granick MS, Jhala N, Atkinson B, Solomon MP. The relationship of angiogenesis to biological activity in human squamous cell carcinomas of the head and neck. *Ann Plast Surg*. 1994;32(6):588-94.

Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*. 2002;1(3):219-27.

American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual*. 7th New York : Springer; 2010.

Bando H. Vascular endothelial growth factor and bevacitumab in breast cancer. *Breast Cancer*. 2007;14(2):163-73.

Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem*. 1999;274(2):584-94.

Bodey B, Bodey BJr, Siegel SE, Kaiser H. E. Immunocytochemical detection of endoglin is indicative of angiogenesis in malignant melanoma. *Anticancer Res*. 1998;18(4A):2701-10.

Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, VandenDriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001;7(5):575-83.

Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005; 69(Suppl 3):4-10.

Catalano C, Fraioli F, Laghi A, Napoli A, Pediconi F, Danti M, Nardis P, Passariello R. High-resolution multidetector CT in the preoperative evaluation of patients with renal cell carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*. 2003;180(5):1271-7.

Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992;267(27):19027-30.

Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem*. 1996;271(30):17629-34.

Crundwell M. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. *BJU Int*. 2004; 94(4):675.

Dall'Oglio MF, Lieberknecht M, Gouveia V, Sant'Anna AC, Leite KR, Srougi M. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma: prognostic implications. *Int Braz J Urol*. 2005;31(1):10-6.

Dall'Oglio MF, Antunes AA, Sarkis AS, Crippa A, Leite KR, Lucon AM, Srougi M. Microvascular tumour invasion in renal cell carcinoma: the most important prognostic factor. *BJU Int*. 2007;100(3):552-5.

Dall'Oglio MF, Antunes AA, Pompeu AC, Mosconi A, Leite KR, Srougi M. Prognostic relevance of the histological subtype of renal cell carcinoma. *Int Braz J Urol*. 2008;34(1):3-8.

Dall'Oglio MF, Srougi M, Nesrallah L, Leite KM, Hering F, Bomfim AC, Sanudo A. Must the TNM staging of the renal cell carcinoma be modified again?. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49(1):86-90.

Dallas NA, Samuel S, Xia L, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Ellis LM. Endoglin (CD105): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. *Clin Cancer Res*. 2008;14(7):1931-7.

Dassoulas K, Gazouli M, Theodoropoulos G, Christoni Z, Rizos S, Zisi-Serbetzoglou A, Glava C, Karantanos T, Klonaris C, Karakitsos P. Vascular endothelial growth factor and endoglin expression in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(5):703-8

Decastro GJ, McKiernan JM. Epidemiology, clinical staging, and presentation of renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am*. 2008;35(4):581-92.

Delahunt B, Nacey JN. Renal cell carcinoma. II. Histological indicators of prognosis. *Pathology*. 1987;19(3):258-63.

Dinan MA, Curtis LH, Hammill BG, Patz EF Jr, Abernethy AP, Shea AM, Schulman KA. Changes in the use and costs of diagnostic imaging among Medicare beneficiaries with cancer, 1999-2006. *JAMA*. 2010;303(16):1625-31.

Djordjevic G, Mozetic V, Mozetic DV, Licul V, Ilijas KM, Mustac E, Oguic R, Fuckar Z, Jonjic N. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear cell renal cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2007;203(2):99-106.

Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003;17(9):984-92.

El-Gohary YM, Silverman JF, Olson PR, Liu YL, Cohen JK, Miller R, Saad RS. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2007;127(4):572-9.

Elson PJ, Witte RS, Trump DL. Prognostic factors for survival in patients with recurrent or metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1988;48(24 Pt 1):7310-3.

Fernández-Ruiz E, St-Jacques S, Bellón T, Letarte M, Bernabéu C. Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34-->qter. *Cytogenet Cell Genet*. 1993;64(3-4):204-7.

Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18(1):4-25.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.

Ficarra V, Righetti R, Pilloni S, D'amico A, Maffei N, Novella G, Zanolla L, Malossini G, Mobilio G. Prognostic factors in patients with renal cell carcinoma: retrospective analysis of 675 cases. *Eur Urol*. 2002;41(2):190-8.

Fisher RI, Rosenberg SA, Fyfe G. Long-term survival update for high-dose recombinant interleukin-2 in patients with renal cell carcinoma. *Cancer J Sci Am*. 2000; 6(Suppl 1):S55-7.

Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182-6.

Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*. 1990 Jan 3;82(1):4-6.

Folkman J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and metastasis: introduction. *Cancer Metastasis Rev*. 1990;9(3):171-4.

Fonsatti E, Del Vecchio L, Altomonte M, Sigalotti L, Nicotra MR, Coral S, Natali PG, Maio M. Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol*. 2001;188(1):1-7.

Fonsatti E, Altomonte M, Nicotra MR, Natali PG, Maio M. Endoglin (CD105): a powerful therapeutic target on tumor-associated angiogenetic blood vessels. *Oncogene*. 2003;22(42):6557-63.

Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumour angiogenesis. *J Pathol*. 1996;179(3):232-7.

Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1998;273(18):11197-204.

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1982;6(7):655-63.

Gill IS, Remer EM, Hasan WA, Strzempkowski B, Spaliviero M, Steinberg AP, Kaouk JH, Desai MM, Novick AC. Renal cryoablation: outcome at 3 years. *J Urol*. 2005;173(6):1903-7.

Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296-305.

Gómez-Esquer F, Agudo D, Martínez-Arribas F, Nuñez-Villar MJ, Schneider J. mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer. *Anticancer Res*. 2004;24(3a):1581-5.

Gonçalves PD, Srougi M, Dall'lio MF, Leite KR, Ortiz V, Hering F. Low clinical stage renal cell carcinoma: relevance of microvascular tumor invasion as a prognostic parameter. *J Urol*. 2004;172(2):470-4.

Gougos A, Letarte M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol.* 1988;141(6):1925-33.

Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Turner K, Scott PA, Robinson BA, Harris AL, Fox SB. Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expression in renal cell carcinomas: regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *Cancer Res.* 2001;61(7):3206-11.

Hallscheidt PJ, Bock M, Riedasch G, Zuna I, Schoenberg SO, Autschbach F, Soder M, Noeldge G. Diagnostic accuracy of staging renal cell carcinomas using multidetector-row computed tomography and magnetic resonance imaging: a prospective study with histopathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr.* 2004;28(3):333-9.

Hemmerlein B, Scherbening J, Kugler A, Radzun HJ. Expression of VCAM-1, ICAM-1, E- and P-selectin and tumour-associated macrophages in renal cell carcinoma. *Histopathology.* 2000;37(1):78-83.

Hemmerlein B, Kugler A, Ozisik R, Ringert RH, Radzun HJ, Thelen P. Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. *Virchows Arch.* 2001;439(5):645-52.

Huang J, Zhang X, Tang Q, Zhang F, Li Y, Feng Z, Zhu J. Prognostic significance and potential therapeutic target of VEGFR2 in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol.* 2011;64(4):343-8.

Imao T, Egawa M, Takashima H, Koshida K, Namiki M. Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int J Urol.* 2004;11(11):948-53.

Jacobsen J, Rasmuson T, Grankvist K, Ljungberg B. Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol.* 2000;163(1):343-7.

Jacobsen J, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A, Landberg G, Ljungberg B. Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2004;93(3):297-302.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(5):277-300.

John G, Semelka RC, Burdeny DA, Kelekis NL, Woosley JT, Kettritz U, Freeman JA. Renal cell cancer: incidence of hemorrhage on MR images in patients with chronic renal insufficiency. *J Magn Reson Imaging*. 1997;7(1):157-60.

Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):422-33.

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-7.

Kattan MW, Reuter V, Motzer RJ, Katz J, Russo P. A postoperative prognostic nomogram for renal cell carcinoma. *J Urol*. 2001;166(1):63-7.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008;358(19):2039-49.

Kim HL, Belldegrun AS, Freitas DG, Bui MH, Han KR, Dorey FJ, Figlin RA. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol*. 2003;170(5):1742-6.

Kim JK, Kim TK, Ahn HJ, Kim CS, Kim KR, Cho KS. Differentiation of subtypes of renal cell carcinoma on helical CT scans. *AJR Am J Roentgenol*. 2002;178(6):1499-506.

Klöppel G, Knöfel WT, Baisch H, Otto U. Prognosis of renal cell carcinoma related to nuclear grade, DNA content and Robson stage. *Eur Urol*. 1986;12(6):426-31.

Kowanetz M, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res*. 2006;12(17):5018-22.

Kudo I, Murakami M, Hara S, Inoue K. Mammalian non-pancreatic phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1170(3):217-31.

Kumar S, Ghellal A, Li C, Byrne G, Haboubi N, Wang JM, Bundred N. Breast carcinoma: vascular density determined using CD105 antibody correlates with tumor prognosis. *Cancer Res*. 1999;59(4):856-61.

Kusmartsev S, Eruslanov E, Kübler H, Tseng T, Sakai Y, Su Z, Kaliberov S, Heiser A, Rosser C, Dahm P, Siemann D, Vieweg J. Oxidative stress regulates expression of

VEGFR1 in myeloid cells: link to tumor-induced immune suppression in renal cell carcinoma. *J Immunol.* 2008;181(1):346-53.

Lam JS, Leppert JT, Belldegrun AS, Figlin RA. Novel approaches in the therapy of metastatic renal cell carcinoma. *World J Urol.* 2005;23(3):202-12.

Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh F-M, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, Schmidt L, Zhou F, Li H, Ming Hui Wei Chen F, Glenn G, Choyke P, Walther MM, Weng Y. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* 1993;260(5112):1317-20.

Lebret T, Poulain JE, Molinie V, Herve JM, Denoux Y, Guth A, Scherrer A, Botto H. Percutaneous core biopsy for renal masses: indications, accuracy and results. *J Urol.* 2007;178(4 Pt 1):1184-8; discussion 1188

Lee CT, Katz J, Shi W, Thaler HT, Reuter VE, Russo P. Surgical management of renal tumors 4 cm. or less in a contemporary cohort. *J Urol.* 2000;163(3):730-6.

Lee CT, Katz J, Fearn PA, Russo P. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol.* 2002;7(4):135-40.

Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU Int.* 2008;101(8):949-58.

Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2000;14(1):55-64.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

Lohse CM, Blute ML, Zincke H, Weaver AL, Cheville JC. Comparison of standardized and nonstandardized nuclear grade of renal cell carcinoma to predict outcome among 2,042 patients. *Am J Clin Pathol.* 2002;118(6):877-86.

Lomonte B, Gutiérrez JM. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon.* 1989;27(7):725-33.

López-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(4):H959-74.

Lucas SM, Cadeddu JA. The importance of nephron-sparing focal therapy: renal function preservation. *J Endourol.* 2010;24(5):769-74.

MacLennan GT, Bostwick DG. Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance. *Urology.* 1995;46(1):27-30.

Makhni E. Angiogenesis: An Examination of both Tumorigenic and Rehabilitative Properties. *J MUR.* 2003; 8:23-6.

Massague J. Identification of receptors for type-beta transforming growth factor. *Methods Enzymol.* 1987;146:174-95.

Montaldo F, Maffe A, Moroni M, Noonan D, Giordano S, Albini A, Prat M. Expression of functional tyrosine kinases on immortalized Kaposi's sarcoma cells. *J Cell Physiol.* 2000;184(2):246-54.

Mor V, Laliberte L, Morris JN, Wiemann M. The Karnofsky Performance Status Scale. An examination of its reliability and validity in a research setting. *Cancer.* 1984;53(9):2002-7.

Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24(35):5601-8.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356(2):115-24.

Mysliwiec P, Pawlak K.; Kuklinski A, Kedra B. Combined perioperative plasma endoglin and VEGF-A assessment in colorectal cancer patients. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008;46(4):487-92.

Mysliwiec P, Pawlak K, Bandurski R, Kedra B. Soluble angiogenesis markers in gastric tumor patients. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009b;47(1):81-6

Mysliwiec P, Pawlak K, Kuklinski A, Kedra B. Combined perioperative plasma endoglin and VEGF: a assessment in colorectal cancer patients. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009a;47(2):231-6.

Nakagawa M, Emoto A, Hanada T, Nasu N, Nomura Y. Tubulogenesis by microvascular endothelial cells is mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal cell carcinoma. *Br J Urol*. 1997;79(5):681-7.

Neuzillet Y, Lechevallier E, Andre M, Daniel L, Coulanges C. Accuracy and clinical role of fine needle percutaneous biopsy with computerized tomography guidance of small (less than 4.0 cm) renal masses. *J Urol*. 2004;171(5):1802-5.

Nguyen MM, Gill IS, Ellison LM. The evolving presentation of renal carcinoma in the United States: trends from the Surveillance, Epidemiology, and End Results program. *J Urol*. 2006;176(6 Pt 1):2397-400; discussion 2400.

Nicol D, Hii SI, Walsh M, Teh B, Thompson L, Kennett C, Gotley D. Vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma. *J Urol*. 1997;157(4):1482-6.

Nicosia RF. What Is the Role of Vascular Endothelial Growth Factor-Related Molecules in Tumor Angiogenesis? *Am J Pathol*. 1998;153(1):11-6.

Nikiteas NI, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Atsaves V, Christoni Z, Karakitsos P, Lazaris AC, Papachristodoulou A, Klonaris C, Gazouli M. Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2007;10(1):12-7.

Page DL, Jensen RA. Angiogenesis in human breast carcinoma: what is the question?. *Hum Pathol*. 1995;26(11):1173-4.

Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, Benoît G, Jardin A, Bedossa P. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch*. 2000;436(4):351-6.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.

Pedrosa I, Alsop DC, Rofsky NM. Magnetic resonance imaging as a biomarker in renal cell carcinoma. *Cancer*. 2009;115(10 Suppl):2334-45.

Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int J Cancer*. 1994;59(4):520-9.

Polverini P. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *J Dent Educ.* 2002;66(8):962-75.

Rabin S. The human use of humanoid beings: chimeras and patent law. *Nat Biotechnol.* 2006;24(5):517-9.

Rioux-Leclercq N, Epstein JI, Bansard JY, Turlin B, Patard JJ, Manunta A, Chan T, Ramee MP, Lobel B, Moulinoux JP. Clinical significance of cell proliferation, microvessel density, and CD44 adhesion molecule expression in renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2001;32(11):1209-15.

Rivet J, Mourah S, Murata H, Mounier N, Pisonero H, Mongiat-Artus P, Teillac P, Calvo F, Janin A, Dosquet C. VEGF and VEGFR-1 are coexpressed by epithelial and stromal cells of renal cell carcinoma. *Cancer.* 2008;112(2):433-42.

Ross PL, Scardino PT, Kattan MW. A catalog of prostate cancer nomograms. *J Urol.* 2001;165(5):1562-8.

Ruan J, Hyjek E, Kermani P, Christos PJ, Hooper AT, Coleman M, Hempstead B, Leonard JP, Chadburn A, Rafii S. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(19):5622-31.

Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, Silverman JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2003;22(3):248-53.

Sandlund J, Hedberg Y, Bergh A, Grankvist K, Ljungberg B, Rasmuson T. Endoglin (CD105) expression in human renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2006;97(4):706-10.

Schimming R, Marmé D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck.* 2002;24(2):151-6.

Schimming R, Reusch P, Kuschnierz J, Schmelzeisen R. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance?. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004;32(3):176-81.

Service RF. Nobel Prize in chemistry. Three scientists bask in prize's fluorescent glow. *Science.* 2008 Oct 17;322(5900):361.

Schuetz AN, Yin-Goen Q, Amin MB, Moreno CS, Cohen C, Hornsby CD, Yang WL, Petros JA, Issa MM, Pattaras JG, Ogan K, Marshall FF, Young AN. Molecular

classification of renal tumors by gene expression profiling. *J Mol Diagn.* 2005;7(2):206-18.

Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39(5):469-78.

Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* 2006;312(5):549-60.

Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31283-8.

Shinmoto H, Yuasa Y, Tanimoto A, Narimatsu Y, Jinzaki M, Hiramatsu K, Mukai M. Small renal cell carcinoma: MRI with pathologic correlation. *J Magn Reson Imaging.* 1998;8(3):690-4.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):10-29.

Sobin LH. TNM: evolution and relation to other prognostic factors. *Semin Surg Oncol.* 2003;21(1):3-7.

Staehler M, Rohrmann K, Hasake N, Stief CG, Siebels M. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Curr Drug Targets.* 2005;6(7):835-46.

Sun MR, Pedrosa I. Magnetic resonance imaging of renal masses. *Semin Ultrasound CT MR.* 2009;30(4):326-51

Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(3):227-41.

Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA, Kanayama H, Kagawa S, Haab BB, Teh BT. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 14;98(17):9754-9.

Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001;20(11):2768-78.

Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Tobisu K, Kakizoe T, Tsukamoto T, Kumamoto Y, Sugimura T, Terada M. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer Res.* 1994;54(15):4233-7.

Takeda A, Stoeltzing O, Ahmad SA, Reinmuth N, Liu W, Parikh A, Fan F, Akagi M, Ellis LM. Role of angiogenesis in the development and growth of liver metastasis. *Ann Surg Oncol.* 2002;9(7):610-6.

Tang ZY, Yang LY, Zhang YJ, Peng KL, Qi L. Smad4 and TGF-beta1 expression and clinical significance in bladder transitional cell carcinoma [Resumo Medline]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2006;31(3):363-6.

Thrasher JB, Paulson DF. Prognostic factors in renal cancer. *Urol Clin North Am.* 1993;20(2):247-62.

Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, Tsuchida T, Fukushima Y, Sato H, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 1999;35(1):133-7.

True LD. The time for accurate Fuhrman grading of renal cell carcinomas has arrived. *Am J Clin Pathol.* 2002;118(6):827-9.

Uzzo RG, Novick AC. Nephron sparing surgery for renal tumors: indications, techniques and outcomes. *J Urol.* 2001;166(1):6-18.

Vajkoczy P, Menger MD, Vollmar B, Schilling L, Schmiedek P, Hirth KP, Ullrich A, Fong TA. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy. *Neoplasia.* 1999;1(1):31-41.

Van Poppel H, Vandendriessche H, Boel K, Mertens V, Goethuys H, Haustermans K, Van Damme B, Baert L. Microscopic vascular invasion is the most relevant prognosticator after radical nephrectomy for clinically nonmetastatic renal cell carcinoma. *J Urol.* 1997;158(1):45-9.

Vasselli JR, Shih JH, Iyengar SR, Maranchie J, Riss J, Worrell R, Torres-Cabala C, Tabios R, Mariotti A, Stearman R, Merino M, Walther MM, Simon R, Klausner RD, Linehan WM. Predicting survival in patients with metastatic kidney cancer by gene-expression profiling in the primary tumor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(12):6958-63.

Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.* 2000;60(2):203-12.

Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature.* 2005; 437(7058):497-504.

Yamashita Y, Miyazaki T, Hatanaka Y, Takahashi M. Dynamic MRI of small renal cell carcinoma. *J Comput Assist Tomogr.* 1995;19(5):759-65.

Yang JC, Sherry RM, Steinberg SM, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, White DE, Liewehr DJ, Merino MJ, Rosenberg SA. Randomized study of high-dose and low-dose interleukin-2 in patients with metastatic renal cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21(16):3127-32.

Yang LY, LU WQ, Huang GW, Wang W. Correlation between CD105 expression and postoperative recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2006, 6:110

Yildiz E, Ayan S, Goze F, Gokce G, Gultekin EY. Relation of microvessel density with microvascular invasion, metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2008;101(6):758-64.

APÊNDICES

Artigo científico submetido

1. Manuscript #: URL-D-13-01278

Title: "Angiogenic Factors Expression Can Define Stage and Dissemination in Renal Cell Carcinoma"

Submetido: UROLOGY

Congressos

1. XXXIII Congresso Brasileiro de Urologia

“ Expressão de Endoglina (CD 105) no Carcinoma de Células Renais”

Ética

1. Aprovação no comitê de ética 0049/10