PAULO AFONSO DE CARVALHO

**Análise da expressão de transportadores de monocarboxilato
MCT1, MCT2 e MCT4, da chaperona CD147 e das proteínas
CD44, HIF-1alfa, CA-IX e GLUT1 no carcinoma de células renais
do tipo células claras**

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

Programa de Urologia

Orientador: Prof. Dra. Katia Ramos Moreira
Leite

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Carvalho, Paulo Afonso de
Análise da expressão de transportadores de
monocarboxilato MCT1, MCT2 e MCT4, da chaperona
CD147 e das proteínas CD44, HIF-1alfa, CA-IX e GLUT1
no carcinoma de células renais do tipo células
claras / Paulo Afonso de Carvalho. -- São Paulo,
2020.

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

Programa de Urologia.

Orientadora: Katia Ramos Moreira Leite.

Descritores: 1.Carcinoma de células renais
2.Prognóstico 3.Imuno-histoquímica 4.Proteína
supressora de tumor von Hippel-Lindau 5.Metabolismo
energético 6.HIF-1 alfa

USP/FM/DBD-313/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, José Paulo e Neusa,
pilares da minha formação, pelo resplandecente exemplo de vida.

À minha esposa Bárbara, mulher que escolhi para passar a vida,
pelo apoio e carinho mesmo nos momentos mais difíceis.
Minha eterna companheira, dedicada em construir nossa família e cuidar de
nossos futuros filhos:
João e Guilherme.

Aos meus irmãos, Janaína e Júlio César,
pela parceria nesta caminhada até os dias atuais.

Agradecimento especial

A todas as pessoas que passaram pela minha vida e moldaram quem eu sou:
familiares, amigos, mestres, pacientes e anjos.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, e não nos deixa somente porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”.

Charles Spencer Chaplin (1889 – 1977)

Agradecimentos

À Prof^a. Dra. Kátia Ramos Moreira Leite, pela segurança na minha orientação; por acreditar na minha capacidade de evolução como médico e pesquisador. Minha eterna gratidão.

“Ser líder é como ser uma dama. Se você precisa dizer às pessoas que é, então você não é.

Margareth Thatcher (1925 – 2013)

Ao Prof. Dr. William Carlos Nahas, que me acolheu no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo; abriu as portas da Pós-Graduação e incentivou a realização deste projeto de pesquisa. É um privilégio tê-lo como exemplo.

“O homem superior é modesto em seu discurso, mas excede em suas ações.

Confúcio (551 – 479 AC)

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, pelo desprendimento de colocar à minha disposição a estrutura do seu consultório. E por sempre me mostrar as virtudes de um grande homem.

“O homem erudito é um descobridor de fatos que já existem – mas o homem sábio é um criador de valores que não existem e que ele faz existir.

Albert Einstein (1879 – 1955)

Ao Dr. Maurício Cordeiro, amigo em todas as horas. Responsável por me dar oportunidades de atuação em todas as áreas: pesquisa científica,

assistência e educação médica. Sempre disponível para discutir dúvidas que permearam este projeto.

Ao Dr. Rafael Coelho, pelos anos de convívio. Por me ensinar como um bom médico deve ter comprometimento e profissionalismo com seus pacientes. E também por me convidar para atuar no grupo de Uro-Oncologia do ICESP. Jamais esquecerei que me estendeu a mão.

Aos colegas que formam o grupo multidisciplinar de Uro-Oncologia do ICESP, pelo constante aprendizado. Tenham certeza que cada um de vocês tem participação nesta Tese.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa da Uro-Oncologia (ICESP) – Sanarely Pires e Renata Martins – pelo auxílio na concretização deste projeto.

À Prof^a. Dra. Céline Pinheiro e ao Dr. Murilo Bonatelli, por disponibilizarem seus respectivos tempos na realização das reações imuno-histoquímicas contidas nesta Tese e pelas sugestões que agregaram grande valor ao trabalho.

À Dra. Isabela Werneck por gentilmente disponibilizar um dos anticorpos utilizados nesta Tese.

À Dra. Aline Assato e aos funcionários do LIM-14, pelo cuidado na construção do tissue microarray.

Ao Dr. Marcelo Zerati, por compartilhar comigo os dados clínicos da sua tese.

Ao senhor Marcus Castro, pela presteza, dedicação e precisão nos cálculos estatísticos.

Aos membros da Banca de Qualificação; Dr. José Pontes, Prof^a. Dra. Sabrina Reis e Dr. Daher Chade; pelo empenho em corrigir esta Tese e sugerir valiosas melhorias.

À senhora Deulza Ratti, pela cuidadosa revisão ortográfica e da língua portuguesa.

À Elisa de Arruda Cruz, secretária da Pós-Graduação, pelo inestimável auxílio nas tarefas burocráticas.

À equipe do LIM-55 pela ajuda constante em todas as etapas de realização desta Tese. Não tenho palavras para demonstrar o carinho que tenho por vocês.

Aos inúmeros amigos que fiz em minha vida. Impossível particularizar alguém, mas todos igualmente importantes.

À minha querida Bárbara, meus pais e irmãos, por formarem o núcleo que dá sentido à minha vida; responsáveis pelos melhores momentos que levarei para a eternidade. Vocês me fazem feliz.

A Deus, por cuidar de mim todos os dias.

Agradecimento institucional

Agradeço o apoio do ICESP,
Instituto do Câncer do Estado de São Paulo,
sem o qual a realização desta Tese não seria possível.

Epígrafe

“Melhor lutar por algo, do que morrer por nada. ”

Winston L. S. Churchill (1874 – 1965)

Normatização

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

Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, Norma Ortográfica 2009.

Guia de Apresentação de Dissertações, Teses e Monografias; 3ª Edição, São Paulo; 2011. Autores: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.

Referências: Adaptado do *International Committee of Medical Journals Editors* (Grupo de Vancouver).

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

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Carcinoma de células renais	23
1.2 O gene HIF-1 α	24
1.2.1 A família SLC16	28
1.2.2 MCTs e suas chaperonas	33
1.3 Identificação de alvos para terapias específicas no câncer	34
1.3.1 Inibidores de HIF-1 α	34
1.3.2 Inibidores de MCT1	35
1.3.3 Inibidores de GLUT	35
1.4 Justificativa	36
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo primário	38
2.2 Objetivos secundários	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Delineamento do estudo	40
3.2 Casuística	40
3.3 Microarranjo tecidual (TMA)	42
3.4 Reações Imuno-histoquímicas	44
3.5 Análise estatística	51
3.6 Ética	52
4. RESULTADOS	53
4.1 Características populacionais	54
4.2 Sobrevida global e câncer específica e os fatores prognósticos clássicos	57
4.3 Apresentação	58
4.4 Necrose	58
4.5 Invasão Microvascular	59
4.6 Invasão da Veia Renal	59
4.7 Invasão de Cápsula Renal	60

4.8 Grau nuclear de Fuhrman	60
4.9 Estadiamento patológico T (pT)	61
4.10 Estadiamento patológico N (pN)	61
4.11 Invasão da gordura perirrenal	62
4.12 CA-IX	63
4.13 CD44	64
4.14 CD147	65
4.15 GLUT1	67
4.16 MCT1	68
4.17 MCT2	69
4.18 MCT4	70
4.19 HIF-1 α	71
4.20 Análise Multivariada	71
4.21 Proteínas versus fatores prognósticos	76
4.22 CA-IX	76
4.23 CD147	77
4.24 CD44	78
4.25 GLUT1	80
4.26 MCT1	81
4.27 MCT2	82
4.28 MCT4	83
4.29 HIF-1 α	83
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES	94
7. ANEXOS	97
Anexo A: Diagrama de Montagem do TMA-1	98
Anexo A: Diagrama de Montagem do TMA-2	99
Anexo A: Diagrama de Montagem do TMA-3	100
Anexo B	101
Anexo C	102
8. REFERÊNCIAS	105
Apêndice	112

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

°C	Graus Celsius
Cm	centímetro
µm	Micrômetro
3p	Braço curto do cromossomo 3
3p21	Banda 21 do braço curto do cromossomo 3
5q	Braço longo do cromossomo 5
7q	Braço longo do cromossomo 7
8p	Braço curto do cromossomo 8
9p	Braço curto do cromossomo 9
14q	Braço longo do cromossomo 14
ADP	Difosfato de adenosina
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AMP	Monofostato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
AZD3965	Droga inibidora da MCT1 e MCT2
B7-H1	Proteína de membrana da Família B7 tipo H1
B7-H4	Proteína de membrana da Família B7 tipo H4
BAP1	Proteína 1 associada ao BRCA1
BAY87-2243	Droga anti-tumoral que inibe a atividade de HIF-1
CA-IX	Anidrase carbônica do tipo 9
CAPPesq	Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP
CD44	Receptor de superfície celular CD44
CD147	Receptor de superfície celular CD147
CCR	Carcinoma de células renais
CCRcc	Carcinoma de células renais tipo células claras
CO ₂	gás carbônico
Curva ROC	Curva de Características operacionais do receptor, do Inglês: <i>Receiver operating characteristics curve</i>
DP	Desvio padrão

ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENO1	Enolase 1
EZN-2968	droga que inibe a ação HIF-1 α
GAPDH	Gliceraldeído-6-fosfato desidrogenase
GLUT	Transportador de glicose
GLUT1	Transportador de glicose tipo 1
GLUT3	Transportador de glicose tipo 3
H ⁺	íon hidrogênio
HCO ₃ ⁻	ânion bicarbonato
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
HE	Hematoxilina-eosina
HIF-1	Fator induzível por hipóxia tipo 1
HIF-1 α	Fator induzível por hipóxia tipo um, subunidade alfa
HK2	Hexoquinase 2
HR	Hazard Ratio
IC	Intervalo de confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IL-6	Interleucina 6
IL-23	Interleucina 23
IMDC	<i>International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium</i>
IMP3	Ribonucleoproteína nucleolar 3
IMV	Invasão microvascular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INV V RENAL	Invasão da veia renal
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
KRML	Kátia Ramos Moreira Leite
Ki-67	Antígeno nuclear Ki-67

LDH	Enzima lactato desidrogenase
LDH A	Enzima lactato desidrogenase tipo A
LDL B	Enzima lactato desidrogenase tipo B
LIM55	Laboratório de Investigação Médica 55
M0	Ausência de metástase
Máx	máximo
MCT	Transportador de monocarboxilato
MCT-1	Transportador de monocarboxilato tipo 1
MCT-2	Transportador de monocarboxilato tipo 2
MCT-3	Transportador de monocarboxilato tipo 3
MCT-4	Transportador de monocarboxilato tipo 4
Mín	mínimo
MSKCC	<i>Memorial Sloan Kettering Cancer Center</i>
MYC	família de genes reguladores que codificam fatores de transcrição
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina forma oxidada
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina forma reduzida
Na ⁺ K ⁺ ATPase	Bomba de sódio e potássio
NHE1	Isoforma 1 do trocador Na ⁺ /H ⁺
NK	Assassinas naturais, do Inglês: <i>natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Logaritmo decimal negativo da concentração de hidrogênio em uma solução
PK	Piruvato quinase
pT	Estadio patológico - Tamanho
pVHL	proteína von Hippel-Lindau
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
SETD2	Metiltransferase SET contendo domínio 2
SLC2A1	Gene que codifica a proteína GLUT1
SLC2A2	Gene que codifica a proteína GLUT2
SLC2A4	Gene que codifica a proteína GLUT4

SLC16A	Família de proteínas SLC16A
SSIGN	<i>Stage, Size, Grade e Necrosis</i>
TBS	Tampão “ <i>Tris Buffered Saline</i> ”
TCA	Ácidos tricarboxílicos
TMA	Microarranjo tecidual, do inglês: <i>tissue microarray</i>
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
TNF- α	Fator de necrose tumoral tipo α
UCLA	Universidade da Califórnia em Los Angeles
UISS	<i>UCLA Integrated Staging System</i>
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VHL	von Hippel-Lindau
WHO	<i>World Health Organization</i>

Lista de tabelas

Tabela 1. Anticorpos utilizados e condições das reações	45
Tabela 2. Detalhamento das perdas de material nas lâminas de TMA-1.....	48
Tabela 3. Detalhamento das perdas de material nas lâminas de TMA-2.....	49
Tabela 4. Detalhamento das perdas de material nas lâminas de TMA-3.....	50
Tabela 5. Dados demográficos e clínicos da população.	54
Tabela 6. Dados anatomopatológicos da população estudada	56
Tabela 7. Resumos dos valores-p na análise uni variada.	72
Tabela 8. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – CD44	73
Tabela 9. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – CD147	73
Tabela 10. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – MCT 1	74
Tabela 11. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – CD44	74
Tabela 12. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – CD147	75
Tabela 13. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – MCT1	75
Tabela 14. Fatores prognósticos e expressão da proteína CA-IX.....	77
Tabela 15. Fatores prognósticos e expressão da proteína CD147	78
Tabela 16. Fatores prognósticos e expressão da proteína CD44	79
Tabela 17. Fatores prognósticos e expressão da proteína GLUT1	80
Tabela 18. Fatores prognósticos e expressão da proteína MCT1	81
Tabela 19. Fatores prognósticos e expressão da proteína MCT2.....	82
Tabela 20. Fatores prognósticos e expressão da proteína MCT4.....	83
Tabela 21. Fatores prognósticos e expressão da proteína HIF-1 α	84

Lista de figuras

Figura 1. Controle da ação de HIF-1 α em situações de normóxia e hipóxia adaptado de Sadri et al (34).....	25
Figura 2. O papel do lactato no microambiente tumoral colaborando com a sobrevivência e proliferação celular e processo de metastatização segundo Marchiq (40).	27
Figura 3. Metabolização de Piruvato em Lactato catalisada por LDH.....	28
Figura 4. Sistemas responsáveis pela exportação de prótons segundo Porporato P et al. (44).....	29
Figura 5. Simbiose entre os processos oxidativo e glicolítico presente no ambiente tumoral (40).	31
Figura 6. Simbiose entre os processos oxidativo e glicolítico presente no ambiente tumoral (44, 54).	32
Figura 7. a) punção do bloco doador na região de interesse após sobreposição de lâmina corada com HE demarcada; b) transferência do cilindro de tecido para o bloco receptor de TMA; c) corte do bloco de TMA e obtenção das lâminas de TMA. Donor: Doador; Recipient (73).	43
Figura 8. A) Identificação de área de interesse na lâmina em HE; B) Localização de área correspondente no bloco de doador que será puncionado; C) Bloco de parafina de TMA; D) Lâmina do TMA; E) Histospot em detalhe F) área de interesse do histospot em aumento.	44
Figura 9. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de sintomas ao diagnóstico.....	58
Figura 10. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de necrose.....	58
Figura 11. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de embolização neoplásica intravascular.....	59
Figura 12. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de invasão da veia renal.	59
Figura 13. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de invasão da cápsula renal.....	60

Figura 14. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela graduação nuclear de Fuhrman.	60
Figura 15. Sobrevida global e câncer específica estratificada pelo estadiamento patológico T (pT).....	61
Figura 16. Sobrevida global e câncer específica estratificada pelo status nodal (pN).	62
Figura 17. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela invasão ou não da gordura perirrenal.....	62
Figura 18. Histospots com expressão 0 (A) e expressão 3 para CA-IX (B).	63
Figura 19. Histospots com expressão 0 (C) e expressão 3 para CD44 (D).	64
Figura 20. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela expressão de CD44.	65
Figura 21. Histospots com expressão 0 (E) e expressão 3 para CD147 (F)....	66
Figura 22. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela expressão de CD147.	66
Figura 23. Histospots com expressão 0 (G) e expressão 3 para GLUT1 (H)...	67
Figura 24. Histospots com expressão 0 (I) e expressão 3 para MCT1 (J).	68
Figura 25. Sobrevida global e câncer específica estratificado pela expressão de MCT1.....	69
Figura 26. Histospots com expressão 0 (K) e expressão 3 para MCT2 (L).	69
Figura 27. Histospots com expressão 0 (M) e expressão 3 para MCT2 (N). ...	70
Figura 28. Histospots com expressão 0 (O) e expressão 3 para HIF-1 α (P). ..	71
Figura 29. Alvos do fator de transcrição MYC no metabolismo energético segundo Tarrado-Castellarnau et al. (88).	90
Figura 30. Interação de CD147 e MCT1 na membrana plasmática segundo Payen et al (92).	91

Resumo

Carvalho PA. *Análise da expressão de transportadores de monocarboxilato MCT1, MCT2 e MCT4, da chaperona CD147 e das proteínas CD44, HIF-1alfa, CA-IX e GLUT1 no carcinoma de células renais do tipo células claras* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: O carcinoma de células renais é a neoplasia urológica mais letal e responsável por 2-3% de todos os cânceres diagnosticados. O subtipo células claras (CCRcc) é o mais comum, correspondendo a 75% dos casos. A maioria se caracteriza pela inativação da proteína supressora de tumor von Hippel-Lindau (pVHL), que leva à desregulação do gene HIF-1 α (fator induzido pela hipóxia 1 α). HIF-1 α é um fator de transcrição que induz a expressão de genes responsáveis pelo metabolismo energético celular. **OBJETIVO:** Determinar o padrão de imunoexpressão das proteínas: HIF-1 α , MCT1, MCT2, MCT4, CD44, CD147, GLUT1 e CA-IX e correlacioná-los com sobrevida global, sobrevida câncer específica e com fatores prognósticos clássicos em pacientes portadores de CCRcc não metastático. **MÉTODOS:** Neste estudo retrospectivo com 207 pacientes com CCRcc localizado, foi analisada a expressão imuno-histoquímica, das proteínas previamente citadas em micro arranjo tecidual (TMA). A expressão de cada proteína foi estratificada em 4 grupos (0, 1, 2 e 3), de acordo com a intensidade da coloração, por patologista experiente (KRML) e os níveis de expressão foram relacionados aos fatores prognósticos clássicos do CCRcc, sobrevida global e câncer específica. **RESULTADOS:** Ao estratificar a imunoexpressão das proteínas em dois grupos (expressão 0 + 1 e 2 + 3), a análise uni variada mostrou associação entre a expressão de MCT1 e a presença de sintomas ($p=0,0001$), grau nuclear de Fuhrman ($p=0,0059$), invasão da gordura perirrenal ($p=0,0024$), invasão da veia renal ($p=0,002$), presença de necrose ($p=0,0001$), invasão da cápsula ($p=0,0135$), tamanho tumoral ($p<0,0001$) e estágio patológico pT ($p<0,0001$). Em relação a sobrevida, a análise uni variada mostrou que a maior expressão das proteínas MCT1 e CD147 correlacionou-se com menor sobrevida global (Log-Rank, $p=0,0003$ e $p=0,0004$) e menor sobrevida câncer específica (Log-Rank, $p<0,0001$ e $p=0,0002$) respectivamente. Na análise multivariada a maior expressão de CD147 se correlacionou com a menor sobrevida global ($p=0,0448$). A maior expressão de MCT1 associou-se à menor sobrevida global ($p=0,0281$) e menor sobrevida câncer específica ($p=0,031$). **CONCLUSÃO:** As expressões das proteínas MCT1 e CD147 são um marcador de prognóstico desfavorável no CCRcc.

Descritores: Carcinoma de células renais; Prognóstico; Imuno-histoquímica; Proteína supressora de tumor von Hippel-Lindau; Metabolismo energético; HIF-1alfa.

Abstract

Carvalho PA. *Evaluation of the immunoexpression of monocarboxylate transporters MCT1, MCT2 and MCT4, CD147 chaperone and CD44, HIF-1 α , CA-IX and GLUT 1 proteins in clear cell renal cell carcinoma* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

INTRODUCTION: Renal cell carcinoma is the most lethal urologic neoplasm, responsible for 2-3% of all cancers. The clear cell variant (ccRCC) is the most common, accounting for 75% of cases. Most are characterized by the inactivation of von Hippel-Lindau tumor suppression protein, which leads to dysregulation of the HIF-1 α gene. HIF-1 α is a transcription factor that induces the expression of genes responsible for cellular energetic metabolism. **OBJECTIVES:** To determine the pattern of protein immunoexpression: HIF-1 α , MCT1, MCT2, MCT4, CD44, CD147, GLUT1 and CA-IX, and to correlate them with overall survival, specific cancer survival and classic prognostic factors in patients with non-metastatic ccRCC. **METHODS:** In this retrospective study composed by 207 patients with non-metastatic ccRCC, the immunohistochemistry expression of the previously mentioned proteins was analyzed through the tissue microarray technique (TMA). The expression of each protein was stratified into four groups (0, 1, 2 and 3); according to the staining intensity, by an experienced pathologist (KRML) and expression levels were related to the classic prognostic factors of ccRCC, overall and cancer-specific survival. **RESULTS:** By stratifying the immunoexpression of the proteins into two groups (expression 0 + 1 and 2 + 3), the univariate analysis showed that the expression of MCT1 correlated with the presence of symptoms ($p=0.0001$), Fuhrman nuclear grade ($p = 0.0059$), perirenal fat invasion ($p=0.0024$), renal vein invasion ($p=0.002$), presence of necrosis ($p=0.0001$), capsule invasion ($p=0.0135$), tumor size ($p<0.0001$) and pathological stage pT ($p<0.0001$). There was also correlation between overexpression of MCT1 and CD147 proteins with lower overall survival (Log-Rank, $p=0.0003$ and $p=0.0004$) and lower cancer-specific survival (Log-Rank, $p<0.0001$, and $p=0.0002$) respectively. In multivariate analysis, the highest expression of CD147 was correlated with the lowest overall survival ($p=0.0448$). The highest expression of MCT1 was associated with lowest overall survival ($p=0.0281$) and lowest cancer-specific survival ($p=0.031$). **CONCLUSION:** Expression levels of MCT1 and CD147 are independent markers of unfavorable prognosis in ccRCC.

Descriptors: Carcinoma, renal cell; Prognosis; Immunohistochemistry; Von Hippel-Lindau tumor suppression protein; Energy metabolism; HIF-1 α .

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de células renais

O carcinoma de células renais (CCR) é a neoplasia urológica mais letal e responsável por 2-3% de todos os cânceres diagnosticados (1)

Nas últimas duas décadas, sua incidência cresceu 2% (2) provavelmente pelo aumento da detecção de tumores incidentais, normalmente menores e menos agressivos (3, 4), que acontece pela maior disponibilidade e aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos. Atualmente, entre 30 a 60% dos CCRs são diagnosticados acidentalmente por exames de imagem (5, 6).

Os sinais e sintomas mais descritos são a hematúria, dor no flanco e massa abdominal palpável, constituindo a tríade clássica do carcinoma de células renais. Entretanto, eles ocorrem conjuntamente em, no máximo, 9% dos pacientes e, quando presentes, sugerem doença localmente avançada (7-9).

O tratamento curativo padrão para pacientes com CCR localizado é a ressecção cirúrgica (nefrectomia radical ou parcial). Entretanto, em muitos casos a neoplasia é clinicamente silenciosa durante grande parte de sua história natural e, por isto, o diagnóstico, muitas vezes, é tardio, resultando em doença localmente avançada ou metastática e, muitas vezes, irressecável. Infelizmente, nestas situações a sobrevida livre de doença é baixa (10).

Classicamente, os fatores prognósticos estabelecidos no CCR são: extensão anatômica da doença dado pelo sistema de estadiamento TNM (11-14), parâmetros histopatológicos (grau nuclear de Fuhrman, grau nucleolar WHO/ISUP, presença de necrose e invasão microvascular)(15-27) e dados clínicos, principalmente a presença de sintomas ao diagnóstico (28).

O subtipo células claras (CCRcc) é a variedade mais comum, responsável por 75% a 85% dos casos, e classicamente caracterizado pela perda de função do gene von Hippel-Lindau (VHL), presente no cromossomo 3p25-26 (29-31).

O principal efeito desta mutação envolve a diminuição da degradação da proteína expressa pelo gene HIF-1 α e será descrito em detalhes a seguir.

1.2 O gene HIF-1 α

O CCRcc, além de ser o subtipo mais frequente, é também um dos mais agressivos e, por isto muito estudado. Em sua quase totalidade, há uma inativação da proteína supressora de tumor Von Hippel Lindau (pVHL), através de mutações, perdas ou hipermetilação da região promotora do gene. A função primária de VHL é a indução da degradação de HIF-1 α em um ambiente de normóxia (32).

O HIF-1 α é um fator de transcrição (Figura 1) que induz a expressão de genes, responsáveis pela angiogênese (fatores de crescimento endotelial vascular – VEGFs) e pela reprogramação metabólica (hexoquinase II e alguns transportadores de glicose – GLUT1 e GLUT3) que viabilizam a entrada intracelular de glicose, garantindo a integridade tissular em casos de hipóxia e suprimindo o alto consumo metabólico por células tumorais (33).

Figura 1. Controle da ação de HIF-1 α em situações de normóxia e hipóxia adaptado de Sadri et al (34).

A desregulação do metabolismo energético celular é apontado como um evento característico nas células cancerígenas (35, 36). Ela envolve uma reprogramação enzimática que favorece a glicólise aeróbica, mas com baixo rendimento energético. Obtém trifosfato de adenosina (ATP) através da decomposição de grandes quantidades de glicose com produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio. Este evento foi descrito inicialmente por Otto Warburg em 1956 (37), e ainda hoje é conhecido como efeito Warburg, que rompia com o paradigma da época de que as células somente utilizavam a via glicolítica em ambientes anaeróbicos, evento também conhecido como fermentação láctica.

Como em outros tumores, o CCRcc apresenta um grande consumo de glicose acompanhado de produção de grande quantidade de lactato resultado da glicólise aeróbica (38). Entretanto, para manutenção da homeostase celular,

o transporte de lactato para o meio extracelular é essencial para controlar a acidose intracelular e, conseqüentemente, não induzir o processo de apoptose. Porém, sabe-se que altas concentrações de lactato não estão necessariamente associadas à hipóxia. No ambiente tumoral, a glicólise aeróbica, o aumento da glutaminólise e as baixas taxas de perfusão contribuem com a elevação dos níveis de lactato em áreas não hipóxicas. A hipóxia sem acidose láctica está associada à tumores de pior prognóstico, enquanto a acidose láctica, na ausência de hipóxia, associa-se a curso clínico favorável em alguns tumores, como por exemplo, o carcinoma de mama (39).

O acúmulo do ácido láctico não é o único processo gerador de acidose tumoral. Células deficientes no processo de glicólise aumentam os níveis de CO_2 gerado pelo metabolismo oxidativo levando à acidificação tumoral.

Para suportar a acidificação intracelular, as células selecionam estratégias adaptativas para a extrusão ácida, incluindo transporte de H^+ e importação de HCO_3^- . Esse processo acidifica o microambiente tumoral, suportando o fenótipo maligno.

Apesar do lactato não ser o maior responsável pela acidificação do microambiente tumoral, existem evidências crescentes de que ele está envolvido em numerosos processos de sinalização promovendo a sobrevivência celular, a proliferação e o processo de metastatização (40) (Figura 2).

Na literatura médica, identifica-se um papel do lactato relacionado à inibição da vigilância imunológica e promoção da inflamação, inibindo linfócitos T citotóxicos e células NK (41) através da produção de IL-23 e IL-6 (42) respectivamente.

Analisando o processo de reparação de tecidos, autores extrapolam o papel do lactato sobre a angiogênese tumoral. Nessa situação, o lactato tem atividade pró-angiogênica estimulando a secreção de VEGF por macrófagos, migração endotelial, morfogênese vascular e recrutamento de células vasculares progenitoras circulantes. Também tem sido relacionado à proliferação fibroblástica, produção de $\text{TNF-}\alpha$ e deposição de colágeno (43).

Figura 2. O papel do lactato no microambiente tumoral colaborando com a sobrevivência e proliferação celular e processo de metastatização segundo Marchiq (40).

1.2.1 A família SLC16

A enzima lactato desidrogenase (LDH) converte piruvato, produto final da glicólise, em lactato na presença de pequena quantidade ou ausência de oxigênio com interconversão concomitante de NADH em NAD⁺ (Figura 3).

Figura 3. Metabolização de Piruvato em Lactato catalisada por LDH.

Para se evitar a acidificação intracelular e a morte da célula, os tecidos que apresentam elevadas taxas de glicólise devem promover o transporte de prótons para o compartimento extracelular, assim como promover o efluxo dos elevados níveis de lactato produzido.

Existem vários sistemas para o transporte de prótons, entre eles estão os transportadores de monocarboxilatos (MCT) que pertencem à família de genes *SLC16A*. Essa família é formada por 14 membros entre eles estão os MCT1, MCT2, MCT3 e MCT4 que atuam catalizando o transporte de monocarboxilatos ligados a prótons como o L-Lactato, piruvato e corpos cetônicos através da membrana plasmática (Figura 4).

Figura 4. Sistemas responsáveis pela exportação de prótons segundo Porporato P et al. (44).

O MCT4 tem baixa afinidade por lactato, é codificado por um gene alvo de HIF-1 α (45), com atuação na exportação de ácido láctico em células tumorais em processo glicolítico (46), contribuindo para a regulação do pH intracelular. Apesar de sua baixa afinidade, exibe um rápido *turnover*, o que garante sua eficiência no transporte de prótons (47).

O MCT1 tem afinidade intermediária por lactato e é expresso universalmente por tecido normal e tumoral. No câncer, facilita a captação de lactato pelas células tumorais oxidativas, via a oxidação de lactato em piruvato contribuindo para o ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA) (48).

O MCT2 e MCT3 têm a maior afinidade por lactato e são especializados na importação de lactato de modo específico em tecidos como o fígado, rim e retina.

Recentemente, mostrou-se que a expressão de MCT1 e MCT4 está correlacionada à maior capacidade de invasão de tumores sólidos (49-51).

A reação glicolítica é expressa da seguinte forma: $\text{Glicose} + 2\text{ADP} \rightarrow 2\text{ATP} + 2\text{Lactato} + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$. Em condições de hipóxia, a reação é intensificada para que se garanta as necessidades energéticas do tumor.

Duas questões devem ser esclarecidas em relação às neoplasias. A primeira: como as células tumorais, em geral distantes do fluxo vascular, têm acesso a altos níveis de glicose? A segunda: como o processo de acidificação celular é evitado?

Uma das respostas foi proposta por Sonveaux et al (48) que propuseram a existência de uma simbiose metabólica no ambiente tumoral que proporciona a entrega de glicose em um ambiente hipóxico. Essa simbiose se baseia na troca do lactato. A célula tumoral hipóxica/glicolítica produz lactato e a célula normóxica/oxidativa consome o lactato promovendo sua oxidação em piruvato pela LDH (Figura 5).

Figura 5. Simbiose entre os processos oxidativo e glicolítico presente no ambiente tumoral (40).

Nesse modelo de simbiose, o MCT4 serve como um exportador de lactato da célula glicolítica tumoral e MCT1 facilita a captação de lactato pela célula tumoral oxidativa (46, 48).

A manutenção do pH intracelular próximo de 7,0 é garantido por vários mecanismos regulatórios, incluindo o MCT4 (Figura 6). De maneira interessante a maioria das enzimas transportadoras são alvo de HIF-1 α .

Enquanto o MCT4 é um sistema passivo, outros requerem ATP. A anidrase carbônica 9 (CA-IX) e o NHE1 (isoforma 1 do trocador Na⁺/H⁺) dependem da exportação de sódio mediada por Na⁺K⁺ ATPase para a manutenção de suas atividades.

1.2.2 MCTs e suas chaperonas

As isoformas MCT1, MCT3 e MCT4 precisam formar um complexo com a chaperona CD147 para que se tornem ativas. Esta é uma proteína transmembrana da superfamília das imunoglobulinas também conhecida como basigina (55, 56), que tem sido descrita como um importante elemento na oncogênese (57, 58). Ela atua na síntese de matriz, metaloproteinases e VEGFs (57) e se encontra superexpressa em algumas variedades de cânceres humanos (58). Pinheiro e cols. (59) mostraram o valor prognóstico da CD147 associada com o MCT1 no câncer gástrico.

Dentro deste contexto, parece razoável que estas isoformas de transportadores de monocarboxilatos e a chaperona CD147 estejam superexpressas em células tumorais glicolíticas, nas quais são produzidos níveis elevados de lactato, viabilizando o processo de oncogênese. Esses eventos já foram descritos em câncer de próstata, colo uterino e em um único trabalho em CCRcc (60-62).

Outra proteína relevante para viabilidade celular é o CD44, um dos principais receptores do ácido hialurônico intracelular. Recentemente, mostrou-se que a interação entre o ácido hialurônico e o CD44 pode regular a distribuição e otimizar a função dos MCTs (63). Também existem evidências de que o aumento da expressão da chaperona CD147 estimula a síntese de ácido hialurônico (64). Concomitantemente, já foi descrito que excesso de lactato estimula tanto a produção de ácido hialurônico como de CD44 em melanoma (65).

Desse modo, podemos levantar a hipótese de que, nas células tumorais que se utilizam da via glicolítica aeróbica, haverá um excesso de lactato, sem, entretanto, alterar o pH intracelular por conta da atividade de MCT1, MCT4 e CD147 que são induzidas pelo próprio lactato que estimula a síntese de CD44 e ácido hialurônico, consequentemente atuando sobre os MCTs e a CD147.

O cenário descrito é possivelmente encontrado no CCRcc e, por isto, conhecer o perfil de expressão dessas proteínas dentro do processo de oncogênese é fundamental para a compreensão dos mecanismos celulares encontrados nas células tumorais, possibilitando a identificação de novas terapêuticas para o tratamento dessa neoplasia.

1.3 Identificação de alvos para terapias específicas no câncer

1.3.1 Inibidores de HIF-1 α

HIF-1 α é um regulador fundamental dos processos angiogênicos e metabólicos e tem sido considerado um alvo promissor para o tratamento do câncer.

Várias drogas com efeito anticancerígeno foram desenvolvidas inibindo a via do HIF-1 α sem ação direta e seletiva sobre o mesmo. Recentemente, o BAY87-2243 foi apresentado como um inibidor da atividade e estabilidade do HIF-1 α e avaliado em ensaio clínico de Fase I. Os resultados ainda não foram publicados. Outra droga avaliada em estudos clínicos foi a EZN-2968, uma sequência de oligonucleotídeo antisense que se antagoniza à sequência de RNAm do gene HIF-1 α (44, 66).

1.3.2 Inibidores de MCT1

O uso de inibidores de MCT1, no tratamento de tumores, seria de extremo interesse, pois atuaria simultaneamente sobre o metabolismo energético e a angiogênese. Como o maior facilitador de captação de lactato, MCT1 é um fator fundamental para que haja a simbiose metabólica em neoplasias como descrito anteriormente.

Já existe um inibidor de MCT1 comercialmente disponível, o α -ciano-4-hidroxicinamato, que, em estudos *in vivo*, demonstrou grande atividade anti-tumoral, quando associado à radioterapia, sem grande toxicidade (48, 67).

O composto AZD3965 está em fase I/II de estudo clínico para linfoma e tumores sólidos em estágio avançado (NCT01791595). Sua ação inibe o transporte bidirecional realizado pelos monocarboxilatos, causando acúmulo de lactato intracelular sob baixa ou nenhuma expressão de MCT4 e leva à inibição da atividade glicolítica e reativação do metabolismo de piruvato mitocondrial necessário para manter a sobrevivência celular. Esses achados destacam o potencial dos inibidores de MCT1 no tratamento do câncer, principalmente se combinado com terapia alvo direcionada contra alvos mitocondriais (68).

1.3.3 Inibidores de GLUT

A superexpressão de GLUT1 e GLUT3 em muitos tipos de câncer fornece uma justificativa para o uso de seus inibidores para o tratamento da doença. A floretina é um flavonoide natural e um inibidor competitivo do GLUT que demonstrou retardar o crescimento de tumores sólidos em modelos pré-

clínicos (69, 70). Outro flavonoide natural, silibina, foi recentemente revelado como um inibidor de GLUT, com ensaios clínicos de fase I e II, em andamento, para avaliar sua ação no câncer de próstata (71, 72).

1.4 Justificativa

Posto que o controle do metabolismo energético é fundamental para a carcinogênese do CCRcc, nosso objetivo é avaliar a expressão de moléculas envolvidas nesse processo e sua relação com as características dos tumores e com a sua evolução.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliar o perfil de expressão dos transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT2 e MCT4, de sua chaperona CD147 e das proteínas CD44, GLUT1, CA-IX e HIF-1 α por imuno-histoquímica no CCRcc localizado.

2.2 Objetivos secundários

Correlacionar o perfil de expressão imuno-histoquímico dos transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT2 e MCT4, de sua chaperona CD147 e das proteínas CD44, GLUT1, CA-IX e HIF-1 α com a sobrevida global e câncer específica no CCRcc localizado.

Correlacionar o perfil de expressão imuno-histoquímico dos transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT2 e MCT4, de sua chaperona CD147 e das proteínas CD44, GLUT1, CA-IX e HIF-1 α com fatores prognósticos convencionais: estágio TNM, tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman, invasão microvascular, necrose e presença de sintomas no momento do diagnóstico em pacientes portadores de CCRcc localizado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Estudo retrospectivo para avaliação da expressão proteica dos transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT2 e MCT4, sua chaperona CD147 e das proteínas CD44; GLUT1, CA-IX e HIF-1 α por imuno-histoquímica em TMA contendo fragmentos representativos de CCRcc de pacientes operados com intensão curativa.

O TMA foi construído a partir de blocos de parafina onde duas ou três áreas mais representativas da neoplasia foram avaliadas para cada caso selecionado.

O estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM55) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em colaboração com o Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, Fundação Pio XII, por meio do grupo de pesquisa em Microambiente e Metabolismo Tumoral liderado pela Profa. Dra. Celine Marques Pinheiro.

3.2 Casuística

A casuística é formada por duas populações. A primeira é composta por 103 pacientes com diagnóstico de CCRcc, submetidos à nefrectomia radical ou parcial pelo Prof. Miguel Srougi entre 1988 e 2006 (população 1). A segunda é composta por 120 pacientes, também com diagnóstico de CCRcc, submetidos à nefrectomia radical ou parcial pela equipe de Uro-Oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) entre 2010 e 2011 (população 2). Indivíduos com margem cirúrgica comprometida pela neoplasia ou pacientes

com doença metastática durante o estadiamento pré-operatório foram excluídos do estudo.

O estadiamento foi realizado em todos os pacientes com exame clínico, exames de sangue de rotina, radiografia de tórax ou tomografia de tórax e tomografia de abdome e pelve.

Na população 1, 103 pacientes portadores de CCRcc foram incluídos para confecção do TMA-1. No entanto, quatro casos foram excluídos. Dois pela impossibilidade de recuperação dos dados completos do prontuário e 2 pela presença de metástase no momento da cirurgia, resultando em um total de 99 pacientes para análise neste TMA.

Na população 2, 120 portadores de CCRcc foram incluídos para confecção de 2 TMAs, denominados TMA-2 (com 59 casos) e TMA-3 (61 casos). Entre os indivíduos que compõem o TMA-2, quatro casos foram excluídos. Três por perda de seguimento ambulatorial e 1 pela presença de metástase após revisão de prontuário eletrônico, resultando em total de 55 pacientes. Com relação ao TMA-3, oito casos foram excluídos da avaliação, sete por perda de seguimento ambulatorial e 1 pela presença de metástase após revisão de prontuário. Portanto, para a presente análise contamos com dados de 207 pacientes.

Para cada paciente foram analisadas as características clínicas, extensão anatômica da doença e dados histopatológicos do tumor, incluindo: idade, gênero, presença de sintomas ao diagnóstico, tamanho da lesão, lateralidade, estadiamento (classificação TNM 2017) (55), presença de necrose tumoral, invasão microvascular e grau nuclear de Fuhrman.

O seguimento pós-operatório foi realizado com exame clínico, exames de sangue de rotina, radiografia ou tomografia de tórax e tomografia de abdome e pelve semestralmente nos 2 primeiros anos e, a partir de então, anualmente. Tomografia de crânio e cintilografia óssea foram solicitados conforme o surgimento de sintomas específicos em cada caso. A condição clínica final dos pacientes foi obtida por revisão de prontuários ou contato telefônico.

3.3 Microarranjo tecidual (TMA)

A técnica utilizada neste trabalho para construção do TMA ou “tissue microarray” foi adaptada de Kononen et al (73). Ela é empregada para avaliar a expressão de proteínas, através de reações imuno-histoquímicas, a partir de um bloco de parafina contendo centenas de fragmentos de tecido tumoral, analisados lado a lado, permitindo maior padronização das reações e rapidez nas análises.

Para esta confecção, foram separados os blocos de parafina contendo o CCRcc de cada caso e suas respectivas lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE). Cada lâmina foi revisada em microscópio óptico por uma patologista (KRML) que demarcou regiões representativas da neoplasia. Em seguida, por justaposição das lâminas marcadas com os seus respectivos blocos, as regiões pré-determinadas foram demarcadas no seu bloco doador.

Usando um sistema de precisão mecânico (Beecher Instruments, Sum Prairie, WI), cilindros de 0,6 milímetros de diâmetro foram retirados dos blocos de parafinas doadores contendo o CCRcc previamente selecionados pelo

patologista, através de punção, e posteriormente transportados para um bloco de parafina receptor ficando no mesmo com um intervalo de 0,3 milímetros com o bloco vizinho. A disposição no bloco receptor foi definida em um sistema cartesiano de coordenadas e o conjunto das amostras constitui a micro matriz tecidual (TMA) (Anexo A). Para cada caso, duas ou três amostras tumorais foram recolhidas e incluídas no TMA. A seguir, as figuras 7 e 8 ilustram a técnica descrita acima.

Figura 7. a) punção do bloco doador na região de interesse após sobreposição de lâmina corada com HE demarcada; b) transferência do cilindro de tecido para o bloco receptor de TMA; c) corte do bloco de TMA e obtenção das lâminas de TMA. Donor: Doador; Recipient (73).

Após a conclusão do bloco de parafina de TMA, foram cortadas 100 lâminas de 4 μ m de espessura que foram armazenadas em congelador comum a -20°C até a realização da reação imuno-histoquímica.

Figura 8. A) Identificação de área de interesse na lâmina em HE; B) Localização de área correspondente no bloco de doador que será puncionado; C) Bloco de parafina de TMA; D) Lâmina do TMA; E) Histospot em detalhe F) área de interesse do histospot em aumento.

3.4 Reações Imuno-histoquímicas

As lâminas parafinadas dos TMAs foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica utilizando os anticorpos primários específicos para cada reação, conforme instruções dos fabricantes. Os anticorpos utilizados neste projeto estão expostos na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos utilizados e condições das reações

Proteína	Recuperação antigênica	Anticorpo	Clone	Diluição, tempo e temperatura de incubação
MCT1	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	AB3538P Chemicon International	Policlonal	1:500, <i>overnight</i> , temperatura ambiente
MCT2	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	sc-50322 Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	1:200, 2 horas, temperatura ambiente
MCT4	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	sc-50329 Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	1:500, 2 horas, temperatura ambiente
CD147	EDTA (1 mM, pH=8,0), 98°C, 20 min	sc-71038 Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal (1.BB.218)	1:500, <i>overnight</i> , temperatura ambiente
CD44	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	MCA2726 AbD Serotec	Monoclonal (156-3C11)	1:2000, 2 horas, temperatura ambiente
GLUT1	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	ab15309 Abcam	Policlonal	1:500, 2 horas, temperatura ambiente
CAIX	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	ab15086 Abcam	Policlonal	1:2000, 2 horas, temperatura ambiente
HIF1-α	EDTA (1 mM, pH=8,0), 98°C, 20 min	610958 BD	Monoclonal (54/HIF-1 α)	1:200, <i>overnight</i> , temperatura ambiente

Inicialmente, foi realizada a remoção da parafina, em estufa a 80°C por 10 minutos, lavada por 5 minutos em três banhos de xilol consecutivos, hidratada com concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70% e 50%) e por fim colocada em água. Na sequência, realizou-se a recuperação antigênica. Para isto, as lâminas foram acomodadas em recipiente em banho maria com agitação a 98°C, contendo Citrato (pH = 6,0) ou EDTA (pH = 8,0), por 20 minutos, seguido de 20 minutos de arrefecimento. Posteriormente, cada lâmina foi lavada em tampão TBS 1x, durante 5 minutos, por duas vezes. Seguindo-se a inativação de peroxidase endógena com solução de peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) a 3% em metanol, durante 10 minutos. Após nova lavagem em TBS 1x, durante 5 minutos, por 2 vezes, seguiu-se a incubação com o bloqueador proteico *Ultra V Block (TL-125-HL, Thermo Scientific Lab Vision UltraVision LP Detection System: HRP Polymer* para MCT1, CD147 e HIF-1 α ou *TP-125-HL, Thermo Scientific Lab Vision UltraVision Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP* para MCT2, MCT4, CD44, GLUT1 e CA-IX) por 10 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram secas e, então, aplicado o anticorpo primário. As reações imuno-histoquímicas de MCT1, CD147 e HIF1- α foram realizadas com o sistema polímero *Lab Vision UltraVision ONE Detection System: HRP Polymer (Thermo Fisher Scientific)*, de acordo com as instruções do fabricante. As reações para MCT2, MCT4, CD44, GLUT1 e CA-IX foram realizadas com o kit *Lab Vision UltraVision Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP (Thermo Fisher Scientific)*, baseado no princípio streptavidina-biotina peroxidase, seguindo as recomendações do fabricante. Para visualização das reações, utilizou-se o *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako)* como cromógeno, conforme indicado pelo fabricante. Por fim, cada lâmina foi lavada em água, contra corada com Hematoxilina de Harris (*EasyPath*) durante 1 minuto, desidratada com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95% e 100%), lavada por 5 minutos em três banhos consecutivos de xilol e montada com meio de montagem *Entellan (Merck)* e lamínula. Como controles positivos, utilizou-se carcinoma espinocelular de cavidade oral para MCT1, MCT4 e CD44, tecido normal de rim para MCT2, tecido normal de cólon para CD147, placenta para GLUT1, tecido normal de estômago para CA-IX e glioblastoma para HIF-1 α .

Como controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos durante o procedimento.

Finalmente, as reações foram sujeitas à avaliação independente por um patologista com grande experiência em uropatologia (KRML). Para a expressão imuno-histoquímica foi utilizada graduação semi-quantitativa em que a expressão foi dividida em quatro grupos de acordo com a intensidade da coloração: ausente, fraca (+), moderada (++) e forte (+++); para a avaliação estatística foi agrupada a expressão ausente e fraca em um grupo que foi denominado de baixa expressão e a expressão moderada e forte foi agrupada em outro grupo denominado de alta expressão. A pontuação mais alta entre os fragmentos no TMA foi usada como representativa de cada caso e utilizada para a análise estatística.

Após a leitura das lâminas, perdas adicionais de material foram identificadas, seja pela presença de artefatos ou por descolamento de histospots. Nas tabelas 2, 3 e 4 seguem o detalhamento das perdas que aconteceram nos TMA-1, TMA-2 e TMA-3 de cada proteína.

Tabela 2. Detalhamento das perdas de material nas lâminas de TMA-1.

Marcador	Perda Amostral	n	Detalhamento
CAIX	0	85	Não se aplica
	1	12	A14; A15; D14; E5; F4; G16; H16; I8; I14; I16; M6; N8
	2	2	(A3 e A4); (L1 e L2)
GLUT1	0	73	Não se aplica
	1	23	A8; A15; B2; B14; C12; D10; D14; E5; F4; F12; G16; H9; H16; i6; i8; i14; i16; J5; J10; J12; L9; M6; M14
	2	3	(A3 e A4); (L15 e L16); (L1 e L2)
MCT1	0	82	Não se aplica
	1	15	B2; D14; E5; F4; F11; G16; H7; H16; i8; i16; J5; J12; L16; M6; N8
	2	2	(A3 e A4); (L1 e L2)
MCT2	0	82	Não se aplica
	1	14	B2; C12; D10; D14; E5; F4; I8; I14; I16; J5; J12; L16; M6; N8
	2	3	(A3 e A4); (C7 e C8); (L1 e L2)
MCT4	0	67	Não se aplica
	1	28	A11; A15; B9; C6; C12; D10; D14; E5; F4; G13; G15; H4; I4; I8; I14; I16; J5; J10; J12; J16; M3; M6; M9; M12; M14; M16; N7; N12
	2	4	(A3 e A4); (L1 e L2); (L9 e L10); (L15 e L16)
CD44	0	81	Não se aplica
	1	16	B2; B5; C12; D14; E5; F4; F5; I8; I14; I16; J5; J12; L16; M6; N7; N12
	2	2	(A3 e A4); (L1 e L2)
CD147	0	79	Não se aplica
	1	18	B2; B5; C12; D10; D14; E5; E10; F4; F5; G16; H7; i14; i16; j5; j12; L16; M6; N8
	2	2	(A3 e A4); (L1 e L2)
HIF-1α	0	61	Não se aplica
	1	31	A11; A15; B2; B4; B10; C6; C12; D14; E5; F4; F10; F12; F13; G12; G12; G16; H4; H9; I8; I14; I16; J5; J10; J12; J16; M3; M6; M9; M12; M14; M16
	2	7	(A3 e A4); (D15 e D16); (H15 e H16); (L1 e L2); (L9 e L10); (L15 e L16); (N7 e N8)

Tabela 3. Detalhamento das perdas de material nas lâminas de TMA-2.

Marcador	Perda Amostral	n	Detalhamento
CAIX	0	49	não se aplica
	1	5	B13; C11; D1; E10; E14
	2	1	(J8 e J10)
	3	0	não se aplica
GLUT1	0	48	não se aplica
	1	6	B12; C11; D1; E10; E14; J8
	2	1	(L8 e L9)
	3	0	não se aplica
MCT1	0	50	não se aplica
	1	5	B13; E10; E14; L14; M3
	2	0	não se aplica
	3	0	não se aplica
MCT2	0	53	não se aplica
	1	2	B13; E10
	2	0	não se aplica
	3	0	não se aplica
MCT4	0	50	não se aplica
	1	4	B13; C11; D1; E10
	2	1	(J8 e J10)
	3	0	não se aplica
CD44	0	47	não se aplica
	1	7	B13; C11; D1; E10; E14; J8; L8
	2	1	(D3 e D4)
	3	0	não se aplica
CD147	0	53	não se aplica
	1	1	B13
	2	1	(E14 e E15)
	3	0	não se aplica
HIF-1α	0	50	não se aplica
	1	5	E6; F13; G3; J9; L15
	2	0	não se aplica
	3	0	não se aplica

Tabela 4. Detalhamento das perdas de material nas lâminas de TMA-3.

Marcador	Perda Amostral	n	Detalhamento
CAIX	0	49	não se aplica
	1	4	F13; G2; J9; L5
	2	0	não se aplica
	3	0	não se aplica
GLUT1	0	49	não se aplica
	1	3	F13; J9; M15
	2	1	(G2 e G3)
	3	0	não se aplica
MCT1	0	46	não se aplica
	1	5	C2; E6; J9; J13; L15
	2	2	(F11 e F13); (G2 e G3)
	3	0	não se aplica
MCT2	0	44	não se aplica
	1	6	C7; F7; G3; G13; J9; L15
	2	3	(A14 e A15); (E5 e E6); (F11 e F13)
	3	0	não se aplica
MCT4	0	50	não se aplica
	1	3	F13; J9; L15
	2	0	não se aplica
	3	0	não se aplica
CD44	0	50	não se aplica
	1	3	F13; J9; L15
	2	0	não se aplica
	3	0	não se aplica
CD147	0	48	não se aplica
	1	4	G3; J9; L15; N4
	2	1	(F11 e F13)
	3	0	não se aplica
HIF-1α	0	48	não se aplica
	1	5	E6; F13; G3; J9; L15
	2	0	não se aplica
	3	0	não se aplica

3.5 Análise estatística

As características dos pacientes foram descritas através de frequências e percentuais para as medidas tipo atributo (sexo, grau nuclear de Fuhrman, estadiamento patológico, etc.) e médias com desvios padrão para as medidas contínuas (idade e tamanho). O perfil de expressão proteica foi apresentado em porcentagens.

Para a análise de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meier. Quando as variáveis eram qualitativas acrescentamos o teste de Log-Rank na análise uni variada; quando as variáveis eram contínuas acrescentamos o modelo de Cox Proportional Hazards. A análise multivariada foi realizada também com o modelo de Cox Proportional Hazards. Consideramos um nível de significância de 0,05; o que equivale a uma Confiança de 95%.

Para avaliar a relação entre a imunoexpressão das proteínas estudadas e os fatores prognósticos clássicos, apresentamos as medidas através de frequências para as variáveis qualitativas (porcentagens) ou de Média $\pm$ Desvio Padrão para as variáveis contínuas. O Teste Exato de Fisher foi utilizado para as variáveis qualitativas e o Teste t-Student foi usado para as variáveis contínuas.

A análise estatística foi realizada por profissional com formação em estatística e experiência em estatística médica, atuando no setor de estatística médica da Disciplina de Urologia do HCFMUSP, com auxílio de software específico.

3.6 Ética

Todas as amostras deste estudo foram codificadas para a garantia da confidencialidade. Este projeto foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e à Comissão de Ética em Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq - 1.751.706) e os pareceres de aprovação podem ser encontrados nos Anexos B e C.

4. RESULTADOS

4.1 Características populacionais

Os dados demográficos e clínicos obtidos através da revisão dos prontuários médicos estão reportados na Tabela 5. Nesta casuística, 141 (68,1%) indivíduos eram do sexo masculino e 66 (31,9%) do sexo feminino. A idade média foi de 60,5 anos. O tamanho tumoral médio foi de 5,6cm, atingindo majoritariamente o rim esquerdo (54,6%); 82 (39,6%) indivíduos possuíam sintomas ao diagnóstico. O tempo médio de seguimento foi de 122,8 meses.

Tabela 5. Dados demográficos e clínicos da população.

	n=207	%
Sexo		
Masculino	141	68,1
Feminino	66	31,9
Idade (anos)		
Média ± Desvio padrão Variação [mín-máx]	60,5 ± 12,2 [9-88]	
Tamanho do tumor (cm)		
Média ± Desvio padrão Variação [mín-máx]	5,6 ± 3,4 [1,2-23,5]	
Tempo Médio de Sobrevida (meses)		
Média ± Desvio padrão	160,4 ± 72,6	
Lado		
Direito	90	43,5
Esquerdo	113	54,6
Bilateral	4	1,9
Apresentação		
Assintomático	125	60,4
Sintomático	82	39,6

Os dados anatomopatológicos são provenientes do relatório final fornecido pelo laboratório de Patologia e estão na tabela 6. O estadió mais frequente foi pT1a (40,6%), com um predomínio de lesões Fuhrman 2 (47,3%).

A presença de necrose e invasão microvascular foi respectivamente 22,2% e 20,8%. E nenhum caso de variante sarcomatóide foi identificado.

Tabela 6. Dados anatomopatológicos da população estudada

	n=207	%
Estadio T (8 grupos)		
pT1a	84	40,6
pT1b	54	26,1
pT2a	11	5,3
pT2b	5	2,4
pT3a	46	22,2
pT3b	5	2,4
pT3c	0	0
pT4	2	1
Estadio T (4 grupos)		
T1	138	66,7
T2	16	7,7
T3	51	24,6
T4	2	1,0
Estadio N		
N0	201	97,1
N1	6	2,9
Estadio M		
M0	207	100
M1	0	0
Tamanho do tumor (categorizado)		
até 4cm	90	43,5
entre 4,1cm e 7cm	67	32,4
maior que 7,1cm	50	24,1
Grau nuclear de Fuhrman		
G1	43	20,8
G2	98	47,3
G3	51	24,7
G4	15	7,2
Invasão Microvascular		
Presente	43	20,8
Ausente	164	79,2
Necrose		
Presente	46	22,2
Ausente	161	77,8
Invasão de Gordura Perirrenal		
Presente	42	20,3
Ausente	165	79,7

4.2 Sobrevida global e câncer específica e os fatores prognósticos clássicos

Nesta série, formada por 207 pacientes portadores de CCRcc localizado, foi feita uma análise inicial para avaliação dos fatores prognósticos clássicos.

O tamanho tumoral mostrou uma correlação com a sobrevida global ($p<0,0001$) e câncer específica ($p<0,0001$). O cálculo do risk ratio apresentou um valor de 1,141 para sobrevida global, o que significa que a cada 10mm o risco de morte é 3,75 vezes maior. O mesmo cálculo foi realizado para sobrevida câncer-específica e o resultado foi 1,205; indicando que a cada 10mm o risco de óbito é 6,45 vezes maior.

A idade no momento do diagnóstico se correlacionou com a sobrevida global ($p=0,0037$), com o risk ratio de 1,035; o que equivale dizer que a cada 10 anos o risco de óbito aumenta 1,41 vezes. Mas a mesma variável não se correlacionou com a sobrevida câncer específica ($p=0,4573$).

A seguir serão apresentados os resultados de sobrevida global e sobrevida câncer específica para cada fator prognóstico clássico que seja uma variável qualitativa. No texto estão disponíveis os gráficos de Kaplan-Meier com o respectivo Log-Rank quando os resultados são estatisticamente significantes (valor- $p<0,05$). Os demais resultados estão no Apêndice 1.

4.3 Apresentação

A presença de sintomas no momento do diagnóstico foi analisada nos 207 casos. O gráfico 1 mostra que essa variável tem impacto na sobrevida global ($p=0,0164$) e câncer específica ($p=0,0006$).

Figura 9. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de sintomas ao diagnóstico.

4.4 Necrose

A presença de necrose no exame anatomopatológico foi analisada nos 207 casos. O gráfico 2 mostra que essa variável tem impacto na sobrevida global ($p=0,0006$) e câncer específica ($p<0,0001$).

Figura 10. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de necrose.

4.5 Invasão Microvascular

A presença de IMV no exame anatomopatológico foi analisada nos 207 casos. O gráfico 3 mostra que essa variável tem impacto na sobrevida global ($p=0,0002$) e a sobrevida câncer específica ($p=0,0001$).

Figura 11. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de embolização neoplásica intravascular.

4.6 Invasão da Veia Renal

A presença de invasão da veia renal foi analisada nos 207 casos. O gráfico 4 mostra que essa variável tem impacto na sobrevida global ($p<0,0001$) e câncer específica ($p<0,0001$).

Figura 12. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de invasão da veia renal.

4.7 Invasão de Cápsula Renal

A presença de invasão da cápsula renal foi analisada nos 207 casos. O gráfico 5 mostra que essa variável tem impacto na sobrevida global ($p=0,0005$) e câncer específica ($p<0,0001$).

Figura 13. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela presença ou não de invasão da cápsula renal.

4.8 Grau nuclear de Fuhrman

O grau nuclear de Fuhrman foi avaliado em 207 casos. O gráfico 6 mostra que essa variável quando estratificada em 4 grupos, impacta a sobrevida global ($p=0,0006$) e a sobrevida câncer específica ($p=0,0012$).

Figura 14. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela graduação nuclear de Fuhrman.

4.9 Estadiamento patológico T (pT)

O estadiamento patológico pT foi avaliado em 207 casos. Ele foi estratificado em 4 grupos correspondentes a pT1, pT2, pT3 e pT4. O gráfico 7 mostra que esta variável tem impacto na sobrevida global ($p=0,0192$) e câncer específica ($p<0,0001$).

Figura 15. Sobrevida global e câncer específica estratificada pelo estadiamento patológico T (pT)

4.10 Estadiamento patológico N (pN)

O estadiamento patológico pN foi avaliado em 207 casos. O gráfico 8 mostra que esta variável se relacionou com a sobrevida global ($p<0,0001$) e câncer específica ($p<0,0001$), embora o número de pacientes com linfonodos comprometidos seja pequeno.

Figura 16. Sobrevida global e câncer específica estratificada pelo status nodal (pN).

4.11 Invasão da gordura perirrenal

A presença de invasão de gordura perirrenal foi avaliada em 207 casos. O gráfico 9 mostra que essa variável não se correlacionou com a sobrevida global ($p=0,0596$) mas teve impacto na sobrevida câncer específica (0,0008).

Figura 17. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela invasão ou não da gordura perirrenal

Na sequência, serão apresentados os resultados da análise uni variada de cada uma das proteínas analisadas para sobrevida global e sobrevida câncer-específica. Em todas as análises estratificamos a imunoexpressão em dois grupos: grupo 1 formado por aqueles com expressão 0 e 1 e grupo 2 formado por aqueles com expressão 2 e 3.

Da mesma forma, gráficos de sobrevida construídos pelo método de Kaplan-Meier serão apresentados no texto quando os dados forem estatisticamente significantes ($\text{valor-}p < 0,05$), caso contrário estarão disponíveis no Apêndice.

4.12 CA-IX

A expressão de CA-IX foi analisada em 205 casos. O padrão de expressão foi predominantemente de membrana, eventualmente associada à expressão citoplasmática.

A distribuição da imunoexpressão pelas categorias semi-quantitativas utilizadas foi: expressão 0: 12 (5,8%); expressão 1: 20 (9,8%); expressão 2: 55 (26,8%) e expressão 3: 118 (57,6%). A figura 9 mostra os histospots com expressão 0 e expressão 3 para CA-IX.

Figura 18. Histospots com expressão 0 (A) e expressão 3 para CA-IX (B).

A análise uni variada, calculada pelo modelo de Log-Rank, demonstrou que a expressão imuno-histoquímica de CA-IX não apresentou diferença

estatisticamente significante entre os grupos, tanto na sobrevida global ($p=0,2429$) quanto câncer-específica ($p=0,4817$).

4.13 CD44

A expressão de CD44 foi analisada em 205 casos válidos. O padrão de expressão foi de membrana plasmática.

A distribuição da imunoexpressão pelas categorias semi-quantitativas utilizadas foi: expressão 0: 76 (37,1%); expressão 1: 12 (5,9%); expressão 2: 21 (10,2%) e expressão 3: 96 (46,8%). A figura 10 mostra os histospots com expressão 0 e expressão 3 para CD44.

Figura 19. Histospots com expressão 0 (C) e expressão 3 para CD44 (D).

O gráfico 10 demonstra que a expressão imuno-histoquímica de CD44 apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos em relação a sobrevida global ($p=0,0395$) mas não câncer-específica ($p=0,0684$), embora tenha sido próximo de 0,05.

Figura 20. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela expressão de CD44.

4.14 CD147

A expressão de CD147 foi analisada em 205 casos. O padrão de expressão foi predominantemente de membrana, eventualmente associada à expressão citoplasmática.

A distribuição da imunoexpressão pelas categorias semi-quantitativas utilizadas foi: expressão 0: 96 (46,8%); expressão 1: 51 (24,9%); expressão 2: 35 (17,1%) e expressão 3: 23 (11,2%). A figura 11 mostra os histospots com expressão 0 e expressão 3 para CD147.

Figura 21. Histospots com expressão 0 (E) e expressão 3 para CD147 (F).

O gráfico 11 mostra que houve uma relação entre a expressão de CD147 e a sobrevida global ($p=0,0004$) e câncer específica ($p=0,0002$).

Figura 22. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela expressão de CD147.

4.15 GLUT1

A expressão de GLUT1 foi analisada em 204 casos válidos. O padrão de expressão foi predominantemente de membrana, eventualmente associada à expressão citoplasmática.

A distribuição da imunoexpressão pelas categorias semi-quantitativas utilizadas foi: expressão 0: 7 (3,4%); expressão 1: 39 (19,1%); expressão 2: 66 (32,4%) e expressão 3: 92 (45,1%). A figura 12 mostra os histospots com expressão 0 e expressão 3 para GLUT1.

Figura 23. Histospots com expressão 0 (G) e expressão 3 para GLUT1 (H).

Não houve diferença na expressão de GLUT1 quanto à sobrevida global ($p=0,1848$) ou câncer-específica ($p=0,1038$).

4.16 MCT1

A expressão de MCT1 foi analisada em 205 casos válidos. O padrão de expressão foi predominantemente de membrana, eventualmente associada à expressão citoplasmática.

A distribuição da imunoexpressão pelas categorias semi-quantitativas utilizadas foi: expressão 0: 106 (51,7%); expressão 1: 47 (22,9%); expressão 2: 26 (12,7%) e expressão 3: 26 (12,7%). A figura 13 mostra os histospots com expressão 0 e expressão 3 para MCT1.

Figura 24. Histospots com expressão 0 (I) e expressão 3 para MCT1 (J).

O gráfico 12 mostra correlação entre a expressão de MCT1 e a sobrevida global ($p=0,0003$) e câncer específica ($p<0,0001$).

Figura 25. Sobrevida global e câncer específica estratificado pela expressão de MCT1.

4.17 MCT2

A expressão de MCT2 foi analisada em 204 casos válidos. O padrão de expressão foi predominantemente citoplasmático.

A distribuição da imunoexpressão pelas categorias semi-quantitativas utilizadas foi: expressão 0: 18 (8,8%); expressão 1: 63 (30,9%); expressão 2: 77 (37,7%) e expressão 3: 46 (22,6%). A figura 14 mostra os histospots com expressão 0 e expressão 3 para MCT2.

Figura 26. Histospots com expressão 0 (K) e expressão 3 para MCT2 (L).

A expressão imuno-histoquímica de MCT2 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à sobrevida global ($p=0,5531$) e câncer-específica ($p=0,4208$).

4.18 MCT4

A expressão de MCT 4 foi analisada em 203 casos válidos. O padrão de expressão foi predominantemente de membrana, eventualmente associada à expressão citoplasmática.

A distribuição da imunoexpressão pelas categorias semi-quantitativas utilizadas foi: expressão 0: 7 (3,5%); expressão 1: 25 (12,3%); expressão 2: 48 (23,6%) e expressão 3: 123 (60,6%). A figura 15 mostra os histospots com expressão 0 e expressão 3 para MCT4.

Figura 27. Histospots com expressão 0 (M) e expressão 3 para MCT2 (N).

Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à sobrevida global ($p=0,8488$) ou câncer-específica ($p=0,1432$).

4.19 HIF-1 α

A expressão de HIF-1 α foi analisada em 201 casos válidos. O padrão de expressão foi predominantemente citoplasmático.

A distribuição da imunoexpressão pelas categorias semi-quantitativas utilizadas foi: expressão 0: 1 (0,5%); expressão 1: 13 (6,5%); expressão 2: 71 (35,3%) e expressão 3: 116 (57,7%). A figura 16 mostra os histospots com expressão 0 e expressão 3 para HIF-1 α .

A expressão imuno-histoquímica de HIF-1 α não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à sobrevida global ($p=0,9211$) ou câncer-específica ($p=0,8847$).

Figura 28. Histospots com expressão 0 (O) e expressão 3 para HIF-1 α (P).

4.20 Análise Multivariada

A análise multivariada foi realizada pelo modelo Cox Proportional Hazards, com as variáveis prognósticas clássicas estatisticamente significantes ($p<0,05$) na análise uni variada e com a expressão de cada proteína avaliada

no presente trabalho. Para facilitar a identificação de quais variáveis foram utilizadas em cada análise multivariada, construímos a tabela 7 com o resumo dos valores-p obtidos na análise uni variada.

Tabela 7. Resumos dos valores-p na análise uni variada.

Fator prognóstico	Sobrevida global	Sobrevida câncer-específica
	valor-p	valor-p
Idade	0,0037	0,4573
Tamanho	<0,0001	<0,0001
Apresentação	0,0164	0,0006
Fuhrman - 4 grupos	0,0006	0,0012
Invasão Gordura	0,0596	0,0008
IMV	0,0002	0,0001
Invasão Veia Renal	<0,0001	<0,0001
Necrose	0,0006	<0,0001
Invasão da cápsula	0,0005	<0,0001
pT - 4 grupos	0,0192	<0,0001
pN	<0,0001	<0,0001
CA-IX	0,2429	0,4817
CD44	0,0395	0,0684
CD147	0,0004	0,0002
GLUT1	0,1848	0,1038
MCT1	0,0003	<0,0001
MCT2	0,5531	0,4208
MCT4	0,8488	0,1432
HIF1-α	0,9211	0,8847

A tabela 8 apresenta o resultado pelo Modelo Cox Proportional Hazards para CD44. CD44 não foi um fator independente para a determinação da sobrevida global ($p=0,3059$).

Tabela 8. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – CD44

Fonte	Graus de liberdade	Qui-quadrado	p-value	Nível 1	Nível 2	OR	IC95%
Idade	1	15,789	<,0001			1,05	(1,03;1,08)
Tamanho	1	11,297	0,0008			1,15	(1,05;1,24)
Inv	1	17,469	<,0001	Sim	Não	6,68	(2,79;16,82)
V.Renal							
pT 4 grupos	3	6,555	0,0875	pT1	pT2	0,92	(0,39;2,44)
				pT1	pT3	3,13	(1,20;9,31)
				pT1	pT4	—	(—;—)
				pT2	pT3	3,41	(1,19;9,30)
				pT2	pT4	—	(—;—)
				pT3	pT4	—	(—;—)
pN	1	24,519	<,0001	pN1	pN0	13,69	(4,86;38,57)
CD44	1	1,048	0,3059	2 e 3	0 e 1	1,36	(0,76;2,44)

A tabela 9 mostra que a expressão de CD147 foi um fator independente para a determinação da sobrevida global com um OR de 1,86 (p=0,0448).

Tabela 9. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – CD147

Fonte	Graus de liberdade	Qui-quadrado	p-value	Nível 1	Nível 2	OR	IC95%
Idade	1	16,958	<,0001			1,06	(1,03;1,09)
Tamanho	1	10,79	0,001			1,14	(1,05;1,23)
Inv	1	17,167	<,0001	Sim	Não	6,4	(2,70;15,82)
V.Renal							
pT 4grupos	3	8,369	0,039	pT1	pT2	0,77	(0,31;2,08)
				pT1	pT3	3,39	(1,29;10,03)
				pT1	pT4	—	(—;—)
				pT2	pT3	4,42	(1,48;12,56)
				pT2	pT4	—	(—;—)
				pT3	pT4	—	(—;—)
pN	1	23,406	<,0001	pN1	pN0	12,67	(4,53;35,45)
CD147	1	4,027	0,0448	2 e 3	0 e 1	1,86	(1,01;3,42)

A tabela 10 mostra que a expressão de MCT 1 foi igualmente importante na determinação da sobrevida global, com OR de 1,88 (p=0,0281).

Tabela 10. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – MCT 1

Fonte	Graus de liberdade	Qui-quadrado	p-value	Nível 1	Nível 2	OR	IC95%
Idade	1	15,8	<,0001			1,05	(1,03;1,08)
Tamanho	1	9,996	0,0016			1,15	(1,05;1,24)
Inv	1	18,973	<,0001	Sim	Não	7,19	(3,01;18,03)
V.Renal							
pT 4grupos	3	7,887	0,0484	pT1	pT2	0,95	(0,39;2,55)
				pT1	pT3	3,66	(1,35;11,35)
				pT1	pT4	—	(—;—)
				pT2	pT3	3,87	(1,34;10,56)
				pT2	pT4	—	(—;—)
				pT3	pT4	—	(—;—)
pN	1	22,496	<,0001	pN1	pN0	12,18	(3,87;31,74)
MCT 1	1	4,825	0,0281	2 e 3	0 e 1	1,88	(1,06;3,29)

A seguir, a mesma sequência estatística foi realizada para sobrevida câncer-específica.

A tabela 11 mostra que a expressão de CD44 não foi independentemente relacionada a sobrevida câncer-específica ($p=0,7434$).

Tabela 11. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – CD44

Fonte	Graus de liberdade	Qui-quadrado	p-value	Nível 1	Nível 2	OR	IC95%
Idade	1	4,241	0,0395			1,04	(1,00;1,08)
Tamanho	1	9,9	0,0017			1,16	(1,05;1,26)
Inv	1	15,361	<,0001	Sim	Não	7,73	(2,86;22,58)
V.Renal							
pT 4 grupos	3	6,059	0,1088	pT1	pT2	0,46	(0,15;1,49)
				pT1	pT3	1,88	(0,53;7,77)
				pT1	pT4	—	(—;—)
				pT2	pT3	4,07	(1,24;13,09)
				pT2	pT4	—	(—;—)
				pT3	pT4	—	(—;—)
pN	1	21,267	<,0001	pN1	pN0	27,81	(6,34;114,82)
CD44	1	0,107	0,7434	2 e 3	0 e 1	1,14	(0,52;2,67)

A tabela 12 mostra que CD147 também não foi determinante da sobrevida câncer-específica ($p=0,1142$).

Tabela 12. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – CD147

Fonte	Graus de liberdade	Qui-quadrado	p-value	Nível 1	Nível 2	OR	IC95%
Idade	1	5,036	0,0248			1,04	(1,01;1,08)
Tamanho	1	9,632	0,0019			1,15	(1,05;1,26)
Inv	1	15,235	<,0001	Sim	Não	7,56	(2,80;21,69)
V.Renal							
pT 4	3	7,99	0,0462	pT1	pT2	0,39	(0,13;1,29)
grupos				pT1	pT3	2,26	(0,61;9,44)
				pT1	pT4	—	(—;—)
				pT2	pT3	5,81	(1,62;20,55)
				pT2	pT4	—	(—;—)
				pT3	pT4	—	(—;—)
pN	1	20,089	<,0001	pN1	pN0	24,76	(5,70;101,31)
CD147	1	2,495	0,1142	2 e 3	0 e 1	2,01	(0,85;4,80)

Por fim, a tabela 13 mostra que MCT1 foi independente na determinação da sobrevida câncer-específica, com um OR de 2,31 ($p=0,031$).

Tabela 13. Resultado da análise Cox Proportional Hazards – MCT1

Fonte	Graus de liberdade	Qui-quadrado	p-value	Nível 1	Nível 2	OR	IC95%
Idade	1	4,016	0,0451			1,04	(1,00;1,08)
Tamanho	1	8,835	0,003			1,16	(1,04;1,27)
Inv	1	16,801	<,0001	Sim	Não	8,94	(3,23;26,67)
V.Renal							
pT 4	3	7,864	0,0489	pT1	pT2	0,5	(0,16;1,64)
grupos				pT1	pT3	2,69	(0,69;12,47)
				pT1	pT4	—	(—;—)
				pT2	pT3	5,4	(1,58;18,17)
				pT2	pT4	—	(—;—)
				pT3	pT4	—	(—;—)
pN	1	19,186	<,0001	pN1	pN0	22,91	(5,28;93,61)
MCT 1	1	4,653	0,031	2 e 3	0 e 1	2,31	(1,07;4,96)

4.21 Proteínas versus fatores prognósticos

Na sequência, iremos estratificar os fatores prognósticos pela imunoexpressão de cada proteína. Os dados serão apresentados a partir de medidas de frequências (percentuais) ou de Média $\pm$ Desvio Padrão.

Para verificar a relação entre estes parâmetros, iremos usar o teste Exato de Fisher para comparar os percentuais ou teste t-Student para comparar as médias destas amostras independentes.

4.22 CA-IX

A tabela 14 apresenta a distribuição de frequências (porcentagens) e médias com desvio padrão dos fatores prognósticos convencionais estratificados pela imunoexpressão de CA-IX em dois grupos, conforme descrito anteriormente.

Para CA-IX, não houve relação entre seu padrão de imunoexpressão e os fatores prognósticos convencionais.

Tabela 14. Fatores prognósticos e expressão da proteína CA-IX

CA-IX				
Característica	Grupo	0 e 1	2 e 3	p-value
Sexo	Feminino	13 (19,7%)	53 (80,3%)	0,3047
	Masculino	19 (13,7%)	120 (86,3%)	
Apresentação	Assintomático	16 (13,0%)	107 (87,0%)	0,2407
	Sintomático	16 (19,5%)	66 (80,5%)	
Fuhrman	1	8 (19,0%)	34 (81,0%)	0,5863
	2	12 (12,4%)	85 (87,6%)	
	3	10 (19,6%)	41 (80,4%)	
	4	2 (13,3%)	13 (86,7%)	
Inv Gordura	Não	26 (16,0%)	137 (84,0%)	0,9999
	Sim	6 (14,3%)	36 (85,7%)	
IMV	Não	24 (14,8%)	138 (85,2%)	0,6362
	Sim	8 (18,6%)	35 (81,4%)	
Inv V.Renal	Não	27 (15,1%)	152 (84,9%)	0,5679
	Sim	5 (19,2%)	21 (80,8%)	
Necrose	Não	26 (16,3%)	134 (83,8%)	0,8167
	Sim	6 (13,3%)	39 (86,7%)	
Inv Cápsula	Não	24 (15,3%)	133 (84,7%)	0,8220
	Sim	8 (16,7%)	40 (83,3%)	
pT	pT1	22 (16,2%)	114 (83,8%)	0,8704
	pT2	3 (18,8%)	13 (81,3%)	
	pT3	7 (13,7%)	44 (86,3%)	
	pT4	0 (0,0%)	2 (100,0%)	
pN	pN0	30 (15,1%)	169 (84,9%)	0,2366
	pN1	2 (33,3%)	4 (66,7%)	
Idade Tamanho		55,8±14,5	61,5±11,6	0,0397
		5,6±4,4	5,6±3,2	0,9506

4.23 CD147

Para CD147, houve relação entre sua alta imunoexpressão com o sexo masculino ($p=0,0310$), com a presença de sintomas ($p=0,0396$), maior grau nuclear de Fuhrman ($p=0,0006$), invasão da gordura perirrenal ($p=0,0223$), invasão da veia renal ($p<0,0001$), presença de necrose ($p=0,0012$), estadiamento pT ($p=0,0001$) e tamanho tumoral ($p=0,0012$) (Tabela 15).

Tabela 15. Fatores prognósticos e expressão da proteína CD147

CD147				
Característica	Grupo	0 e 1	2 e 3	p-value
Sexo	Feminino	54 (81,8%)	12 (18,2%)	0,0310
	Masculino	93 (66,9%)	46 (33,1%)	
Apresentação	Assintomático	95 (77,2%)	28 (22,8%)	0,0396
	Sintomático	52 (63,4%)	30 (36,6%)	
Fuhrman	1	36 (85,7%)	6 (14,3%)	0,0006
	2	74 (76,3%)	23 (23,7%)	
	3	32 (62,7%)	19 (37,3%)	
	4	5 (33,3%)	10 (66,7%)	
Inv Gordura	Não	123 (75,5%)	40 (24,5%)	0,0223
	Sim	24 (57,1%)	18 (42,9%)	
IMV	Não	120 (74,1%)	42 (25,9%)	0,1820
	Sim	27 (62,8%)	16 (37,2%)	
Inv V.Renal	Não	138 (77,1%)	41 (22,9%)	<0,0001
	Sim	9 (34,6%)	17 (65,4%)	
Necrose	Não	124 (77,5%)	36 (22,5%)	0,0012
	Sim	23 (51,1%)	22 (48,9%)	
Inv Cápsula	Não	114 (72,6%)	43 (27,4%)	0,5886
	Sim	33 (68,8%)	15 (31,3%)	
pT	pT1	107 (78,7%)	29 (21,3%)	0,0001
	pT2	14 (87,5%)	2 (12,5%)	
	pT3	24 (47,1%)	27 (52,9%)	
	pT4	2 (100,0%)	0 (0,0%)	
pN	pN0	144 (72,4%)	55 (27,6%)	0,3542
	pN1	3 (50,0%)	3 (50,0%)	
Idade		60,1±12,8	61,9±10,7	0,3204
Tamanho		5,0±3,0	7,0±4,1	0,0012

4.24 CD44

Para CD44, houve relação entre a alta imunoexpressão e a presença de sintomas ($p=0,0442$), com a maior graduação nuclear de Fuhrman ($p=0,001$), presença de invasão da veia renal ($p=0,0104$), presença de necrose ($p=0,005$) e tamanho tumoral ($p=0,0009$) (Tabela 16).

Tabela 16. Fatores prognósticos e expressão da proteína CD44

CD44				
Característica	Grupo	0 e 1	2 e 3	p-value
Sexo	Feminino	33 (50,0%)	33 (50,0%)	0,1759
	Masculino	55 (39,6%)	84 (60,4%)	
Apresentação	Assintomático	60 (48,8%)	63 (51,2%)	0,0442
	Sintomático	28 (34,1%)	54 (65,9%)	
Fuhrman	1	27 (64,3%)	15 (35,7%)	0,0010
	2	43 (44,3%)	54 (55,7%)	
	3	16 (31,4%)	35 (68,6%)	
	4	2 (13,3%)	13 (86,7%)	
Inv Gordura	Não	73 (44,8%)	90 (55,2%)	0,3014
	Sim	15 (35,7%)	27 (64,3%)	
IMV	Não	74 (45,7%)	88 (54,3%)	0,1652
	Sim	14 (32,6%)	29 (67,4%)	
Inv V.Renal	Não	83 (46,4%)	96 (53,6%)	0,0104
	Sim	5 (19,2%)	21 (80,8%)	
Necrose	Não	79 (49,4%)	81 (50,6%)	0,0005
	Sim	9 (20,0%)	36 (80,0%)	
Inv Cápsula	Não	69 (43,9%)	88 (56,1%)	0,6210
	Sim	19 (39,6%)	29 (60,4%)	
pT	pT1	66 (48,5%)	70 (51,5%)	0,0793
	pT2	6 (37,5%)	10 (62,5%)	
	pT3	15 (29,4%)	36 (70,6%)	
	pT4	1 (50,0%)	1 (50,0%)	
pN	pN0	85 (42,7%)	114 (57,3%)	0,9999
	pN1	3 (50,0%)	3 (50,0%)	
Idade		60,2±13,5	61,0±11,3	0,6465
Tamanho		4,7±2,6	6,2±3,8	0,0009

4.25 GLUT1

Para GLUT1, houve relação entre sua alta imunoexpressão e a presença de invasão de veia renal ($p=0,0115$), presença de necrose ($p=0,0432$) e o tamanho tumoral ($p=0,0005$) (Tabela 17).

Tabela 17. Fatores prognósticos e expressão da proteína GLUT1

GLUT1				
Característica	Grupo	0 e 1	2 e 3	p-value
Sexo	Feminino	19 (29,2%)	46 (70,8%)	0,1500
	Masculino	27 (19,4%)	112 (80,6%)	
Apresentação	Assintomático	30 (24,6%)	92 (75,4%)	0,4947
	Sintomático	16 (19,5%)	66 (80,5%)	
Fuhrman	1	12 (29,3%)	29 (70,7%)	0,6472
	2	21 (21,6%)	76 (78,4%)	
	3	11 (21,6%)	40 (78,4%)	
	4	2 (13,3%)	13 (86,7%)	
Inv Gordura	Não	39 (24,1%)	123 (75,9%)	0,4079
	Sim	7 (16,7%)	35 (83,3%)	
IMV	Não	39 (24,2%)	122 (75,8%)	0,3105
	Sim	7 (16,3%)	36 (83,7%)	
Inv V.Renal	Não	45 (25,3%)	133 (74,7%)	0,0115
	Sim	1 (3,8%)	25 (96,2%)	
Necrose	Não	41 (25,8%)	118 (74,2%)	0,0432
	Sim	5 (11,1%)	40 (88,9%)	
Inv Cápsula	Não	37 (23,7%)	119 (76,3%)	0,5565
	Sim	9 (18,8%)	39 (81,3%)	
pT	pT1	36 (26,7%)	99 (73,3%)	0,2442
	pT2	3 (18,8%)	13 (81,3%)	
	pT3	7 (13,7%)	44 (86,3%)	
	pT4	0 (0,0%)	2 (100,0%)	
pN	pN0	46 (23,2%)	152 (76,8%)	0,3407
	pN1	0 (0,0%)	6 (100,0%)	
Idade		58,3±13,4	61,2±11,8	0,1794
Tamanho		4,3±2,6	6,0±3,5	0,0005

4.26 MCT1

Para MCT1, houve relação entre sua alta imunoexpressão e a apresentação sintomática ($p=0,0001$), maior grau nuclear de Fuhrman ($p=0,0059$), invasão da gordura perirrenal ($p=0,0024$), invasão da veia renal ($p=0,0002$), presença de necrose ($p=0,0001$), invasão da cápsula ($p=0,0135$), estadiamento pT ($p<0,0001$) e tamanho tumoral ($p<0,0001$) (Tabela 18).

Tabela 18. Fatores prognósticos e expressão da proteína MCT1

MCT1				
Característica	Grupo	0 e 1	2 e 3	p-value
Sexo	Feminino	52 (78,8%)	14 (21,2%)	0,3934
	Masculino	101 (72,7%)	38 (27,3%)	
Apresentação	Assintomático	104 (84,6%)	19 (15,4%)	0,0001
	Sintomático	49 (59,8%)	33 (40,2%)	
Fuhrman	1	39 (92,9%)	3 (7,1%)	0,0059
	2	71 (73,2%)	26 (26,8%)	
	3	34 (66,7%)	17 (33,3%)	
	4	9 (60,0%)	6 (40,0%)	
Inv Gordura	Não	130 (79,8%)	33 (20,2%)	0,0024
	Sim	23 (54,8%)	19 (45,2%)	
IMV	Não	125 (77,2%)	37 (22,8%)	0,1174
	Sim	28 (65,1%)	15 (34,9%)	
Inv V.Renal	Não	142 (79,3%)	37 (20,7%)	0,0002
	Sim	11 (42,3%)	15 (57,7%)	
Necrose	Não	130 (81,3%)	30 (18,8%)	0,0001
	Sim	23 (51,1%)	22 (48,9%)	
Inv Cápsula	Não	124 (79,0%)	33 (21,0%)	0,0135
	Sim	29 (60,4%)	19 (39,6%)	
pT	pT1	114 (83,8%)	22 (16,2%)	<0,0001
	pT2	12 (75,0%)	4 (25,0%)	
	pT3	26 (51,0%)	25 (49,0%)	
	pT4	1 (50,0%)	1 (50,0%)	
pN	pN0	150 (75,4%)	49 (24,6%)	0,1723
	pN1	3 (50,0%)	3 (50,0%)	
Idade		60,3±13,0	61,7±9,8	0,4136
Tamanho		4,9±2,9	7,8±3,8	<0,0001

4.27 MCT2

Para MCT2, não houve relação entre seu padrão de imunexpressão e os fatores prognósticos convencionais (Tabela 19).

Tabela 19. Fatores prognósticos e expressão da proteína MCT2

MCT2				
Característica	Grupo	0 e 1	2 e 3	p-value
Sexo	Feminino	30 (45,5%)	36 (54,5%)	0,2851
	Masculino	51 (37,0%)	87 (63,0%)	
Apresentação	Assintomático	53 (43,4%)	69 (56,6%)	0,1927
	Sintomático	28 (34,1%)	54 (65,9%)	
Fuhrman	1	21 (51,2%)	20 (48,8%)	0,1248
	2	41 (42,3%)	56 (57,7%)	
	3	15 (29,4%)	36 (70,6%)	
	4	4 (26,7%)	11 (73,3%)	
Inv Gordura	Não	62 (38,3%)	100 (61,7%)	0,4798
	Sim	19 (45,2%)	23 (54,8%)	
IMV	Não	63 (39,1%)	98 (60,9%)	0,8609
	Sim	18 (41,9%)	25 (58,1%)	
Inv V.Renal	Não	68 (38,2%)	110 (61,8%)	0,2864
	Sim	13 (50,0%)	13 (50,0%)	
Necrose	Não	67 (42,1%)	92 (57,9%)	0,2275
	Sim	14 (31,1%)	31 (68,9%)	
Inv Cápsula	Não	64 (41,0%)	92 (59,0%)	0,5058
	Sim	17 (35,4%)	31 (64,6%)	
pT	pT1	55 (40,7%)	80 (59,3%)	0,7368
	pT2	5 (31,3%)	11 (68,8%)	
	pT3	21 (41,2%)	30 (58,8%)	
	pT4	0 (0,0%)	2 (100,0%)	
pN	pN0	79 (39,9%)	119 (60,1%)	0,9999
	pN1	2 (33,3%)	4 (66,7%)	
Idade		60,0±12,9	61,0±11,9	0,5757
Tamanho		5,2±3,5	5,9±3,3	0,1270

4.28 MCT4

Para MCT4, houve relação entre sua alta imunoe expressão e o tamanho tumoral ($p < 0,0001$) (Tabela 20).

Tabela 20. Fatores prognósticos e expressão da proteína MCT4

MCT4				
Característica	Grupo	0 e 1	2 e 3	p-value
Sexo	Feminino	11 (17,2%)	53 (82,8%)	0,6844
	Masculino	21 (15,1%)	118 (84,9%)	
Apresentação	Assintomático	20 (16,5%)	101 (83,5%)	0,8449
	Sintomático	12 (14,6%)	70 (85,4%)	
Fuhrman	1	10 (24,4%)	31 (75,6%)	0,2663
	2	12 (12,4%)	85 (87,6%)	
	3	9 (18,0%)	41 (82,0%)	
	4	1 (6,7%)	14 (93,3%)	
Inv Gordura	Não	28 (17,4%)	133 (82,6%)	0,2451
	Sim	4 (9,5%)	38 (90,5%)	
IMV	Não	27 (16,8%)	134 (83,2%)	0,6344
	Sim	5 (11,9%)	37 (88,1%)	
Inv V.Renal	Não	31 (17,5%)	146 (82,5%)	0,0868
	Sim	1 (3,8%)	25 (96,2%)	
Necrose	Não	28 (17,7%)	130 (82,3%)	0,1723
	Sim	4 (8,9%)	41 (91,1%)	
Inv Cápsula	Não	28 (18,1%)	127 (81,9%)	0,1183
	Sim	4 (8,3%)	44 (91,7%)	
pT	pT1	26 (19,4%)	108 (80,6%)	0,2147
	pT2	2 (12,5%)	14 (87,5%)	
	pT3	4 (7,8%)	47 (92,2%)	
	pT4	0 (0,0%)	2 (100,0%)	
pN	pN0	32 (16,2%)	165 (83,8%)	0,5926
	pN1	0 (0,0%)	6 (100,0%)	
Idade		56,0±14,6	61,4±11,6	0,0539
Tamanho		3,8±2,2	6,0±3,5	<0,0001

4.29 HIF-1 α

Para HIF-1 α , não houve relação entre seu padrão de imunoe expressão e os fatores prognósticos convencionais (Tabela 21).

Tabela 21. Fatores prognósticos e expressão da proteína HIF-1 α

HIF-1 α				
Característica	Grupo	0 e 1	2 e 3	p-value
Sexo	Feminino	5 (7,9%)	58 (92,1%)	0,7678
	Masculino	9 (6,5%)	129 (93,5%)	
Apresentação	Assintomático	8 (6,7%)	112 (93,3%)	0,9999
	Sintomático	6 (7,4%)	75 (92,6%)	
Fuhrman	1	4 (9,8%)	37 (90,2%)	0,4755
	2	5 (5,3%)	90 (94,7%)	
	3	3 (6,0%)	47 (94,0%)	
	4	2 (13,3%)	13 (86,7%)	
Inv Gordura	Não	13 (8,2%)	146 (91,8%)	0,3086
	Sim	1 (2,4%)	41 (97,6%)	
IMV	Não	13 (8,2%)	146 (91,8%)	0,3086
	Sim	1 (2,4%)	41 (97,6%)	
Inv V.Renal	Não	14 (8,0%)	161 (92,0%)	0,2231
	Sim	0 (0,0%)	26 (100,0%)	
Necrose	Não	11 (7,1%)	145 (92,9%)	0,9999
	Sim	3 (6,7%)	42 (93,3%)	
Inv Cápsula	Não	10 (6,5%)	143 (93,5%)	0,7457
	Sim	4 (8,3%)	44 (91,7%)	
pT	pT1	12 (9,1%)	120 (90,9%)	0,317
	pT2	1 (6,3%)	15 (93,8%)	
	pT3	1 (2,0%)	50 (98,0%)	
	pT4	0 (0,0%)	2 (100,0%)	
pN	pN0	13 (6,7%)	182 (93,3%)	0,3552
	pN1	1 (16,7%)	5 (83,3%)	
Idade		58,9 $\pm$ 15,0	60,6 $\pm$ 12,1	0,6796
Tamanho		4,9 $\pm$ 2,3	5,7 $\pm$ 3,5	0,2259

5. DISCUSSÃO

Os tumores são entidades metabólicas que compreendem células cancerígenas e hospedeiras. Sua manutenção depende do acesso a nutrientes, atividades biológicas e localização espaço-temporal. Enquanto a maioria das células do corpo oxida completamente a glicose em CO₂ (fosforilação oxidativa), as células expostas à ambiente de hipóxia e as células em proliferação convertem preferencialmente glicose em lactato em processos conhecidos como glicólise anaeróbica e aeróbica, respectivamente. Esses fenótipos metabólicos estão no centro da biologia tumoral. Nos tumores sólidos, os comutadores glicolíticos associados à adaptação a hipóxia e a proliferação celular operam por diferentes mecanismos. De fato, a adaptação hipóxica é um mecanismo de sobrevivência que envolve fatores de transcrição induzíveis por hipóxia, enquanto a adaptação metabólica à proliferação celular envolve fatores de crescimento e seus efetores.

Sonveaux et al (48) propuseram um modelo em que existe uma simbiose metabólica no ambiente tumoral que viabiliza a entrega de glicose em regiões de hipóxia a partir da troca de lactato intercelular. Este modelo é atraente para o CCRcc, uma vez que a mutação ou perda do cromossomo 3p, que contém o gene VHL, é uma característica dessa neoplasia. Por isso estudamos as moléculas participantes neste processo, tentando compreender os fenômenos envolvidos na progressão dos CCRcc.

Como esperado, HIF-1 α apresentou uma expressão mais intensa em 93% dos casos (padrão 2 e 3), porcentagem muito próxima dos 94% de perda do cromossomo 3p descrito na literatura (31), reforçando que esta mutação é relevante no desenvolvimento no CCRcc, embora não tenhamos estabelecido

correlação prognóstica e nem associação com nenhum fator clássico para esta neoplasia.

Os principais achados deste trabalho estão sumarizados a seguir: 1) o estabelecimento da relação estatisticamente significativa entre a maior expressão imuno-histoquímica das proteínas MCT1 e CD147 e os fatores prognósticos clássicos; 2) os perfis mais intensos de expressão imuno-histoquímica das proteínas MCT1 e CD147 foram significativamente associados com uma piora da sobrevida global e 3) a expressão imuno-histoquímica de MCT1 foi considerada um fator prognóstico independente para redução da sobrevida câncer específica.

Em estudo prévio, Kim et al. (62) mostraram que a alta expressão de MCT1 se relacionou ao maior tamanho tumoral, estágio e pior sobrevida livre de progressão. No mesmo trabalho, os autores identificaram que a expressão de CD147 se associou ao maior grau nuclear de Fuhrman, tamanho e necrose tumoral, todos estes fatores prognósticos desfavoráveis.

Em outro estudo imuno-histoquímico em pacientes com CCRcc, Cao et al. (74) reportaram que a expressão mais intensa de MCT1 foi associada com um menor tempo de sobrevida global e um menor tempo de sobrevida livre de progressão. A análise multivariada, confirmou que esta expressão mais intensa de MCT1 foi preditora independente de um menor tempo de sobrevida livre de progressão.

Guo et al (75) estabeleceram um papel de MCT1 e MCT4 no processo de proliferação, migração e invasão tumoral do CCR. Utilizando técnicas de cultura e co-cultura celular com CCR e células endoteliais mostraram que MCT1 e MCT4 estiveram expressas tanto em células de tumor renal quanto em

células endoteliais. Ao bloquear a atividade de MCTs observaram uma diminuição no lactato extracelular e uma redução na proliferação, migração e invasão celular. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que MCTs presentes no meio de cultura contribuem com a progressão do CCR e que o bloqueio de MCT1 e MCT4 pode diminuir o fluxo de lactato, inibindo a proliferação e a capacidade invasiva da neoplasia. Em nossa casuística, MCT4 esteve superexpressa em 84,2% dos casos e esta expressão se correlacionou apenas com o tamanho tumoral. Não se correlacionando com piora da sobrevida global e sobrevida câncer específica.

Embora a literatura não seja vasta, nossos dados corroboram estes trabalhos citados, reforçando que MCT1 tem papel relevante no metabolismo energético tumoral; e avançam mostrando que a expressão imuno-histoquímica de MCT1 foi considerada um fator prognóstico independente para redução da sobrevida câncer específica. No entanto, os mecanismos pelos quais a expressão de MCT1 é regulada positivamente no ccRCC permanecem incertos. Alguns candidatos foram sugeridos como responsáveis pela ativação da região promotora de MCT1: proteína quinase ativada por AMP nas células musculares durante o exercício (76), o fator nuclear das células T ativadas (76) e a perda do gene p53 durante a tumorigênese (77). Entretanto, a hipóxia parece ter relevância para induzir a expressão do gene MCT1 diretamente através da ativação do HIF-1 α (77, 78) e várias linhas de evidência mostraram que o MCT1 é um alvo direto do fator de transcrição MYC em células normais e cancerígenas (79-81). Para se tornar ativo, o MYC precisa se ligar a seu parceiro denominado MAX, formando o heterodímero MYC-MAX. Este se liga a

uma sequência de DNA da região promotora com as bases nitrogenadas CACGTG, promovendo a ativação do gene de interesse (82).

Na figura 17, estão ilustrados inúmeros alvos do fator de transcrição MYC e que são responsáveis pela reprogramação energética tumoral. O MYC parece otimizar o funcionamento da glicólise através da ativação de genes glicolíticos, como HK2, GAPDH, ENO1 e PK, entre outros e transportadores de glicose SLC2A1, SLC2A2 e SLC2A4 (83, 84). Além disso, promove a produção e exportação de lactato, aumentando a expressão gênica da desidrogenase láctica e do transportador de lactato MCT1 (85-87). Entretanto, não existe evidência direta da ligação do MYC ao gene MCT1 no CCRcc.

Mais recentemente foi identificada uma co-ocorrência de expressões de MCT1 e MYC no CCRcc com um OR de 3,5 vezes (62). Este resultado sugere que o MYC poderia ter relação com o aumento de expressão de MCT1 através da ativação da sua região promotora no CCRcc. No entanto, esta hipótese precisa ser confirmada em ensaios com promotores usando linhagens de células ccRCC.

Figura 29. Alvos do fator de transcrição MYC no metabolismo energético segundo Tarrado-Castellarnau et al. (88).

A estabilidade dos MCTs, sua localização subcelular na membrana plasmática e suas funções requerem interação física com suas chaperonas, que são glicoproteínas da família das imunoglobulinas multifuncionais. E a principal chaperona de MCT1 é CD147 (Figura 18).

A relação de MCT1 com CD147 é feita a partir da interação dos domínios C terminal intracelular de ambas proteínas (89, 90). Um estudo elegante, usando transferência de energia de ressonância de fluorescência, revelou que o MCT1 funcionalmente ativo forma dímeros que interagem com duas proteínas CD147 na membrana celular (91). Essas unidades funcionais

podem recrutar proteínas adicionais para formar supercomplexos que facilitam o transporte transmembrana de lactato.

Figura 30. Interação de CD147 e MCT1 na membrana plasmática segundo Payen et al (92).

O bom funcionamento de MCTs e suas chaperonas é interdependente, uma vez que o silenciamento de um reduz a expressão do outro (49, 93, 94). A perda da chaperona leva à expressão inadequada de MCTs nas vesículas intracelulares, indicando que CD147 direciona os transportadores de monocarboxilatos para a membrana plasmática (95, 96). Nas monocamadas de células epiteliais, o CD147 demonstrou garantir a polarização do MCT1. É interessante destacar, que a expressão do gene CD147 é induzida por hipóxia (97), o que poderia explicar a expressão de MCT1 induzível por hipóxia.

Nesta série, a expressão imuno-histoquímica de CD147 se associou com sexo masculino ($p=0,031$), presença de sintomas no momento do diagnóstico ($p=0,0396$), grau nuclear de Fuhrman ($p=0,0006$), invasão de gordura perirrenal ($p=0,0223$), invasão de veia renal ($p<0,0001$), presença de necrose ($p=0,0012$), estadiamento patológico pT ($p=0,0001$), tamanho tumoral

($p=0,0012$) e com uma piora de sobrevida global ($p=0,0448$), demonstrando a relevância desta proteína no processo de oncogênese.

Nossos dados reforçam que MCT1 e CD147 são ativados de forma potente nas células cancerígenas, regulando a captação e liberação de lactato, permitindo uma melhor adaptação das células tumorais à acidificação oriunda do processo de obtenção de energia produzida a partir de uma alta taxa de glicólise, seguida de fermentação láctica e acidificação no citosol das células cancerígenas (efeito Warburg) (37). O complexo MCT1/CD147 parece ser ator-chave na manutenção dos fenótipos hiperglicolíticos e resistentes a ácidos do câncer. Funcionalmente, silenciar MCTs com pequenos RNAs de interferência induz a morte celular no glioma maligno (98), apoiando seus papéis como alvos anticâncer. De maneira consistente, estudos prévios revelaram um aumento anormal da regulação do MCT1 nos cânceres e em muitos casos, correlações com pior prognóstico de tumores sólidos como o carcinoma do colo uterino (99), neuroblastoma (80), carcinoma colorretal (100), câncer de mama (101), câncer de próstata (60), carcinoma epidermóide oral (102), carcinoma hepatocelular (103), câncer gastrointestinal (58, 104) e carcinoma de células renais sub tipo papilífero (105).

Os pontos fortes do nosso estudo são a casuística selecionada, em pacientes com doença localizada, tratados em centros de referência, operados por equipes médicas especializadas, sempre com margem cirúrgica negativa e seguimento pós-operatório longo e uniforme.

Em relação às limitações, podemos citar o uso do TMA. Por um lado, esta técnica é vantajosa por permitir a avaliação de grandes casuísticas em curto espaço de tempo de modo padronizado, permitir estudos com múltiplos

marcadores e por constituir uma economia significativa de tecidos, insumos e tempo de pessoal técnico (73, 106-109). Por outro, existe a preocupação das amostras selecionadas no TMA não serem integralmente representativas do tumor, uma vez que o CCRcc é heterogêneo (110). Embora a preocupação seja legítima, estudos anteriores mostram que 2 amostras no TMA apresentam uma correlação de 95% com os achados em métodos convencionais (111).

Por fim, a leitura imuno-histoquímica semi-quantitativa é uma etapa mais subjetiva e sujeita a viés. Por isto, a utilização de patologista experiente realizando a leitura, de forma quase simultânea, diminui possíveis variações de interpretação. Mais recentemente, existem trabalhos que defendem o emprego de programas de análise de imagem para eliminar estas variações e garantir reprodutibilidade (112, 113). Entretanto, não existe nenhum trabalho que demonstre superioridade destes programas na leitura imuno-histoquímica de painéis de TMA.

Em resumo, nossos achados indicam que a superexpressão de MCT1 e CD147 se relacionam com fatores prognósticos desfavoráveis e tem impacto na sobrevida de pacientes com CCRcc localizado. Podemos inferir que os mecanismos responsáveis pela expressão de MCT1 ainda precisam ser melhor detalhados. E vislumbrar que o direcionamento terapêutico para moléculas que promovam o bloqueio de MCT1 e CD147 pode ser um campo promissor para o tratamento desta neoplasia.

6. CONCLUSÕES

Com relação ao objetivo primário, descrevemos que entre as proteínas avaliadas (MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1, CA-IX e HIF-1 α), 6 delas apresentaram um predomínio de expressão na membrana plasmática. Apenas MCT2 e HIF-1 α tiveram expressão predominantemente na região citoplasmática. Com relação à intensidade desta expressão, apenas CD147 e MCT1 tiveram maior porcentagem de baixa expressão nos indivíduos avaliados, respectivamente 71,7% e 74,6%. O restante das proteínas teve um predomínio de alta expressão.

Com relação aos objetivos secundários, demonstramos que a alta expressão de MCT1 e CD147 se correlacionaram com piora da sobrevida global em pacientes com CCRcc não metastático. Além disto, MCT1 também se correlacionou com piora da sobrevida câncer específica deste mesmo grupo de pacientes.

Quando correlacionamos a expressão desses marcadores moleculares (MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1, CA-IX e HIF-1 α) com os fatores prognósticos clássicos, identificamos que a expressão de HIF-1 α e MCT2 não se correlacionou com nenhum deles; a expressão de CA-IX e MCT4 se correlacionou com um único fator prognóstico, respectivamente com idade e tamanho tumoral; a expressão de GLUT1 se correlacionou com tamanho tumoral, presença de necrose e invasão da veia renal e a expressão de CD44 se correlacionou com presença de sintomas no momento do diagnóstico, grau nuclear de Fuhrman, invasão da veia renal, presença de necrose e tamanho tumoral.

Por fim, a expressão de CD147 se correlacionou com sexo, presença de sintomas, grau nuclear de Fuhrman, invasão de gordura perirrenal, invasão da

veia renal, presença de necrose, estágio pT e tamanho tumoral. E a expressão de MCT1 se correlacionou com presença de sintomas, grau nuclear de Fuhrman, invasão da gordura perirrenal, invasão da veia renal, presença de necrose, invasão da cápsula renal, estágio pT e tamanho tumoral.

7. ANEXOS

Anexo A: Diagrama de Montagem do TMA-1

T0206 e T0207

Casuística Dr Marcelo / kátia / Pontes/ Iberê
RIM

Agulha 1.0 mm esp 0.3mm

[illegible]

Anexo A: Diagrama de Montagem do TMA-2

[illegible]

Anexo A: Diagrama de Montagem do TMA-3

							T0445								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A	Controle	Controle	Controle	Controle	11-4033-55	11-4033-55	11-4033-55	11-4233-57	11-4233-57	11-4233-57	11-4392-53	11-4392-53	11-4392-53	11-4449-61	11-4449-61
B	11-4449-61	11-4646-58	11-4646-58	11-4646-58	11-4728-57	11-4728-57	11-4728-57	11-4771-66	11-4771-66	11-4771-66	11-4847-62	11-4847-62	11-4847-62	11-4847-58	11-4847-58
C	11-4847-58	11-4959-54	11-4959-54	11-4959-54	11-5021-55	11-5021-55	11-5021-55	11-5091-56	11-5091-56	11-5091-56	11-5105-52	11-5105-52	11-5105-52	11-5873-55	11-5873-55
D	11-5873-55	11-6064-58	11-6064-58	11-6064-58	11-6117-52	11-6117-52	11-6117-52	11-6649-62	11-6649-62	11-6649-62	11-7064-71	11-7064-71	11-7064-71	11-7502-57	11-7502-57
E	11-7502-57	11-7520-72	11-7520-72	11-7520-72	11-7540-69	11-7540-69	11-7540-69	11-7707-65	11-7707-65	11-7707-65	11-7879-59	11-7879-59	11-7879-59	11-7941-52	11-7941-52
F	11-7941-52	11-7963-61	11-7963-61	11-7963-61	11-8120-59	11-8120-59	11-8120-59	11-8362-57	11-8362-57	11-8362-57	11-8486-55	11-8486-55	11-8486-55	11-8513-54	11-8513-54
G	11-8513-54	11-8544-66	11-8544-66	11-8544-66	11-8626-56	11-8626-56	11-8626-56	11-8630-73	11-8630-73	11-8630-73	11-8681-69	11-8681-69	11-8681-69	11-8903-61	11-8903-61
H	11-8903-61	11-0072-13	11-0072-13	11-0072-13	11-0190-06	11-0190-06	11-0190-06	11-0210-07	11-0210-07	11-0210-07	11-0214-08	11-0214-08	11-0214-08	11-0454-14	11-0454-14
I	11-0454-14	11-0488-08	11-0488-08	11-0488-08	11-0941-03	11-0941-03	11-0941-03	11-1096-15	11-1096-15	11-1096-15	11-1100-03	11-1100-03	11-1100-03	11-1167-06	11-1167-06
J	11-1167-06	11-2309-04	11-2309-04	11-2309-04	11-2408-12	11-2408-12	11-2408-12	11-2564-15	11-2564-15	11-2564-15	11-2626-07	11-2626-07	11-2626-07	11-2985-04	11-2985-04
L	11-2985-04	11-3085-14	11-3085-14	11-3085-14	11-3160-10	11-3160-10	11-3160-10	11-3304-06	11-3304-06	11-3304-06	11-3516-24	11-3516-24	11-3516-24	11-3614-04	11-3614-04
M	11-3614-04	11-3639-14	11-3639-14	11-3639-14	11-3756-10	11-3756-10	11-3756-10	11-3837-09	11-3837-09	11-3837-09	11-3928-04	11-3928-04	11-3928-04	11-4253-16	11-4253-16
N	11-4253-16	133892-19	133892-19	133892-19	1509934-09	1509934-09	1509934-09								

Anexo B

São Paulo, 23 de Janeiro de 2017

Registro: NP 1068/17

Ref. Solicitação de execução de estudo: "Análise de expressão de transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT2 e MCT4, suas chaperonas CD147 e CD44 e de HIF1- α , CAIX e GLUT 1 no carcinoma de células renais do tipo células claras"

Pesquisador Responsável: Dra. Katia Ramos Moreira Leite

Pesquisador Executante: Dr. Paulo Afonso de Carvalho

CONSIDERAÇÕES

Estudo coorte retrospectiva de 131 pacientes operados para tratamento de carcinoma de células renais do tipo células claras (CCRcc) pelo Prof. Dr. Miguel Srougi no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo que visa analisar a expressão imuno-histoquímica de transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT2, MCT4, suas chaperonas CD147 e CD44 e Glut1, CAIX e HIF1- α , em microarranjo tecidual (TMA) de carcinoma de células renais do tipo células claras (CCRcc), relacionando os níveis de expressão com os fatores prognósticos clássicos e evolução da doença.

O estudo será realizado no Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM55) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em colaboração com o Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital do Câncer de Barretos, Fundação Pio XII.

RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR

Antes do início das atividades relacionadas ao estudo:

- Apresentar a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP para execução no ICESP conforme a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde;
- Enviar relatório final do estudo. Projetos sem informações por mais de 1 ano serão cancelados automaticamente e impedirá a submissão de novos projetos pelos investigadores;
- Enviar resultados do projeto (publicações, defesa de tese, apresentação em congressos e outros);

Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo M. Hoff
Diretor Geral

Prof. Dr. Paulo M. Hoff
Diretor Geral
ICESP

Versão 1.2 11 de julho de 2016

Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP 01246-000 Tel.: 11 3893.2000 - www.icesp.org.br

Anexo C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILADOS MCT1, MCT2 E MCT4, SUAS CHAPERONAS CD147 E CD44 E DE HIF1- α , CAIX E GLUT 1 NO CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS DO TIPO CÉLULAS CLARAS

Pesquisador: Katia Ramos Moreira Leite

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58383116.3.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.751.706

Apresentação do Projeto:

Projeto de Doutorado que será desenvolvido com material previamente estocado em lâminas de Tissue Microarray; é uma coorte retrospectiva de 148 pacientes operados para o tratamento do carcinoma de células renais do tipo células claras. O trabalho será realizado no Laboratório de Investigação Médica 55 (LIM55) da Faculdade de Medicina da USP, em colaboração com o Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, Fundação Pio XII, por meio do grupo de pesquisa em Microambiente e Metabolismo Tumoral liderado pela Profa. Dra. Celine Marques Pinheiro. Será avaliada a expressão imuno-histoquímica de transportadores de monocarbóxilados MCT1, MCT2, MCT4 e, suas chaperonas CD147 e CD44 e Glut1, CAIX e HIF1 por análise de imagem e os níveis de expressão (extensão e intensidade) serão relacionados aos fatores prognósticos clássicos do CCRcc: grau nuclear de Fuhrman, grau nucleolar WHO/ISUP, embolização neoplásica intravascular, estadiamento patológico, presença de necrose e áreas de padrão sarcomatóide. Também será analisada a expressão das proteínas com a progressão da doença e sobrevida global e câncer específica. Os pesquisadores solicitam a dispensa do TCLE uma vez que as amostras que serão utilizadas já foram armazenadas para um estudo anterior em um Tissue Microarray (TMA), com aprovação do comitê de ética sob protocolo 0177/10. Neste novo protocolo de pesquisa apenas irão avaliar a expressão de mais oito proteínas nestas mesmas

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.751.706

amostras e utilizando os mesmos dados clínicos que já foram coletados.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo é a avaliação da expressão imuno-histoquímica dos transportadores de monocarboxilados MCT1, MCT2 e MCT4, suas chaperonas CD147 e CD44, GLUT1, CAIX e HIF-1, no carcinoma de células renais do tipo células claras relacionando os níveis de expressão com os fatores prognósticos clássicos e evolução da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos ou benefícios diretos aos pacientes, uma vez que o estudo pretende usar material previamente estocado. Há o benefício da pesquisa que será um melhor conhecimento das vias moleculares envolvidas no desenvolvimento e progressão dessa neoplasia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de relevante interesse para a área e foi apresentada de maneira clara e objetiva, com cronograma dentro das expectativas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores enviaram a carta de colaboração do grupo do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, conforme solicitado e acrescentaram descrição nos itens riscos e benefícios.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo C

Continuação do Parecer: 1.751.706

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_764337.pdf	19/09/2016 10:50:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado.docx	19/09/2016 10:50:27	Katia Ramos Moreira Leite	Aceito
Outros	anuencia_CP.pdf	05/09/2016 10:00:58	Katia Ramos Moreira Leite	Aceito
Outros	Cadastro_ass.pdf	05/08/2016 09:01:35	Katia Ramos Moreira Leite	Aceito
Folha de Rosto	FR_ass.pdf	05/08/2016 09:01:17	Katia Ramos Moreira Leite	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	carta_anuencia_TCLE.pdf	25/07/2016 13:46:23	Katia Ramos Moreira Leite	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Setembro de 2016

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

8. REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016;66(1):7-30.
2. Lindblad P. Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scand J Surg*. 2004;93(2):88-96.
3. Kato M, Suzuki T, Suzuki Y, Terasawa Y, Sasano H, Arai Y. Natural history of small renal cell carcinoma: evaluation of growth rate, histological grade, cell proliferation and apoptosis. *J Urol*. 2004;172(3):863-6.
4. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin R, de Kernion JB, Belldegrun A. Renal cell carcinoma: prognostic significance of incidentally detected tumors. *J Urol*. 2000;163(2):426-30.
5. Heidenreich A, Ravery V, Urology ESoO. Preoperative imaging in renal cell cancer. *World J Urol*. 2004;22(5):307-15.
6. Cohen HT, McGovern FJ. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2477-90.
7. JB. D. Real numbers. In: *Campbell's Urology*. Philadelphia 1986.
8. Skinner DG, Colvin RB, Vermillion CD, Pfister RC, Leadbetter WF. Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer*. 1971;28(5):1165-77.
9. Gudbjartsson T, Thoroddsen A, Petursdottir V, Hardarson S, Magnusson J, Einarsson GV. Effect of incidental detection for survival of patients with renal cell carcinoma: results of population-based study of 701 patients. *Urology*. 2005;66(6):1186-91.
10. Linehan, WM BS, Yang JC. *Cancers of the genitourinary system: cancers of the kidney*. 7 ed. Philadelphia 2005.
11. Lane BR, Kattan MW. Prognostic models and algorithms in renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am*. 2008;35(4):613-25; vii.
12. Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am*. 2003;30(3):467-80.
13. Leibovich BC, Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Frank I, Kwon ED, et al. A scoring algorithm to predict survival for patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *J Urol*. 2005;174(5):1759-63; discussion 63.
14. Amin MB ES, Greene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8 ed. New York 2017.
15. Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, deKernion JB, Belldegrun A. Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol*. 2000;163(4):1090-5; quiz 295.
16. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F, Said JW, Shvarts O, Quintana D, et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol*. 2001;19(6):1649-57.
17. Medeiros LJ, Gelb AB, Weiss LM. Renal cell carcinoma. Prognostic significance of morphologic parameters in 121 cases. *Cancer*. 1988;61(8):1639-51.
18. Novara G, Martignoni G, Artibani W, Ficarra V. Grading systems in renal cell carcinoma. *J Urol*. 2007;177(2):430-6.
19. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1982;6(7):655-63.
20. Rioux-Leclercq N, Karakiewicz PI, Trinh QD, Ficarra V, Cindolo L, de la Taille A, et al. Prognostic ability of simplified nuclear grading of renal cell carcinoma. *Cancer*. 2007;109(5):868-74.
21. Gudbjartsson T, Hardarson S, Petursdottir V, Thoroddsen A, Magnusson J, Einarsson GV. Histological subtyping and nuclear grading of renal cell carcinoma and their implications for survival: a retrospective nation-wide study of 629 patients. *Eur Urol*. 2005;48(4):593-600.
22. Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Samaratunga H. Grading of renal cell carcinoma. *Histopathology*. 2019;74(1):4-17.

23. Sengupta S, Lohse CM, Leibovich BC, Frank I, Thompson RH, Webster WS, et al. Histologic coagulative tumor necrosis as a prognostic indicator of renal cell carcinoma aggressiveness. *Cancer*. 2005;104(3):511-20.
24. Ficarra V, Novara G, Galfano A, Brunelli M, Cavalleri S, Martignoni G, et al. The 'Stage, Size, Grade and Necrosis' score is more accurate than the University of California Los Angeles Integrated Staging System for predicting cancer-specific survival in patients with clear cell renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2009;103(2):165-70.
25. Van Poppel H, Vandendriessche H, Boel K, Mertens V, Goethuys H, Haustermans K, et al. Microscopic vascular invasion is the most relevant prognosticator after radical nephrectomy for clinically nonmetastatic renal cell carcinoma. *J Urol*. 1997;158(1):45-9.
26. 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.
27. Kroeger N, Rampersaud EN, Patard JJ, Klatte T, Birkhäuser FD, Shariat SF, et al. Prognostic value of microvascular invasion in predicting the cancer specific survival and risk of metastatic disease in renal cell carcinoma: a multicenter investigation. *J Urol*. 2012;187(2):418-23.
28. Dall'Oglio M, Srougi M, Ortiz V, Nesrallah L, Gonçalves PD, Leite KM, et al. [Incidental and symptomatic kidney cancer: pathological features and survival]. *Rev Assoc Med Bras (1992)*. 2004;50(1):27-31.
29. Presti JC, Rao PH, Chen Q, Reuter VE, Li FP, Fair WR, et al. Histopathological, cytogenetic, and molecular characterization of renal cortical tumors. *Cancer Res*. 1991;51(5):1544-52.
30. Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(24):4991-5004.
31. Beroukhi R, Brunet JP, Di Napoli A, Mertz KD, Seeley A, Pires MM, et al. Patterns of gene expression and copy-number alterations in von-hippel lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res*. 2009;69(11):4674-81.
32. Shen C, Kaelin WG. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(1):18-25.
33. Richardson SM, Knowles R, Tyler J, Mobasheri A, Hoyland JA. Expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-3, GLUT-9 and HIF-1 α in normal and degenerate human intervertebral disc. *Histochem Cell Biol*. 2008;129(4):503-11.
34. Sadri N, Zhang PJ. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression; prognostic and therapeutic targets in soft tissue sarcomas. *Cancers*. 2013;5(2):320-33.
35. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
36. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016;23(1):27-47.
37. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
38. Shuch B, Linehan WM, Srinivasan R. Aerobic glycolysis: a novel target in kidney cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2013;13(6):711-9.
39. Chen JL, Lucas JE, Schroeder T, Mori S, Wu J, Nevins J, et al. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS Genet*. 2008;4(12):e1000293.
40. Marchiq I, Pouyssegur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(2):155-71.
41. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812-9.
42. Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Tumor metabolism as modulator of immune response and tumor progression. *Seminars in cancer biology*. 2012;22(4):335-41.
43. Dhup S, Dadhich RK, Porporato PE, Sonveaux P. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(10):1319-30.

44. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Front Pharmacol*. 2011;2:49.
45. Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(14):9030-7.
46. Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *The Biochemical journal*. 2000;350 Pt 1:219-27.
47. Chiche J, Le Fur Y, Vilmen C, Frassinetti F, Daniel L, Halestrap AP, et al. In vivo pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH. *Int J Cancer*. 2012;130(7):1511-20.
48. Sonveaux P, Vegran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3930-42.
49. Izumi H, Takahashi M, Uramoto H, Nakayama Y, Oyama T, Wang KY, et al. Monocarboxylate transporters 1 and 4 are involved in the invasion activity of human lung cancer cells. *Cancer Sci*. 2011;102(5):1007-13.
50. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr*. 2012;44(1):127-39.
51. Baltazar F, Pinheiro C, Morais-Santos F, Azevedo-Silva J, Queiros O, Preto A, et al. Monocarboxylate transporters as targets and mediators in cancer therapy response. *Histology and histopathology*. 2014;29(12):1511-24.
52. Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, et al. Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer research*. 2009;69(1):358-68.
53. Hussain SA, Ganesan R, Reynolds G, Gross L, Stevens A, Pastorek J, et al. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. *British journal of cancer*. 2007;96(1):104-9.
54. Marchiq I, Pouysségur J. Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(2):155-71.
55. Weidle UH, Scheuer W, Eggle D, Klostermann S, Stockinger H. Cancer-related issues of CD147. *Cancer Genomics Proteomics*. 2010;7(3):157-69.
56. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, Naiken T, Ilc K, Murray CM, et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(40):16663-8.
57. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(3):283-95.
58. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Simões K, Jacob CE, Bresciani CJ, Zilberstein B, et al. The prognostic value of CD147/EMMPRIN is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45(13):2418-24.
59. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Simoes K, Jacob CE, Bresciani CJ, Zilberstein B, et al. The prognostic value of CD147/EMMPRIN is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer. *European journal of cancer*. 2009;45(13):2418-24.
60. Pertega-Gomes N, Vizcaino JR, Miranda-Goncalves V, Pinheiro C, Silva J, Pereira H, et al. Monocarboxylate transporter 4 (MCT4) and CD147 overexpression is associated with poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer*. 2011;11:312.
61. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, Jube LF, et al. Monocarboxylate transporters 1 and 4 are associated with CD147 in cervical carcinoma. *Disease markers*. 2009;26(3):97-103.
62. Kim Y, Choi JW, Lee JH, Kim YS. Expression of lactate/H(+) symporters MCT1 and MCT4 and their chaperone CD147 predicts tumor progression in clear cell renal cell

carcinoma: immunohistochemical and The Cancer Genome Atlas data analyses. *Human pathology*. 2015;46(1):104-12.

63. Slomiany MG, Grass GD, Robertson AD, Yang XY, Maria BL, Beeson C, et al. Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells. *Cancer research*. 2009;69(4):1293-301.

64. Marieb EA, Zoltan-Jones A, Li R, Misra S, Ghatak S, Cao J, et al. Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production. *Cancer research*. 2004;64(4):1229-32.

65. Rudrabhatla SR, Mahaffey CL, Mummert ME. Tumor microenvironment modulates hyaluronan expression: the lactate effect. *J Invest Dermatol*. 2006;126(6):1378-87.

66. Greenberger LM, Horak ID, Filpula D, Sapra P, Westergaard M, Frydenlund HF, et al. A RNA antagonist of hypoxia-inducible factor-1alpha, EZN-2968, inhibits tumor cell growth. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(11):3598-608.

67. Vegran F, Boidot R, Michiels C, Sonveaux P, Feron O. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer research*. 2011;71(7):2550-60.

68. Beloueche-Babari M, Wantuch S, Casals Galobart T, Koniordou M, Parkes HG, Arunan V, et al. MCT1 Inhibitor AZD3965 Increases Mitochondrial Metabolism, Facilitating Combination Therapy and Noninvasive Magnetic Resonance Spectroscopy. *Cancer Res*. 2017;77(21):5913-24.

69. Nelson JA, Falk RE. The efficacy of phloridzin and phloretin on tumor cell growth. *Anticancer Res*. 1993;13(6A):2287-92.

70. Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T, Shinohara K. Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells by inhibition of glucose transmembrane transport. *Cancer Lett*. 1997;119(2):207-12.

71. Matsumoto S, Hyodo F, Subramanian S, Devasahayam N, Munasinghe J, Hyodo E, et al. Low-field paramagnetic resonance imaging of tumor oxygenation and glycolytic activity in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1965-73.

72. García-Maceira P, Mateo J. Silibinin inhibits hypoxia-inducible factor-1alpha and mTOR/p70S6K/4E-BP1 signalling pathway in human cervical and hepatoma cancer cells: implications for anticancer therapy. *Oncogene*. 2009;28(3):313-24.

73. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844-7.

74. Cao YW, Liu Y, Dong Z, Guo L, Kang EH, Wang YH, et al. Monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 are independent prognostic biomarkers for the survival of patients with clear cell renal cell carcinoma and those receiving therapy targeting angiogenesis. *Urol Oncol*. 2018;36(6):311.e15-.e25.

75. Guo C, Huang T, Wang QH, Li H, Khanal A, Kang EH, et al. Monocarboxylate transporter 1 and monocarboxylate transporter 4 in cancer-endothelial co-culturing microenvironments promote proliferation, migration, and invasion of renal cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2019;19:170.

76. Halestrap AP, Wilson MC. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life*. 2012;64(2):109-19.

77. Boidot R, Végran F, Meulle A, Le Breton A, Dessy C, Sonveaux P, et al. Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res*. 2012;72(4):939-48.

78. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, Naiken T, Naiken T, Ilc K, et al. CD147 subunit of lactate/H⁺ symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(40):16663-8.

79. Collier HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, et al. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes

involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3260-5.

80. Fang J, Quinones QJ, Holman TL, Morowitz MJ, Wang Q, Zhao H, et al. The H⁺-linked monocarboxylate transporter (MCT1/SLC16A1): a potential therapeutic target for high-risk neuroblastoma. *Mol Pharmacol*. 2006;70(6):2108-15.

81. Schuhmacher M, Kohlhuber F, Hölzel M, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M, et al. The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(2):397-406.

82. Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(4):318-30.

83. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(4):253-64.

84. Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, et al. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem*. 2000;275(29):21797-800.

85. Adhikary S, Eilers M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(8):635-45.

86. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. 2007;12(2):108-13.

87. Rimpi S, Nilsson JA. Metabolic enzymes regulated by the Myc oncogene are possible targets for chemotherapy or chemoprevention. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 2):305-10.

88. Tarrado-Castellarnau M, de Atauri P, Cascante M. Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming. *Oncotarget*. 2016;7(38):62726-53.

89. Ovens MJ, Manoharan C, Wilson MC, Murray CM, Halestrap AP. The inhibition of monocarboxylate transporter 2 (MCT2) by AR-C155858 is modulated by the associated ancillary protein. *Biochem J*. 2010;431(2):217-25.

90. Finch NA, Linser PJ, Ochrietor JD. Hydrophobic interactions stabilize the basigin-MCT1 complex. *Protein J*. 2009;28(7-8):362-8.

91. Wilson MC, Meredith D, Halestrap AP. Fluorescence resonance energy transfer studies on the interaction between the lactate transporter MCT1 and CD147 provide information on the topology and stoichiometry of the complex in situ. *J Biol Chem*. 2002;277(5):3666-72.

92. Payen VL, Mina E, Van Hée VF, Porporato PE, Sonveaux P. Monocarboxylate transporters in cancer. *Mol Metab*. 2020;33:48-66.

93. Marchiq I, Le Floch R, Roux D, Simon MP, Pouyssegur J. Genetic disruption of lactate/H⁺ symporters (MCTs) and their subunit CD147/BASIGIN sensitizes glycolytic tumor cells to phenformin. *Cancer Res*. 2015;75(1):171-80.

94. Morais-Santos F, Miranda-Gonçalves V, Pinheiro S, Vieira AF, Paredes J, Schmitt FC, et al. Differential sensitivities to lactate transport inhibitors of breast cancer cell lines. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(1):27-38.

95. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH, Barclay AN, Halestrap AP. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J*. 2000;19(15):3896-904.

96. Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Res*. 2007;67(9):4182-9.

97. Ke X, Fei F, Chen Y, Xu L, Zhang Z, Huang Q, et al. Hypoxia upregulates CD147 through a combined effect of HIF-1 α and Sp1 to promote glycolysis and tumor progression in epithelial solid tumors. *Carcinogenesis*. 2012;33(8):1598-607.

98. Mathupala SP, Parajuli P, Sloan AE. Silencing of monocarboxylate transporters via small interfering ribonucleic acid inhibits glycolysis and induces cell death in malignant glioma: an in vitro study. *Neurosurgery*. 2004;55(6):1410-9; discussion 9.

99. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Ferreira L, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, et al. Increasing expression of monocarboxylate transporters 1 and 4 along progression to invasive cervical carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2008;27(4):568-74.
100. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Scapulatempo C, Ferreira L, Martins S, Pellerin L, et al. Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas. *Virchows Arch*. 2008;452(2):139-46.
101. Pinheiro C, Albergaria A, Paredes J, Sousa B, Dufloth R, Vieira D, et al. Monocarboxylate transporter 1 is up-regulated in basal-like breast carcinoma. *Histopathology*. 2010;56(7):860-7.
102. Zhu J, Wu YN, Zhang W, Zhang XM, Ding X, Li HQ, et al. Monocarboxylate transporter 4 facilitates cell proliferation and migration and is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS One*. 2014;9(1):e87904.
103. Gao HJ, Zhao MC, Zhang YJ, Zhou DS, Xu L, Li GB, et al. Monocarboxylate transporter 4 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and is associated with cell proliferation and migration. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015;141(7):1151-62.
104. de Oliveira AT, Pinheiro C, Longatto-Filho A, Brito MJ, Martinho O, Matos D, et al. Co-expression of monocarboxylate transporter 1 (MCT1) and its chaperone (CD147) is associated with low survival in patients with gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *J Bioenerg Biomembr*. 2012;44(1):171-8.
105. Almeida LMCA, Silva R, Cavadas B, Lima J, Pereira L, Soares P, et al. GLUT1, MCT1/4 and CD147 overexpression supports the metabolic reprogramming in papillary renal cell carcinoma. *Histol Histopathol*. 2017;32(10):1029-40.
106. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified...tissue microarray technology. *Mol Pathol*. 2003;56(4):198-204.
107. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli OR, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2249-56.
108. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*. 2001;81(10):1331-8.
109. Karlsson C, Bodin L, Piehl-Aulin K, Karlsson MG. Tissue microarray validation: a methodologic study with special reference to lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(7):2014-21.
110. Ambrosetti D, Dufies M, Dadone B, Durand M, Borchellini D, Amiel J, et al. The two glycolytic markers GLUT1 and MCT1 correlate with tumor grade and survival in clear-cell renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2018;13(2):e0193477.
111. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000;80(12):1943-9.
112. Masmoudi H, Hewitt SM, Petrick N, Myers KJ, Gavrielides MA. Automated quantitative assessment of HER-2/neu immunohistochemical expression in breast cancer. *IEEE Trans Med Imaging*. 2009;28(6):916-25.
113. Kohlberger PD, Obermair A, Sliutz G, Heinzl H, Koelbl H, Breiteneker G, et al. Quantitative immunohistochemistry of factor VIII-related antigen in breast carcinoma: a comparison of computer-assisted image analysis with established counting methods. *Am J Clin Pathol*. 1996;105(6):705-10.

Apêndice 1

Figura 31. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela expressão de CA-IX.

Figura 32. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela expressão de GLUT1.

Figura 33. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela expressão de MCT2.

Figura 34. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela expressão de MCT4.

Figura 35. Sobrevida global e câncer específica estratificada pela expressão de HIF-1α.