RITA DE CÁSSIA OLIVEIRA

Perfil de expressão de microRNAs envolvidos na regulação de genes associados à angiogênese no carcinoma renal das células claras

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Urologia

Orientadora: Dra. Sabrina Thalita dos Reis

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Rita de Cássia
Perfil de expressão de microRNAs envolvidos na regulação de genes associados à angiogênese no carcinoma renal das células claras / Rita de Cássia Oliveira. -- São Paulo, 2016.
Dissertação (mestrado) --Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Urologia.
Orientador: Sabrina Thalita dos Reis Faria.

Descritores: 1.Carcinoma de células renais 2.Prognóstico 3.Estadiamento de neoplasias 4.Neovascularização patológica 5.Neoplasias 6.Biomarcadores tumorais 7.MicroRNAs

USP/FM/DBD-163/16

A Deus, aos meus pais Sandra e Nei e a minha irmã Alessandra por terem me apoiado todo este período.

Agradecimentos

A minha orientadora Dra. Sabrina Reis, pela paciência e dedicação e pelo conhecimento acadêmico e pessoal que pude adquirir através de você nesses anos de convivência.

A professora Dra. Kátia Ramos Moreira leite pelo excelente trabalho liderando o LIM55, foi uma grande honra fazer parte de sua equipe.

Ao Prof. Dr. Miguel Srougi que torna possível todo trabalho realizado no LIM55. Embora não tenha convivido diretamente com o senhor sei que é uma honra dizer que fiz parte da equipe do LIM55 que o senhor tanto valoriza.

A toda equipe do LIM55 que sempre fez o possível e o impossível para me ajudar e ensinar tudo que eu aprendi nestes anos de convivência, vocês serão para sempre parte da minha história Nayara Viana, Vanessa Guimarães, Isis Paloppi, Iran Silva, Caio Moura, Denis Reis e Ruan Pimenta. Espero que continuem sendo essas pessoas maravilhosas tornando o local de trabalho tão agradável sempre.

Aos doutores José Pontes Junior, Alexandre Iscaife, Nelson Dip e Renato Fidélis que sempre foram solícitos ao esclarecer dúvidas e darem sugestões neste trabalho.

Aos meus amigos de São Paulo e de Passos que foram importantíssimos em toda essa jornada sendo prestativos nos momentos mais difíceis. Dalila Silva, Tayla Guidri, Thaysa Moura, Daniele Capiotti, Tereza Santos, Faride Lamadrid, Laís Ferreira e Matthias Mann vocês foram essenciais na minha vida.

Aos meus pais que sempre acreditaram na minha capacidade de vencer e conquistar meus objetivos. Nós conseguimos!

Ao CNPQ e CAPES que financiaram esta pesquisa.

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

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

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

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

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO..... 1

1.1 Carcinoma de Células Renais (CCR)..... 2

1.2 Aspectos fisiopatológicos..... 2

1.3 Fatores de risco..... 3

1.4 Manifestações clínicas e diagnóstico..... 4

1.5 Fatores prognósticos..... 5

1.5.1 Estadiamento TNM..... 5

1.5.2 Invasão microvascular..... 7

1.5.3 Grau de Fuhrman..... 7

1.6 Tratamento..... 8

1.7 Angiogênese..... 9

1.7.1 A via angiogênica..... 11

1.8 MicroRNA..... 15

1.8.1 Biogênese dos microRNAs..... 15

1.9 MicroRNAs e genes envolvidos na angiogênese do CRCC..... 17

2. OBJETIVOS..... 20

3. MÉTODOS..... 22

3.1 Tipo de estudo..... 23

3.2 Pacientes..... 23

3.3 Ética..... 25

3.4 Processamento das amostras..... 25

3.5 Isolamento do miRNA, do RNA e síntese do cDNA..... 25

3.5.1 Isolamento do miRNA e RNA dos espécimes cirúrgicos..... 25

3.5.2 Síntese do DNA complementar..... 26

3.5.3 Análise da expressão de miRNA e RNA..... 27

3.6 Análise estatística..... 29

4. RESULTADOS..... 30
4.1 Perfil de expressão dos genes envolvidos no processo angiogênico..... 31
4.2 Perfil de expressão dos microRNAs envolvidos no processo angiogênico..... 36
4.3 Perfil da expressão dos microRNAs comparado aos seus respectivos genes alvo no CRCC..... 43
5. DISCUSSÃO..... 49
6. CONCLUSÕES..... 62
7. REFERÊNCIAS..... 64
Apêndice
Anexo..... 74

Lista de abreviaturas

CCR – Carcinoma de Células Renais

cDNA - DNA complementar

CRCC – Carcinoma Renal de Células Claras

GLUT - *Glucose Transporter*

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HIF - *Hypoxia-Inducible Factors*

JUP - Estenose da Junção Uretero-Piélica

LIM55 - Laboratório de Investigação Médica 55

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases*

miRNAs – MicroRNAs

mTOR - *Mechanistic Target of Rapamycin*

PDGF - *Platelet-Derived Growth Factor*

PIGF - *Phosphatidylinositol-Glycan Biosynthesis Class F*

qRT-PCR - *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

RISC - *RNA-Induced Silencing Complex*

RNA - Ácido Ribonucleico

TGF - Fator de Transformação do Crescimento

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR - *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

VHL - Von Hippel Lindau

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes com CRCC..... 24

Tabela 2 - Primers utilizados para quantificação da expressão dos microRNAs e seus genes alvo no CRCC..... 28

Tabela 3 - Médias e medianas da expressão dos genes estudados.... 33

Tabela 4 - Correlação da expressão dos genes associados à angiogênese com os grupos divididos de acordo com a tríade patológica..... 34

Tabela 5 - Expressão gênica comparada a tamanho tumoral..... 34

Tabela 6 - Correlação da expressão dos genes associada à ausência ou à presença de invasão microvascular..... 35

Tabela 7 - Nível de expressão gênica em relação ao grau de Fuhrman..... 35

Tabela 8 - Expressão dos genes em relação ao estadiamento do CRCC..... 36

Tabela 9 - Correlação do fator metástase à distância com a expressão dos genes da via angiogênica do CRCC 36

Tabela 10 - Médias e medianas da expressão dos microRNAs incluídos nos nossos estudos..... 38

Tabela 11 - Perfil de expressão dos microRNAs relacionados à divisão dos pacientes em baixo, intermediário e alto risco.. 39

Tabela 12 - Expressão dos miRNAs relacionada ao tamanho tumoral.. 40

Tabela 13 - Expressão dos miRNAs de acordo com a presença ou ausência de invasão microvascular..... 41

Tabela 14 - Expressão dos miRNAs de acordo com grau de Fuhrman.. 41

Tabela 15 - Expressão dos miRNAs em relação ao estadiamento patológico..... 42

Tabela 16 - Correlação do fator metástase à distância com a expressão dos miRNAs reguladores dos genes associados à via angiogênica..... 43

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da via angiogênica..... 14
Figura 2 - Representação esquemática dos principais eventos ocorrentes na biogênese dos microRNAs..... 17
Figura 3 - Perfil de expressão dos principais genes associados à angiogênese em 56 pacientes com CRCC..... 32
Figura 4 - Perfil de expressão dos miRNAs associados aos principais genes da via angiogênica em 56 pacientes com CRCC..... 37
Figura 5 - Comparação da expressão do miRNA 99a e seu gene alvo mTOR..... 44
Figura 6 - Expressão do miRNA 199a e seu gene alvo HIF1-α..... 44
Figura 7 - Expressão do gene VEGFa comparada à expressão do miRNA 126..... 45
Figura 8 - Expressão do miRNA 200b comparada ao seu gene alvo VEGFR2..... 48
Figura 9 - Expressão dos miRNAs 29 e 29b em relação ao seu gene alvo PDGF..... 47
Figura 10 - Expressão dos miRNAs 106a e 106b em relação ao gene VHL..... 48

Resumo

Oliveira RC. *Perfil de expressão de microRNAs envolvidos na regulação de genes associados à angiogênese no carcinoma renal das células claras* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: O Carcinoma de Células Renais (CCR) é reposnsável por mais de 200.000 casos a cada ano no mundo, representando cerca de 2% de todos os cânceres. O CCR do tipo células claras (CRCC) é o subtipo mais comum da doença e é responsável por 75 a 80% dos casos, com maiores taxas de invasão local, desenvolvimento de metástases e mortalidade. As novas terapias alvo são baseadas em moléculas e anticorpos antiangiogênicos alterando o curso da doença, mas os resultados até agora não são satisfatórios. OBJETIVOS: Nosso objetivo nesse estudo foi estudar miRNAs e seus possíveis genes alvo relacionados com a angiogênese em CRCC tentando trazer novos conhecimentos relacionados às vias moleculares associadas à doença. MÉTODOS: Os níveis de expressão dos miRNAs miR-99a, 99b, 100, 199a, 106a, 106b, 29a, 29b, 29c, 126, 200a, 200b e seus respectivos genes alvo: mTOR, HIF1-α, VHL, PDGF, VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 foram avaliados por qRT-PCR utilizando amostras de tecido tumoral de 56 pacientes com diagnóstico de CRCC e 5 amostras de tecido renal benigno como controle. Os resultados foram comparados com o tamanho tumoral, grau nuclear de Fuhrman e invasão microvascular, considerando os critérios de risco propostos por Dall'Oglio et al (2007). RESULTADOS: Encontramos subexpressão da maioria dos genes, exceto VEGFA e PDGF, enquanto que a análise dos miRNAs mostrou subexpressão apenas dos miRs 100 e 126. Comparamos a expressão dos genes com seus possíveis miRNAs reguladores, e encontramos que mTOR apresentou subexpressão, enquanto miR99a apresentou superexpressão na maioria das amostras. Esta relação também ocorreu entre VEGFA e o miR126 e entre os miRNAs 106a, 106b, e seu gene alvo VHL. Considerando os grupos de risco, a superexpressão do miR200b foi associada com pacientes de alto risco ($p = 0,01$) e a superexpressão do miR126 foi associada com menor grau de Fuhrman (I-II) ($p = 0,03$). CONCLUSÕES: Os resultados mostram que em CRCC há um desequilíbrio na expressão de genes e miRNAs relacionadas com a angiogênese. Além disso através dos nossos achados podemos especular o papel do miR200b e do miR126 no prognóstico de CRCC.

Descritores: Carcinoma de Células Renais; Prognóstico; Estadiamento de Neoplasias; Neovascularização Patológica; Neoplasia; Biomarcadores Tumorais; MicroRNAs.

Summary

Oliveira RC. *MicroRna expression profile involved in the regulation of genes associated with angiogenesis in the renal clear cell carcinoma* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2016.

BACKGROUND: There are more than 200,000 cases of renal cell carcinoma (RCC) each year in the world, accounting for approximately 2% of all cancers. RCC clear cell type (ccRCC) is the most common subtype of RCC and accounts for 75 to 80% of the cases with highest rates of local invasion, development of metastasis and mortality. New target therapy is based on antiangiogenic antibodies and molecules, changing the course of the disease, but the results so far are disappointing. OBJECTIVES: Our aim is to study miRNAs and their target genes related to angiogenesis in ccRCC trying to bring some new knowledge to the molecular pathways related to the disease. METHODS: The expression levels of miRNAs miR-99a, 99b, 100; 199a; 106a; 106b; 29a; 29b; 29c; 126; 200a, 200b and their respective target genes: mTOR, HIF1-Î±, VHL, PDGF, VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 were evaluated using qRT-PCR.in snap-frozen tumor tissue samples from 56 patients diagnosed with ccRCC and 5 samples of benign renal tissue as control. The results were related to tumor size, Fuhrman nuclear grade and microvascular invasion, considering the risk criteria proposed by Dall'Oglio et al. (2007). RESULTS: We compared the expression of genes with their possible regulatory miRNAs, and we found that mTOR was underexpressed while miR99a was overexpressed in most samples. This relationship also occurs between VEGFA and miR126 and between miRNAs 106a, 106b, and their target gene VHL. Considering the risk groups the overexpression of miR200b was associated with high-risk patients (p = 0.01) and the overexpression of miR126 was associated with lower Fuhrman grade (I-II) (p = 0.03). CONCLUSIONS: Our results show that in ccRCC there is an unbalance in the expression of genes and miRNAs related to angiogenesis and cell proliferation and survival. Furthermore with our findings we can speculate the role of miR200b and miR126 in the prognostic of ccRCC. We believe that the relationship between miRNAs and their respective genes should be more profoundly searched as markers and possible therapeutic agents in this neoplasia.

Key words: Renal Cell Carcinoma; Prognosis; Neoplasm Staging; Neovascularization Pathologic; Neoplasm; Tumor Biomarkers.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de células renais (CCR)

O carcinoma de células renais representa 2 a 3% de todos os cânceres, com maior incidência em países ocidentais. Na Europa, houve um aumento anual de 2% na incidência destes tumores. Entretanto, as taxas de incidência estabilizaram-se ou declinaram em alguns países (Suécia e Dinamarca), enquanto que outros países europeus ainda mostram tendência de aumento [1].

O Instituto Nacional do Câncer em 2014 estimou 68.800 novos casos de câncer de próstata e 8.940 novos casos de câncer de bexiga em todo Brasil [2]. O dado mais recente sobre incidência do CCR foi publicado no ano de 2002;de acordo com estes dados a incidência do CCR no Brasil varia de 7 a 10 casos por 100.000 habitantes/ano nas áreas mais industrializadas, exibindo incidência menor nas áreas menos desenvolvidas [3]. O pico de incidência do CCR ocorre entre os 60 e 70 anos de idade, com uma proporção de 1,5:1 entre homens e mulheres [1].

1.2 Aspectos Fisiopatológicos

O carcinoma células renais é a neoplasia maligna renal mais frequente e apresenta quatro variantes principais:

- O carcinoma das células claras (CRCC) é a variante mais frequente, correspondendo de 75 a 80% dos carcinomas de células renais. A maioria dos CRCC são neoplasias corticais solitárias que ocorrem com igual frequência nos dois rins. O carcinoma de células claras tem pior prognóstico quando comparado com os subtipos de células cromófobas

ou papílifero. Porém, a taxa de resposta à terapia antiangiogênica é maior que em outros tipos histológicos.

- O carcinoma papilífero de células renais representa 10% dos adenocarcinomas renais e tem curso clínico menos agressivo que o CRCC. O carcinoma papilífero pode ser bilateral ou multifocal com frequente hemorragia, necrose e degeneração cística durante a evolução do tumor.

- O carcinoma renal de células cromófobas representa 5% dos tumores renais; menos agressivo que os outros carcinomas renais celulares, esse tipo é caracterizado por grandes células pálidas com citoplasma reticulado e membrana celular proeminente na hematoxilina-eosina.

- O carcinoma de ductos coletores (Bellini) é um tipo raro, compondo apenas 1% dos tumores renais, é localizado no centro do rim e pode atingir até 12 cm. Quando diagnosticados, em geral, apresentam-se em estágio avançado [4].

1.3 Fatores de risco

Mutações genéticas têm sido identificadas como fatores de risco hereditários em famílias propensas ao desenvolvimento do câncer, estima-se que estas mutações representam de 1 a 2% dos casos de CCR. As quatro principais síndromes autossômicas hereditárias relacionadas ao aparecimento do CCR são: síndrome de Von Hippel-Lindau, Leiomiomatose Hereditária,

Carcinoma Renal Papilífero e síndrome de Birt-Hogg-Dubé [5]. Pacientes que sofrem de insuficiência renal crônica também estão sujeitos a desenvolver tumores renais agressivos na maioria dos casos [6].

Tabagismo é um fator bem estabelecido, o risco é proporcional à quantidade de cigarros fumados e a duração do hábito tabagista, sendo que o risco aumenta em 50% para homens e 20% para mulheres tabagistas [7].

Obesidade de longa data e hábitos alimentares baseados em dietas com alto teor de gorduras e baixa quantidade de ingestão de frutas e vegetais é responsável por 40% dos carcinomas renais nos Estados Unidos. Fatores hormonais como anormalidades com insulina e estrógeno também estão relacionados com a doença e o risco estimado é de um aumento de24% para homens e 34% para mulheres para cada 5 kg/m² de aumento de índice de massa corpórea [8].

1.4 Manifestações clínicas e diagnóstico

O CRCC é geralmente uma doença assintomática. Exames de imagem abdominal, como ultrassonografia e tomografia, indicados para detecção de outras patologias levam ao diagnóstico incidental do câncer renal. O diagnóstico incidental de massas renais está se tornando cada vez mais comum pelo amplo uso de exames de imagem na atualidade. Uma massa renal pode ser apenas um cisto renal simples que não requer nenhum tratamento ou acompanhamento [9], ou representam lesões renais benignas como angiomiolipomas ou

oncocitomas ou então carcinomas de células renais [10].Embora a maioria das lesões sejam detectadas incidentalmente até 17% de todos os carcinomas de células renais têm metástases a distância no momento do diagnóstico [11] neste cenário clínico heterogêneo, a evolução das técnicas de diagnóstico e tratamento podem revolucionar a abordagem a esta doença, e a biologia molecular pode contribuir em ambos [12].

1.5 Fatores prognósticos

O CRCC é uma doença potencialmente letal, 30% dos pacientes tratados têm recorrência da doença após nefrectomia radical para o tratamento da doença localizada [13]. Conhecer melhor seus fatores prognósticos para sobrevida é fundamental, principalmente para aconselhar os pacientes a possíveis terapias adjuvantes [14].

Os fatores prognósticos clássicos incluem fatores anatômicos, histológicos, clínicos e moleculares, sendo os mais importantes estadiamento TNM, presença ou não de invasão microvascular e grau de Fuhrman [15].

1.5.1 Estadiamento TNM

O estadiamento do câncer renal segue a classificação TNM [16]. A última validação da classificação TNM foi feita em 2009. Os componentes do TNM

incluem extensão do tumor primário (T), o envolvimento dos linfonodos regionais (N) e a presença de metástase à distância (M)[16]. Em geral, CCRs com maior estádio T, metástase linfonodal ou metástase à distância apresentam pior prognóstico e menor sobrevida específica e geral [15].

Devido à detecção incidental de pequenas massas renais, muitos estudos têm avaliado a significância do tamanho tumoral para determinar o prognóstico e propõe mudanças na classificação TNM, em particular o diâmetro tumoral que enquadra o tumor no estádio I ou II da doença [15].

Com base em estudos recentes, a Union Internationale Controle Cancer e a American Joint Committee on Cancer atualizaram a classificação TNM do CRCC em 2009. Neste novo sistema de classificação, a classificação dos tumores T1 permaneceu descrita como a classificação anterior, porém os tumores T2 foram subdivididos em dois subgrupos baseados no tamanho do corte do tumor: tumores com 10 cm ou menos são classificados como T2a e maiores que 10 cm são classificados com T2b. Tumores que invadem a veia renal são classificados como T3a; tumores com invasão ipsilateral da adrenal foram re-classificados como T4 no caso de invasão contígua, M1 se não houver invasão contígua. A classificação linfonodal de 2002 considerava Nx linfonodos não acometidos, N0 invasão tumoral apenas nos linfonodos e N1, N2 referindo ao número positivo de metástases linfonodais. Entretanto, Lee *et al*. não encontraram diferenças significativas nos estudos de 2009 entre pacientes considerados N1 e N2; portanto estas determinações atualmente são consideradas apenas N1 [16].

1.5.2 Invasão microvascular

A invasão microvascular aplica-se a vários tipos de câncer como fator prognóstico, é definida como a invasão de células neoplásicas em vasos linfáticos, microscópicos ou êmbolos vasculares. Estudo feito em 2013 por Bedken e Kruck; constatou que pacientes com invasão microvascular eram, em média, mais velhos e tinham um estadiamento mais alto. A invasão microvascular também foi associada com um diâmetro maior do tumor, grau de Fuhrmann superior além de um estágio T mais avançado e presença de metástase ganglionar. O prognóstico e a ausência de metástase eram menos favoráveis no caso de invasão microvascular [17].

Em um estudo semelhante, Santiago-Agredano *et.al.* encontraram resultados próximos dos obtidos por Bedken e Kruck. Eles também observaram correlação entre maior idade, sexo masculino, alto grau de Fuhrman e estádio pT avançado com a ocorrência de invasão microvascular [18]. Em um estudo de nosso grupo o fenômeno da invasão microvascular também foi demonstrado como sendo de suma importância para determinação do prognóstico do CRCC [19].

1.5.3 Grau de Fuhrman

Em 1982, Fuhrman*et.al.* realizaram um estudo que definiu quatro graus nucleares para definir os tumores do carcinoma renal do tipo células claras.

Foram considerados o crescimento do tamanho do núcleo das células tumorais, irregularidade e proeminência nuclear. Foi constatado que a graduação nuclear é um parâmetro muito consistente na predição do desenvolvimento de metástase à distância após a nefrectomia [20].

Fuhrman*et.al.* estudaram 103 pacientes com carcinoma celular renal, diagnosticado entre 1961-1974. Eles demonstraram que entre 45 pacientes que apresentaram estágio I da doença, e com tumores classificados como grau I de Fuhrman, não apresentaram metástase dentro do período de 5 anos após a nefrectomia. Considerando que 50% dos tumores classificados em graus mais altos metastatizaram, este estudo constatou que de fato o grau nuclear é um forte preditor de sobrevida dos pacientes com carcinoma de células renais [20].

1.6 Tratamento

O tratamento padrão para o CCR localizado é a nefrectomia parcial ou radical, podendo ser realizada de forma aberta ou minimamente invasiva (laparoscópica e robótica). Em casos selecionados pode ser realizado a ablação por radiofrequência ou crioterapia. A radioterapia está reservada para casos não passíveis de cirurgia.

Além das intervenções cirúrgicas, a terapia antiangiogênica tem tido destaque para o tratamento do CRCC nos últimos anos. Sete drogas foram aprovadas nos últimos 8 anos. Quatro agentes inibem diretamente o VEGFR, bloqueando assim a angiogênese, dois agentes inibem mTOR, e um agente age

diretamente com o VEGF impedindo o mesmo de se ligar ao seu receptor. Todos estes agentes têm também outros objetivos, o que explica algumas das toxicidades e efeitos anti-tumorais, possivelmente aditivos, bem como a atividade de uma variedade de outras malignidades. Todos demonstraram melhora na sobrevida livre de progressão em pacientes com CRCC, em ensaios clínicos randomizados. Além disso, os dois grupos, anti-VEGF e inibidores de mTOR, têm toxicidades de classe específica que variam em intensidade com base na afinidade de ligação, e na variabilidade intra pacientes [21].

1.7 Angiogênese

No início dos anos 70, Folkman postulou que tumores necessitam ser vascularizados para seu crescimento e que moléculas difusas regulavam esse processo [22]. O primeiro mecanismo descrito como uma forma de vascularização tumoral teve o nome de *sprouting angiogenesis* e envolvia a proliferação e migração das células endoteliais para microvasos pré-existentes promovendo uma organização tubular das estruturas vasculares. O maior executor deste processo é o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e os membros da família deste, destacando-se o VEGF-A [23].

VEGF-A induz a vasodilatação dos microvasos pré-existentes e aumenta a permeabilidade destes. Proteínas plasmáticas, particularmente o fibrogênio, extravasam e formam uma matriz provisória posteriormente usada no processo migratório pelas células endoteliais. A Angioproteína-2 é produzida e liberada

pelas células endoteliais e antagoniza a atividade da Angioproteína-1 na superfície da membrana celular das células endoteliais. Isto inibe as interações dos pericítos com as células endoteliais e favorece uma rede vascular imatura. O VEGF-A induz a proliferação celular e o aumento nas metaloproteases e ativadores de plasmiogênio para a degradação da matriz extracelular permitindo a migração das células endoteliais [24].

Pericítos são células estromais que sustentam a rede vascular, e no rim, os pericítos desempenham papéis críticos na angiogênese, na regulação do fluxo sanguíneo cortical renal e medular, e agem como progenitores de miofibroblastos intersticiais na fibrogênese renal. Eles interagem com as células endoteliais através de vias de sinalização distintas e sua ativação e desligamento dos capilares após lesão renal aguda ou crônica é crucial para a condução da progressão das doenças renais [25].

Para o recrutamento e cobertura pelo pericíto, outro fator, o PDGF-β (*Platelet Derived Growth Factor*) é extremamente necessário, já que funciona como quimioatrativo. Além disso, TGF-β (*Transforming Growth Factor beta*) também participa na estabilização das veias através da interação com a endoglina e outros receptores. Em tumores esses mecanismos não são bem ajustados levando à perda da interação de células endoteliais com os pericítos. Isso pode explicar o fato dos capilares tumorais apresentarem alta taxa de permeabilidade e diâmetros anormais [24].

A orientação dos mecanismos angiogênicos ainda não é totalmente estabelecida. É possível que a orientação das veias sanguíneas seja anômala para algumas extensões do tecido tumoral levando a uma vascularização

altamente desregulada. A angiogênese é essencial para o crescimento tumoral e ocorre tanto no carcinoma renal de células claras, como nos demais tipos de câncer. A angiogênese dá condições de sustentação, suprimento de nutrientes e oxigenação que permite que o tecido tumoral cresça de forma acelerada e se dissemine por outros órgãos e tecidos. Esta disseminação tem o nome de metástase, e os tumores renais metastatizam principalmente na área dos linfonodos regionais e posteriormente em linfonodos para-aórticos e paracavais. A disseminação hematogênica ocorre para pulmões, fígado, cérebro, osso e/ou pele [26].

1.7.1 A via angiogênica

O HIF-1 (*Hipóxia Inductible Factor*-1) tem sido bem estudado pelo papel que exerce na sobrevivência das células em condições de hipóxia. A regulação do HIF-1 é um processo complexo e envolve várias moléculas e vias celulares. As células dos mamíferos são capazes de se adaptar a baixos níveis de oxigênio e o HIF-1 é tido como o principal elemento nesse processo regulatório. O HIF-1 é um heterodímero consistido de uma unidade alfa e uma unidade beta. A subunidade beta é constitutivamente expressa enquanto a subunidade alfa é induzível. No estado de normóxia, duas prolinas são hidroxiladas no HIF1-α pela prolilhidroxilase utilizando O_2 neste processo, permitindo uma ubiquitinação do HIF1-α [27].

Após a hidrólise alguns cofatores facilitam a ligação do HIF-α com o complexo do VHL e com isso se dá a degradação do HIF-α. Em estado de hipóxia os níveis de oxigênio estão baixos, impedindo a hidrólise do HIF-α e consequentemente impedindo a ligação deste com o complexo formado pelo VHL, aumentando os níveis de HIF-α no tecido. Da mesma forma, a mutação do VHL impede a formação do complexo, promovendo o acúmulo de HIF-α. A expressão de HIF_1-α e HIF_2-α induz duas importantes vias de sinalização mitogênica intracelular, a via da Proteína Quinase Ativadora da Mitose (MAPK) e a via do mTOR (*mamalian Target Of Rampamicin*). O HIF-α promove a transcrição de importantes genes na promoção da angiogênese (VEGF), proliferação celular (PDGF), captação de glicose (GLUT-1) e manutenção do balanço ácido-básico (Anidrase carbônica IX) [28].

O mTOR é um regulador crucial do crescimento e proliferação celular e pesquisas nessa área têm revelado que mTOR desregulado exerce um papel chave em vários cânceres. mTOR apresenta um papel central na sinalização causada por nutrientes e mitógenos bem como fatores de crescimento. A compreensão da ciência por trás do papel do mTOR como um regulador de muitos processos celulares e como um potencial alvo terapêutico tem aberto possibilidades de tratamento em vários tipos de câncer [27].

Na angiogênese o mTOR tem a função de formar os novos vasos para aumento da oxigenação e influxo de nutrientes, crescimento e divisão celular. O mTOR aumenta a translação do HIF-1 e HIF-2 [27]. A transcrição do HIF leva a expressão de fatores em resposta ao estresse causado pela hipóxia (Figura 1), incluindo fatores de crescimento como o VEGF, PDGF e TGF-α [29].

A família do VEGF compreende seis membros VEGF-A, B, C, D, E e o Fator de Crescimento da Placenta (PIGF), que diferem entre si pelas suas massas moleculares e propriedade biológicas. O mecanismo de ação é através de receptores de Tirosina Quinase, o VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. O VEGF-A é conhecido por exercer um papel crucial na angiogênese e sua atividade está diretamente ligada à atividade do VEGFR-1 e VEGFR-2. VEGF-A promove um aumento na permeabilidade microvascular e gera uma deposição de fibrina que pode ser responsável pela migração massiva das células endoteliais para matriz extracelular. Isso sustenta a sobrevivência das células endoteliais pela expressão de proteínas antiapoptóticas liberadas por essas células [30]. Devido a essas atuações, os membros da família do VEGF são tidos como reguladores chave das funções das células endoteliais, controlando a vasculogênese, angiogênese, permeabilidade vascular e sobrevivência das células endoteliais. Outros fatores que promovem a angiogênese são, além de muitos outros, o PDGF, e o já citado HIF1-α [31].

A família do PDGF é atualmente composta por 4 membros, PDGF-A –B –C e –D, que se ligam aos receptores denominados PDGF-α e PDGF-β. Esta família é considerada a maior promotora de mitogênese por fibroblastos, células musculares lisas, e vários outros tipos de células. O PDGF-A e o PDGF-B formam homo e heterodímeros com seus receptores de tirosina quinase, ao passo que o PDGF-C e PDGF-D formam apenas homodímeros. O aumento da atividade do PDGF tem sido relacionado à várias condições patológicas em adultos, incluindo a tumorigênese [31].

PDGFR-β é conhecido por ser uma molécula indispensável na migração, proliferação e sobrevivência dos perícitos, essas moléculas estão também relacionadas com proteínas da matriz extracelular, fibronectina e colágeno tipo 1 [32].

Como mencionado, vários genes estão envolvidos no processo angiogênico e atuam em cascata, ou seja, a expressão de um gene desencadeia a expressão do outro direta ou indiretamente, o controle da expressão destes genes então se torna de suma importância para o controle deste processo.

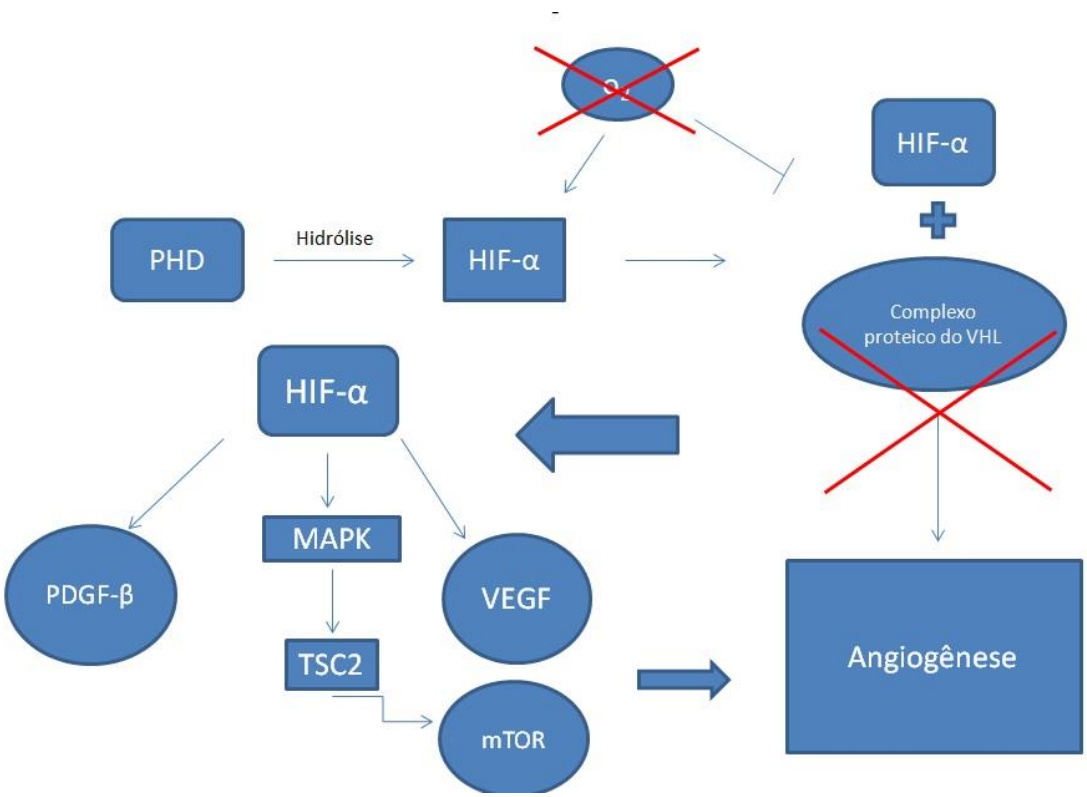

Figura 1 - Representação esquemática da via angiogênica. O evento que desencadeia a transcrição dos genes envolvidos nessa via é a hipóxia. Sem a quantidade necessária de oxigênio no tecido, a Prolilhidroxilase (PHD) não realiza a hidrólise do HIF-1a permitindo uma alta concentração deste no tecido e desencadeando a transcrição dos outros genes envolvidos na via.

1.8 Micro RNA

MicroRNA compõem um grupo de moléculas pequenas de RNA que possuem entre 19 e 25 nucleotídeos, com ação na regulação da expressão dos genes nas plantas e em animais [33]. Essas pequenas moléculas foram descobertas há mais de 20 anos [34] e desde então têm sido reconhecidas como moléculas que atuam especificamente no controle pós-transcricional na maioria do genoma dos eucariotos.

Estima-se que os miRNAs regulam a translação de mais de 30% das proteínas codificantes de genes que estão envolvidos em vários processos celulares importantes, como apoptose, diferenciação, desenvolvimento e proliferação celular [35], podendo atuar como supressores tumorais ou agentes oncogênicos [36]. Além disso, a expressão anômala destes pequenos RNAs tem sido associada a diferentes patologias humanas [37].

1.8.1 Biogênese dos miRNAs

Os miRNAs são sintetizados pela RNA polimerase II e modificados após a transcrição pela adição de uma capa na região 5’ e uma cauda poli A na região 3’. O precursor primário do miRNA (pri-miRNA), forma uma estrutura do tipo *hairpin* e, no núcleo, após ser submetido à ação do complexo microprocessador nuclear Drosha, o pri-miRNA é convertido em pré-miRNA, uma molécula de fita dupla de aproximadamente 60-70 nucleotídeos [38,39]. O pré-miRNA é então exportado para o citoplasma pela Exportina-5, proteína especializada no

transporte núcleo citoplasmático de macromoléculas, incluindo os ácidos ribonucleicos [40].

No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela enzima Dicer, e torna-se uma molécula de miRNA duplex, que consiste no miRNA maduro e sua fita complementar. Novamente a Dicer cliva a dupla fita e produz o miRNA maduro de fita única, que será incorporado ao complexo RISC (complexo silenciador induzido por RNA) [33].

O RISC guia o miRNA maduro até seu RNAm alvo e após esse processo ocorre a repressão da tradução da proteína ou a promoção da degradação do RNA. Esta ação dependerá do grau de complementariedade do miRNA com o seu RNA mensageiro (RNAm) alvo (Figura 2), o pareamento pode ser perfeito ou incompleto [41].

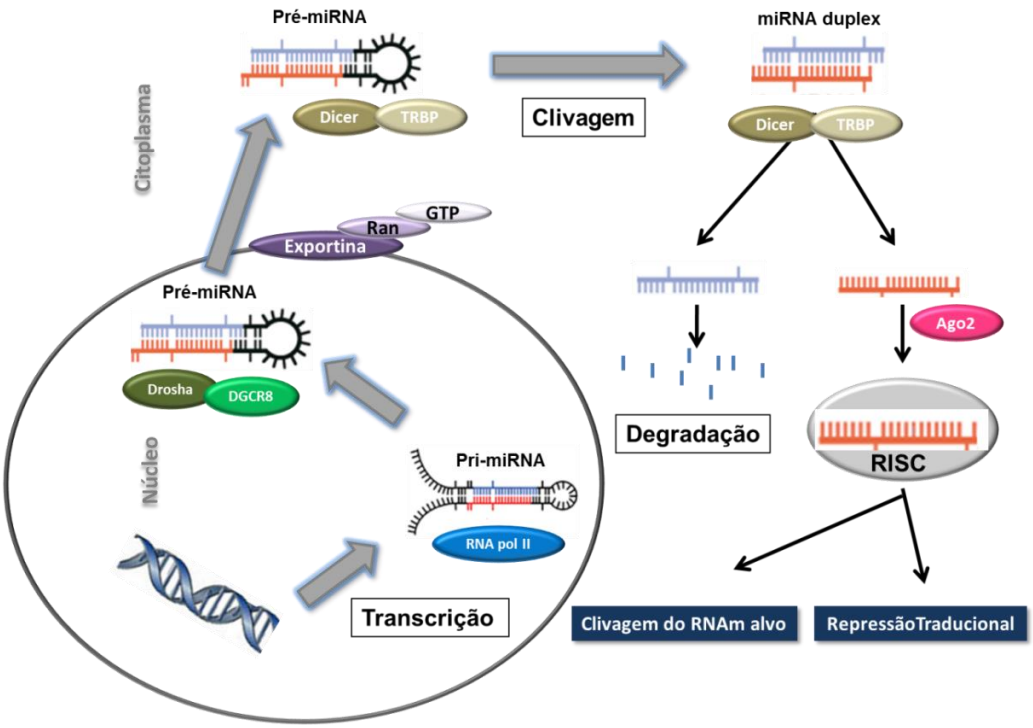

Figura 2 – Representação esquemática dos principais eventos ocorrentes na biogênese dos microRNAs [42].

1.9 miRNAs e genes envolvidos na angiogênese do CRCC

O CRCC de células renais é caracteristicamente um tumor hipervascularizado. Um estudo de Takahashi *et al*. há 20 anos demonstrou que o mRNA do gene VEGF estava presente em níveis significativamente mais elevados nos tecidos de CRCC do que em tecidos de rins normais, levando ao reconhecimento do VEGF como um importante mediador da angiogênese no câncer renal [43]. Evidências mais recentes revelaram que mais de 90% dos tumores de células renais hipervascularizados apresentam mRNA de VEGF elevado quando comparado com tecidos normais de rim [44]. Os efeitos biológicos do VEGF nas células alvo são mediadas por receptores de tirosina-quinase

denominados VEGFR-1 e VEGFR-2. Curiosamente, o VEGFR-1, em particular, é superexpresso em relação ao HIF em situações de hipóxia [45]. Além destes, o gene VHL está diretamente ligado ao início da via angiogênica especificamente no CRCC. O complexo proteico do VHL é responsável por se ligar ao gene HIF1-α em situações normais, porém se este estiver mutado ou inativo (como por exemplo, em indivíduos que possuem a síndrome de Von Hippel-Lindau, uma das maiores causas do aparecimento do CRCC) não ocorre esta ligação, aumentando os níveis de HIF1-α no tecido o que promove o recrutamento de genes responsáveis pela neoformação vascular como VEGF e seus receptores, além do PDGF, mTOR e muitos outros genes angiogênicos [46].

Os miRNAs podem prover repressão traducional ou apenas silenciar a produção da proteína de seu gene alvo, tudo depende do pareamento no fim de sua biogênese. Os miRNAs 99a, 99b, 100, 126, 29a, 29b, 200b, 106a e 106b podem estar diretamente ligados à angiogênese do CRCC pois são tidos como regulatórios dos genes supracitados. Alguns miRNAs se comportam como agentes oncogênicos no CRCC por interferir na expressão de genes necessários para o equilíbrio da homeostase (como por exemplo os miRNAs 106a e 106b que impedem a expressão do gene VHL) gerando condições favoráveis para o desenvolvimento tumoral. Já os demais miRNAs agem normalmente como supressores tumorais, controlando negativamente a expressão de genes que, se superexpressos, estimulam a angiogênese do CRCC.

Diante das limitações no tratamento da doença disseminada torna-se importante estudar fatores que são responsáveis pelo controle das principais moléculas conhecidas na fisiopatologia do CRCR e nesse contexto o estudo dos possíveis miRNAs responsáveis pela regulação destes genes assume

fundamental importância. Alguns miRNAs parecem atuar na via de angiogênese Zhang [47], sendo por isso conhecidos como angiomirs**:** miR-126 [48, 49]; o miR-100, o qual foi relatado com regulador da angiogênese a partir do controle da via mTOR [50], o miR-200 que pode ser induzido por hipóxia [51], e o miR-26a [52].

Poucos estudos na literatura avaliaram a presença de angiomirs no desenvolvimento tumoral [53]. O objetivo deste trabalho é avaliar o perfil de expressão de genes e miRNAs envolvidos na via da angiogênese em pacientes submetidos a nefrectomia por carcinoma de células claras e verificar sua correlação com parâmetros tradicionalmente utilizados para definição de prognostico nesta neoplasia.

2. OBJETIVOS

Analisar a expressão dos miRs-99a,99b,100; 199a; 106a,106b; 29a, 29b; 126;200b e de seus respectivos genes alvo em pacientes portadores do CRCC comparados com tecidos não tumorais.

Comparar a expressão dos miRNAs e genes alvo com os fatores prognósticos clássicos do CRCC grau tumoral, estádio patológico e invasão microvascular.

3. MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Estudo experimental, exploratório, retrospectivo.

3.2 Pacientes

Foram analisadas amostras teciduais armazenadas no banco de tumores do LIM 55 (Laboratório de Investigação Médica 55) de 56 pacientes com carcinoma de células renais do tipo células claras tratados por nefrectomia radical ou parcial realizada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (tabela 1) e 5 pacientes com tecido renal normal (grupo controle) de pacientes com estenose de JUP (Junção Uretero-Pélvica).Os pacientes portadores de CRCC foram operados entre janeiro de 2008 e março de 2012 acompanhados no ambulatório do setor de oncologia da disciplina de urologia por um período mínimo de 12 meses.

Os pacientes foram subdivididos em grupos de acordo com as características clínico-patológicas. Foram avaliados os fatores prognósticos: tamanho tumoral, tipo histológico, grau nuclear de Fuhrman e invasão microvascular (anexo 1). Os pacientes foram também avaliados de acordo com o prognóstico dividindo-se os pacientes em tumores de alto risco, intermediário e baixo risco conforme descrito por nosso grupo em 2007 (19). Os níveis de expressão dos miRNAs miR-99a, 99b, 100; 199a; 106a; 106b; 29a; 29b; 126; 200b e seus respectivos genes alvo foram correlacionados com os fatores prognósticos do CRCC.

O consentimento informado foi obtido dos pacientes para o uso do material retirado em pesquisas. Estas amostras de tecido estão estocadas em condições ideais de armazenamento em freezer -80ºC e fazem parte do banco de tumores da disciplina de urologia. Fragmentos de 1 cm^2 de tumor foram colocados em RNA *later* imediatamente após a nefrectomia e armazenados a -80ºC até o uso.

Os miRNAs descritos e seus genes alvo foram avaliados através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Tabela 1 - Dados demográficos dos pacientes com CRCC

Idade (anos)	
Média	63,2
Mediana	51
Gênero	
Masculino	37 (66,0%)
Feminino	19 (33,9%)
Tipo de Nefrectomia	
Parcial	16 (28,6%)
Radical	40 (71,4%)
Grau de Fuhrman	
1-2	32 (57,2%)
3-4	24 (42,8%)
Invasão Microvascular	
Ausente	44 (78,6%)
Presente	12 (21,4%)
Estádio Patológico (T)	
T1-T2	26 (46,4%)
T3-T4	30 (53,6%)
Estádio Patológico (N)	
N0	54 (96,4 %)
N1	02 (3,6%)
Estádio Patológico (M)	
MO	48 (85,7%)
M1	08 (14,3%)

3.3 Ética

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram codificadas, garantindo sua confidencialidade. Este projeto foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisas do HCFMUSP sob o número 352.891em 07/08/2013.

3.4 Processamento das Amostras

Os espécimes cirúrgicos foram coletados imediatamente após o procedimento cirúrgico, sendo seccionado um fragmento proveniente de tumores renais, armazenado imediatamente em criotubo Eppendorf de 1,5 ml com 1 ml de RNA *LATER*® (fixador de RNA), sendo tomados todos os cuidados para evitar a contaminação das amostras e degradação do RNA. Os espécimes então foram mantidos em freezer -80 ºC no LIM-55 até o momento do processamento.

3.5 Isolamento do miRNA, do RNA e Síntese do Cdna

3.5.1 Isolamento do miRNA e do RNA dos espécimes cirúrgicos

Para extração de miRNA utilizamos o kit de isolamento *miRVana*®miRNA (Ambion, Austin, Tx), de acordo com as recomendações do fabricante. Este kit permite o isolamento de todos os tipos de RNA, e por isso o utilizamos para a extração do miRNA e do RNA dos espécimes cirúrgicos.

O tecido congelado foi transferido para um tubo próprio para esse procedimento e macerado no aparelho Tissue lyser LT (Quiagen®). Ao tecido macerado foram adicionados 500µl do tampão de lise (10 vezes o volume da

massa tecidual), e 10% do volume total de aditivo para homogeneização e logo após os tubos foram colocados em gelo por 10 minutos. Foram adicionados 500µl de fenol-clorofórmio, e as amostras foram agitadas em *vortex* e centrifugadas na velocidade máxima (10.000g) por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi então removida e transferida para um novo tubo onde foi adicionado um terço do volume de etanol 100% a temperatura ambiente. A solução então foi passada para o filtro (coluna GFX) e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000g por 1 minuto. Neste momento o filtro contém RNA e o filtrado, os pequenos RNA. O filtro foi então reservado. Ao filtrado foi adicionado 2/3 do volume de etanol e transferidos para uma nova coluna, centrifugadas e o filtrado foi descartado. Retomando os filtros com o RNA, foram realizadas lavagens com soluções próprias do kit, intercaladas com centrifugações. Após o descarte do filtrado, centrifugamos por mais 1 min a 10.000 g para secagem da coluna. As colunas foram então repassadas para um novo tubo e então adicionamos 100µl de água livre de RNase pré-aquecida a 95ºC, no centro da coluna. Após 1 min a temperatura ambiente, centrifugamos a coluna e os miRNA e o RNA foram armazenados a -80ºC até sua utilização.

A pureza e concentração do miRNA e do RNA foram mensuradas em espectrofotômetro Nanodrop® (ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280nM).

3.5.2 Síntese do DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) do miRNA foi obtido usando TaqMan®miRNA Reverse Transcription kit (AppliedBiosystems, Foster City, CA).

Uma quantidade de 200ng/µl de miRNA foi diluída em 20 µl de água. Deste volume 3µl foi submetido à transcrição reversa, onde foram adicionados 7 µl de mix contendo os reagentes do kit: 0,15µl de DNTP mix, 0,5µl da enzima transcriptase reversa, 1,5µl do tampão da enzima, 0,19µl de inibidor de RNAse, 3,66µl de água livre de nucleasse e 1µl de *primer stem-loop* com sequência específica para os miRNA (Tabela 2), totalizando 10µl de cDNA. A reação foi realizada em equipamento PCR Veriti® (AppliedBiosystem, Foster City, CA) seguindo os seguintes parâmetros: 30 min a 16 ºC, 30 min a 42 ºC e 5 min a 85 ºC.

A síntese do cDNA do RNA foi realizada utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (AppliedBiosystems) que utiliza a Transcriptase reversa Multiscribe™e *primers* randômicos. O RNA total foi diluído em H_2O livre de nucleases em um volume final de 20µl e concentração de 500 µl/ng. A este volume foram acrescentados 4µl de oligonucleotídeos randômicos (10X), 1,6µl do mix de dNTPs (25X), 4µl do tampão da enzima (10X), 2µl da enzima transcriptase reversa e 8,4µl de água livre de nuclease. A solução foi então submetida a ciclos de temperaturas (25 ºC por 10 min, 37 ºC por 120 min e 85 ºC por 5 min) no termociclador Veriti® (AppliedBiosystems). Ao final das reações ambos os cDNA foram armazenados a -20 °C até o uso.

3.5.3 Análise da Expressão de miRNA e RNA

A expressão dos miRNA e RNA estudados foi avaliada a partir do cDNA utilizando a metodologia qRT-PCR no sistema ABI 7500 Fast no modo standard

utilizando-se Master Mix PCR Taqman Universal (Applied Biosystems, Foster City, CA). A expressão de miRNA e RNA individuais foi analisada usando *primers* sequência-específicos (tabela 2).

Tabela 2 – *Primers* utilizados para quantificação da expressão dos microRNAs e seus genes alvo no CRCC.

miRNA	Ensaio	Gene	Ensaio
29a	002112	HIF1a	Hs00153153_m1
29b	000413	VHL	Hs03046964_s1
200b	0004571	VEGF-a	Hs00900055_m1
99a	000435	VEGFR-1	Hs01052961_m1
99b	000436	VEGFR-2	Hs00911700_m1
100	000437	PDGF-β	Hs00966522_m1
126	002228	Mtor	Hs00234508_m1
199a	000498	B2M	Hs99999907_m1
200b	0004571		
106a	0000103		
106b	0004672		
RNU48	010006		

Este protocolo TaqMan® utiliza dois iniciadores não fluorescentes e uma sonda com dupla marcação que se anela à região localizada entre os iniciadores. Esta marcação dupla é formada por um fluoróforo que emite luz quando excitado e um *quencher* que absorve luz emitida pelo fluoróforo. Durante os ciclos da PCR, a sonda é quebrada pela Taq polimerase na etapa de extensão do iniciador anelado. Esta quebra da sonda elimina a absorção pelo *quencher* que pode ser então medida através de uma câmera situada na parte superior do equipamento. A quantificação da emissão absorvida pela câmera após quebra da sonda

permite a quantificação indireta do miRNA e do RNA alvo contido na reação após cada ciclo da PCR.

3.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software SPSS 19.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Os testes t de student ou Mann-Whitney foram usados para comparar a relação entre a expressão dos miRNAs miR-99a,99b,100; 199a; 106a;106b; 29a; 29b; 29c; 126; 200a;200b e seus respectivos genes alvos os fatores prognósticos do carcinoma renais do tipo células claras (tamanho, estadiamento clínico e graduação nuclear de Fuhrman). Com relação a tríade patológica foram utilizados os testes ANOVA ou Kruskall-Wallis quando as variáveis eram homogêneas ou não respectivamente.

Um valor de p inferior ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significante para todos os cálculos.

4.RESULTADOS

4.1 Perfil da expressão dos genes envolvidos no processo angiogênico.

A análise da expressão gênica através do método qRT-PCR nos tecidos de CRCC indicou uma superexpressão em 84% dos casos para VEGFa e em 66% dos casos para PDGF. O mTOR estava subexpresso em 88% dos casos, bem como o VHL que foi subexpresso em 86% dos casos, VEGFR1 em 59%, HIF1-α em 57% e o VGFR2 em 55% dos casos (Figura 3).

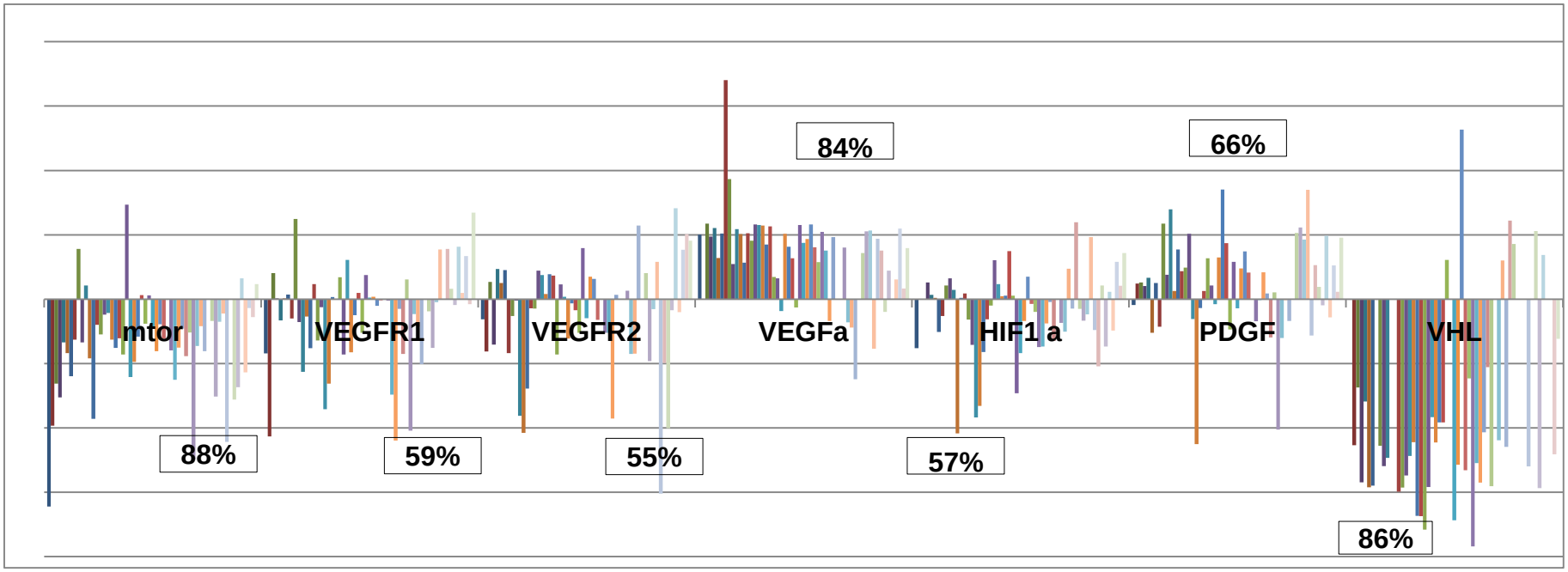

Figura 3 – Perfil de expressão dos principais genes associados à angiogênese em 56 pacientes com CRCC.

O gene VEGFa que apresentou maior superexpressão dentre os demais genes estudados (84%) (Figura 5) também apresentou maior mediana de expressão quando comparado com os outros genes (7,25). O gene VHL apresentou 86% de subexpressão (Figura 5) e 0,004 de mediana de expressão (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias e medianas da expressão dos genes estudados.

Gene	Mediana	Desvio Padrão
mTOR	0,22	4,05
VEGFR1	0,80	3,89
VEGFR2	0,71	4,21
VEGFa	7,25	348,69
HIF1a	0,71	2,56
PDGF	1,74	9,96
VHL	0,004	63,28

Inicialmente os pacientes foram divididos em três grupos (baixo, intermediário e alto risco) de acordo com a “Tríade Patológica” proposta por pesquisadores de nossa disciplina em 2007, e então correlacionamos a expressão dos genes com a tríade patológica, mas não encontramos nenhuma associação significativa (tabela 4).

Tabela 4 - Correlação da expressão dos genes associados à angiogênese com os grupos divididos de acordo com a Tríade Patológica.

Genes	Grupos			
	Baixo n= 18	Intermediário n=29	Alto n=9	p
mTOR	0,63(1,32)	1,32 (5,43)	0,55 (0,63)	0,82*
VEGFR2	3,17(6,12)	1,11(1,38)	1,51(2,26)	0,89**
VEGFR1	1,96(2,10)	1,84(4,85)	4,48(6,10)	0,37*
VEGF A	143,97(576,03)	7,10(4,47)	4,20(4,58)	0,08**
HIF1 A	1,56(2,27)	1,05(1,29)	3,12(5,58)	0,43**
PDGF	5,91(11,18)	4,27(9,39)	7,05(9,53)	0,76*
VHL	0,29(1,04)	18,28(87,65)	5,18(6,73)	0,67*
mTOR	0,63 (1,32)	1,32 (5,43)	0,55 (0,63)	0,82*

Teste *Anova Teste**Kruskall-Wallis

Comparamos também a expressão dos principais genes ligados à angiogênese no CRCC com os três fatores da tríade patológica separadamente: tamanho tumoral (Tabela 5), invasão microvascular (Tabela 6) e grau de Fuhrman (Tabela 7) e mais uma vez não encontramos diferenças estatísticas significativas.

Tabela5 - Expressão gênica comparada ao tamanho tumoral

Genes	Tamanho tumoral		
	≥7cm n=30	<7 n= 26	p
mTOR	0,52 (1,11)	1,54 (5,84)	0,97**
VEGFR1	2,41 (5,14)	1,31 (1,72)	0,87**
VEGFR2	1,74 (2,06)	2,69 (5,81)	0,59**
VEGFA	100,03 (474,81)	6,32 (4,45)	0,12**
HIF1a	1,27 (1,97)	1,74 (3,10)	0,50*
PDGF	6,62 (12,76)	3,56 (5,17)	0,97**
VHL	0,39 (1,20)	18,84 (85,70)	0,12**

*Teste T **Teste deMann-Whitney

Tabela 6 - Correlação da expressão dos genes associada à ausência ou à presença de invasão microvascular.

Genes	Invasão microvascular		
	IMV ausente n= 44	IMV presente n= 12	p
mTOR	0,45 (0,95)	3,39 (9,18)	0,25**
VEGFR1	2,08 (4,27)	1,10 (1,71)	0,46*
VEGFR2	2,03(4,11)	2,75(4,76)	0,61*
VEGFA	71,04(392,47)	3,61(3,57)	0,57*
HIF1a	1,10(1,63)	2,91(4,36)	0,08**
PDGF	5,24(10,57)	4,89(7,41)	0,91*
VHL	12,54(72,60)	3,66(5,73)	0,68

*Teste T **Teste de Mann-Whitney

Tabela 7 - Nível de expressão gênica em relação ao grau de Fuhrman.

Genes	Grau de Fuhrman		
	Grau I e II n= 32	Grau III e IV n= 24	p
mTOR	1,43 (5,32)	0,40 (0,52)	0,81**
VEGFR1	2,43 (4,97)	1,19 (1,68)	0,56**
VEGFR2	1,57 (1,79)	3,00 (6,10)	0,45**
VEGFA	93,59 (458,79)	6,57 (4,81)	0,23**
HIF1a	1,54 (2,11)	1,45 (3,06)	0,89*
PDGF	4,39 (9,21)	6,17 (10,97)	0,51*
VHL	0,19 (0,84)	20,65 (89,28)	0,13**

*Teste T **Teste deMann-Whitney

Correlacionamos os fatores extensão do tumor (T) (Tabela 8) e metástase à distância (M) (Tabela 9) com a expressão dos genes associados à angiogênese no CRCC e também não encontramos correlação estatística.

Tabela 8 - Expressão dos genes em relação ao estadiamento do CRCC.

Genes	Estadiamento		
	T1-2 n= 26	T3-4 n=30	p
mTOR	0,51 (1,16)	1,48 (5,62)	0,38*
VEGFR1	2,47 (5,31)	1,33 (1,72)	0,97**
VEGFR2	1,33 (1,74)	3,03 (5,63)	0,51**
VEGFA	106,72 (492,77)	6,83 (4,67)	0,36
HIF1a	1,47 (2,13)	1,53 (2,95)	0,80**
PDGF	7,07 (13,16)	3,34 (4,95)	0,16*
VHL	0,20 (0,86)	19,00 (85,67)	0,18**

*Teste T **Teste de Mann-Whitney

Tabela 9 - Correlação do fator metástase à distância com a expressão dos genes da via angiogênica no CRCC.

Genes	Metástase		
	Ausente n= 48	Presente n=8	P
mTOR	0,46(0,93)	3,64(9,71)	0,82**
VEGFR1	1,96 (4,14)	1,41 (2,10)	0,71*
VEGFR2	1,81 (2,86)	4,03 (8,24)	0,49**
VEGFA	65,65(379,05)	7,98(4,54)	0,67*
HIF1a	1,54(2,76)	1,27(1,20)	0,77*
PDGF	5,59 (10,78)	3,05(3,04)	0,49*
VHL	1,18 (3,44)	54,33(151,70)	0,79**

*Teste T **Teste de Mann-Whitney

4.2 Perfil da expressão dos miRNAs envolvidos no processo angiogênico

A análise indicou uma superexpressão em 80,0 %, 94,0%, 95%, 100% e 97% dos casos para o miRNA99a, 99b, 200b, 106a e 106b respectivamente. O miRNA126 e 100 se mostraram subexpressos em 81,0% e 67,0% dos casos respectivamente. Os miRNAs 199a, 29a e 29b apresentaram uma expressão muito heterogênea (Figura 4). As médias e medianas da expressão dos miRNAs estão expostas na tabela 10.

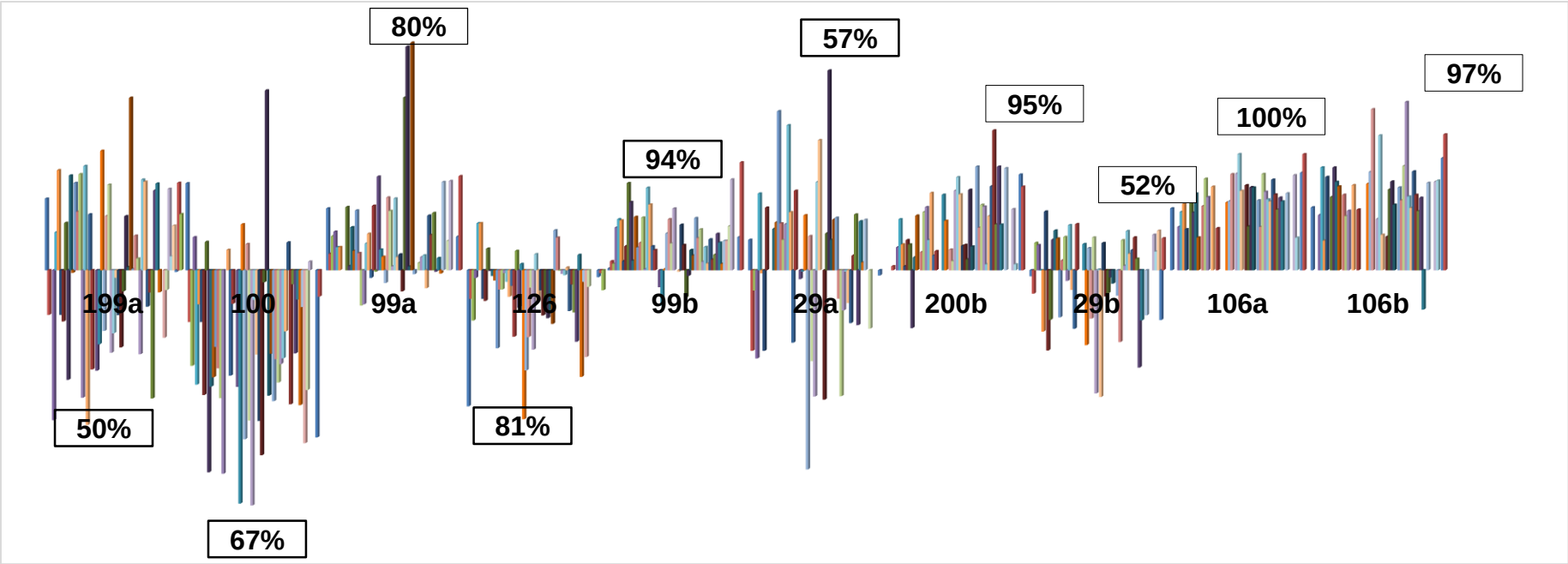

Figura 4 – Perfil de expressão dos miRNAs associados aos principais genes da via angiogênica em 56 pacientes com CRCC.

Tabela 10 - Médias e medianas da expressão dos miRNAs incluídos nos nossos estudos.

miRNA	Média	Mediana	Desvio Padrão
199a	356,36	1,11	2192,45
100	3389,38	0,004	473,26
99a	13270,48	3,63	64326,94
126	2,96	0,33	1,31
99b	23,17	4,55	65,29
29a	10971,57	5,51	1875,60
200b	109,19	13,06	386,76
29b	3,39	1,15	4,86
106a	109,37	59,83	148,56
106b	735,67	98,77	2390,31

Para o estudo do perfil de expressão dos miRNAs associados aos principais genes da via angiogênica também dividimos os pacientes incluídos no estudo de acordo com a tríade patológica. Encontramos correlação significativa apenas para o miR200b, que apresentou maior expressão nos pacientes de alto risco segundo a tríade patológica (p=0,01) (tabela 11).

Tabela 11 - Perfil da expressão dos miRNAs relacionado à divisão dos pacientes em baixo, intermediário e alto risco

MicroRNAs	Grupos			
	Baixo (n=18)	Intermediário (n=29)	Alto (n=9)	P
100	0,51 (1,34)	878,42 (4618,50)	0,77 (1,75)	0,65*
99a	17,89 (34,38)	24553,80 (86666,25)	44,44 (75,01)	0,41*
99b	22,01 (37,56)	13,07 (31,14)	65,13 (159,75)	0,17*
29a	707,88 (2027,19)	2953,53 (14705,28)	7,05 (9,72)	0,75*
29b	3,94 (7,35)	2,72 (2,89)	5,30 (2,91)	0,59*
126	2,10 (4,16)	0,96 (2,96)	0,37 (0,32)	0,29*
106a	65,14 (65,16)	110,15 (141,57)	202,94 (270,20)	0,23*
106b	159,44 (171,94)	1046,55 (3045,16)	511,16 (870,48)	0,47*
199a	60,12 (104,18)	614,51 (2990,22)	48,64 (85,19)	0,65*
200b	43,39 (89,17)	58,51 (98,63)	563,01 (1128,21)	**0,01***

*Teste Anova

Correlacionamos a expressão dos miRNAs com os três fatores da tríade isoladamente. Os dados estão expostos nas tabelas 12,13 e 14.A expressão do miR126 foi o único a apresentar correlação significativa, mas apenas com o grau de Fuhrman. Neste caso ele apresentou superexpressão nos pacientes com grau mais baixo (p=0,03).

Tabela 12 - Expressão dos miRNAs relacionada ao tamanho tumoral.

MiRNAs	Tamanho Tumoral		
	Tumor≥ 7 cm (n=30)	Idade < 7 cm (n=26)	P
199a	61,13 (91,26)	651,59 (3099,88)	0,41**
100	945,63 (4792,83)	0,90 (2,77)	0,35**
99a	11053,71 (56262,30)	15671,96 (73235,01)	0,80*
126	1,57 (3,60)	1,02 (2,11)	0,49*
99b	22,79 (42,34)	23,59 (84,36)	0,96*
29a	3660,96 (15295,52)	12,62 (28,97)	0,57**
200b	57,91 (97,01)	162,81 (545,59)	0,36*
29b	3,48 (6,21)	3,29 (2,90)	0,12**
106a	79,23 (68,51)	139,51 (196,72)	0,76**
106b	125,34 (140,61)	1346,00 (3305,13)	0,26**

* Teste T **Teste de Mann-Whitney

Tabela 13 - Expressão dos miRNAs de acordo com a presença ou ausência de invasão microvascular

miRNAs	Invasão Microvascular		
	Ausente (n=44)	Presente (n=12)	P
199a	445,81 (2485,04)	43,28 (73,27)	0,58*
100	600,00 (3816,97)	0,88 (1,80)	0,60*
99a	16575,10 (71714,47)	51,97 (76,99)	0,47*
126	1,55 (3,28)	0,36 (0,38)	0,43**
99b	17,73 (35,12)	43,48 (127,41)	0,72**
29a	2318,55 (12190,30)	5,37 (7,45)	0,57*
200b	55,97 (95,09)	355,35 (899,73)	0,53**
29b	3,19 (5,13)	4,30 (3,50)	0,54*
106a	93,38 (127,07)	173,31 (213,58)	0,17*
106b	572,09 (2254,46)	1389,97 (2951,72)	0,39*

* Teste T **Teste Mann-Whitney

Tabela 14 - Expressão dos miRNAs de acordo com grau de Fuhrman.

miRNAs	Grau de Fuhrman		
	Graus I-II (n=32)	Graus III-IV (n=24)	p
199a	1402,50 (87,23)	697,10 (3154,27)	0,11**
100	0,49 (1,32)	983,86 (4887,62)	0,43**
99a	23,61 (45,13)	28821,14 (93531,68)	0,97**
126	1,92 (3,73)	0,55 (1,25)	0,03**
99b	17,40 (31,45)	29,41 (88,93)	0,51*
29a	442,87 (1607,25)	3649,46 (16360,37)	0,28**
200b	56,44 (99,57)	169,48 (557,25)	0,33*
29b	3,63 (6,04)	3,11 (3,06)	0,71*
106a	103,91 (158,18)	113,84 (143,83)	0,83*
106b	39,95 (3467,84)	190,08 (427,42)	0,43**

* Teste T **Mann-Whitn

Não encontramos correlações significativas quando correlacionamos a expressão dos miRNAs com o estádio patológico ou presença de metástases (tabelas 15,16).

Tabela 15 - Expressão dos miRNAs em relação ao estadiamento patológico

miRNAs	Estadiamento		
	T1-T2 (n=26)	T3-T4 (n=30)	p
199a	50,88 (82,18)	619,70 (2989,61)	0,34*
100	1024,60 (4988,40)	0,69 (2,59)	0,23**
99a	11976,10 (58559,04)	14465,27 (70373,79)	0,89*
126	1,19 (2,75)	1,41 (3,19)	0,78*
99b	23,35 (43,82)	23,01 (81,17)	0,98*
29a	3926,22 (15977,99)	71,06 (297,40)	0,40**
200b	48,99 (94,76)	161,87 (521,68)	0,33*
29b	3,86 (6,32)	2,96 (3,03)	0,51*
106a	67,86 (60,49)	143,33 (187,99)	0,23**
106b	580,39 (1976,87)	862,71 (2722,08)	0,71*

* Teste T **Teste de Mann-Whitney

Tabela 16 - Correlação do fator metástase à distância com a expressão dos miRNAs reguladores dos genes associados à via angiogênica no CRCC.

miRNAs	Metástase		
	Ausente (n=48)	Presente (n=8)	p
199a	399,57 (2373,97)	107,88 (286,69)	0,73*
100	546,59 (3643,45)	1,89 (4,94)	0,69*
99a	15422,82 (69236,81)	48,92 (81,75)	0,56*
126	1,17 (2,54)	2,20 (5,18)	0,39*
99b	25,78 (69,88)	6,41 (6,35)	0,47*
29a	2147,31 (11740,47)	18,95 (28,74)	0,66*
200b	119,99 (0,47)	50,56 (114,07)	0,66*
29b	3,61 (418,33)	2,24 (3,24)	0,46*
106a	117,25 (5,12)	54,21 (43,87)	0,38*
106b	819,42 (156,78)	149,38 (113,15)	0,56*

*Teste T

4.3 Perfil da expressão do miRNAs comparado aos seus respectivos genes alvo no CRCC.

A primeira correlação entre a expressão do miRNA *versus* seu gene alvo foi do miRNA 99a com o gene mTOR. Este último foi subexpresso em 86% dos casos, enquanto o miR99a foi superexpresso em 71,41% (Figura 5).

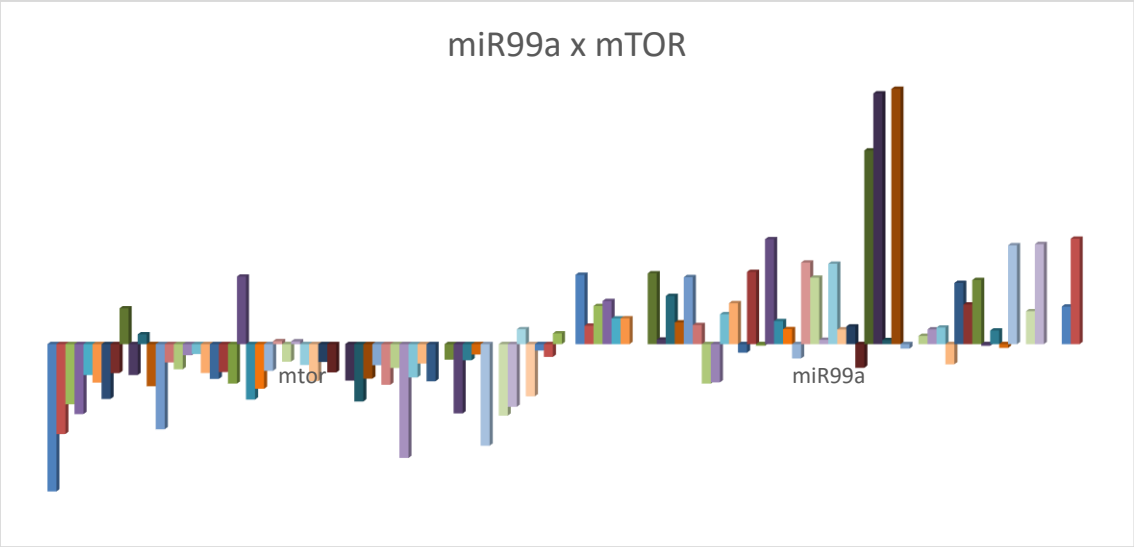

Figura 5 -Comparação da expressão do miRNA 99a e seu gene alvo mTOR.

As análises de comparação entre o miRNA 199a e seu gene alvo, o HIF1-α, demonstraram que este último apresentou uma expressão anárquica, visto que o HIF1-α teve uma porcentagem de subexpressão de 54%. O miRNA 199a apresentou uma expressão de 50% dentre os casos estudados (Figura 6).

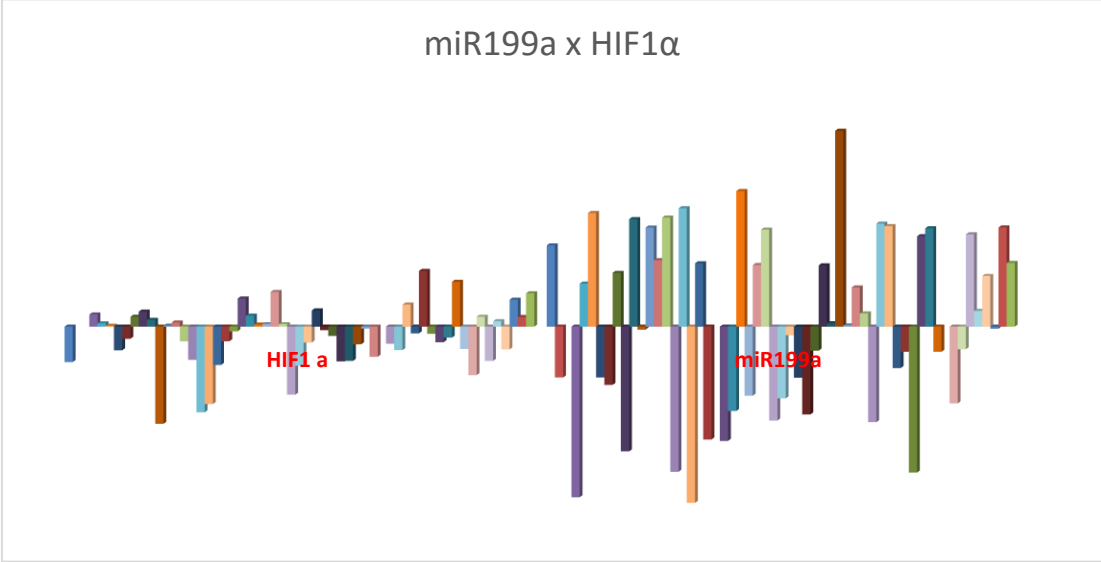

Figura 6 - Expressão do miRNA 199a e seu gene alvo HIF1-α.

O gene VEGFa apresentou 77% de superexpressão, enquanto o miRNA 126 se mostrou subexpresso em 78% dos casos (Figura 7).

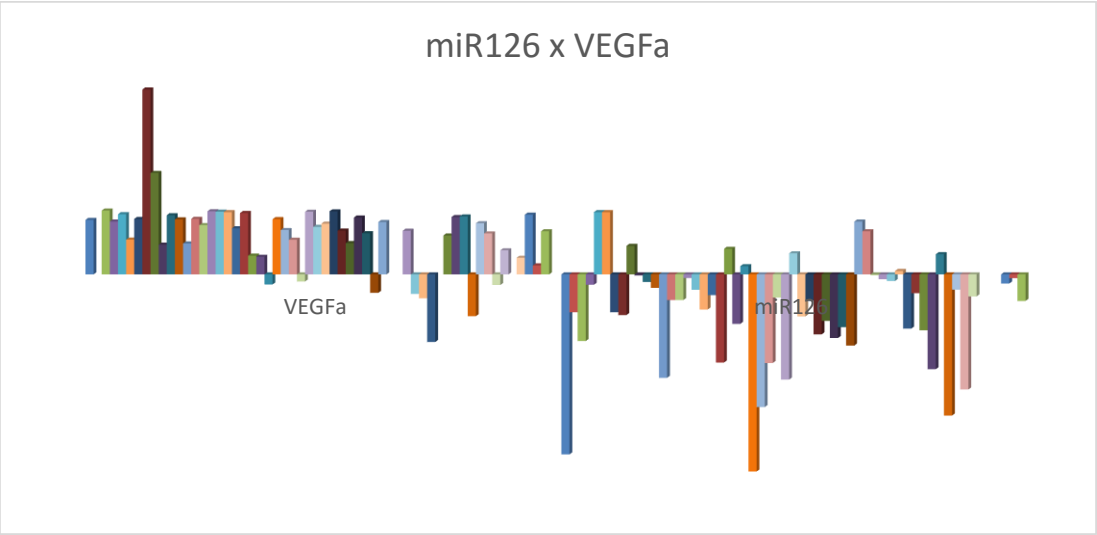

Figura 7 - Expressão do gene VEGFa comparada à expressão do miRNA 126.

O miRNA 200b se mostrou superexpresso em 78,57% enquanto seu gene alvo, o VEGFR2, apresentou uma subexpressão de 52% nos casos estudados (Figura 8).

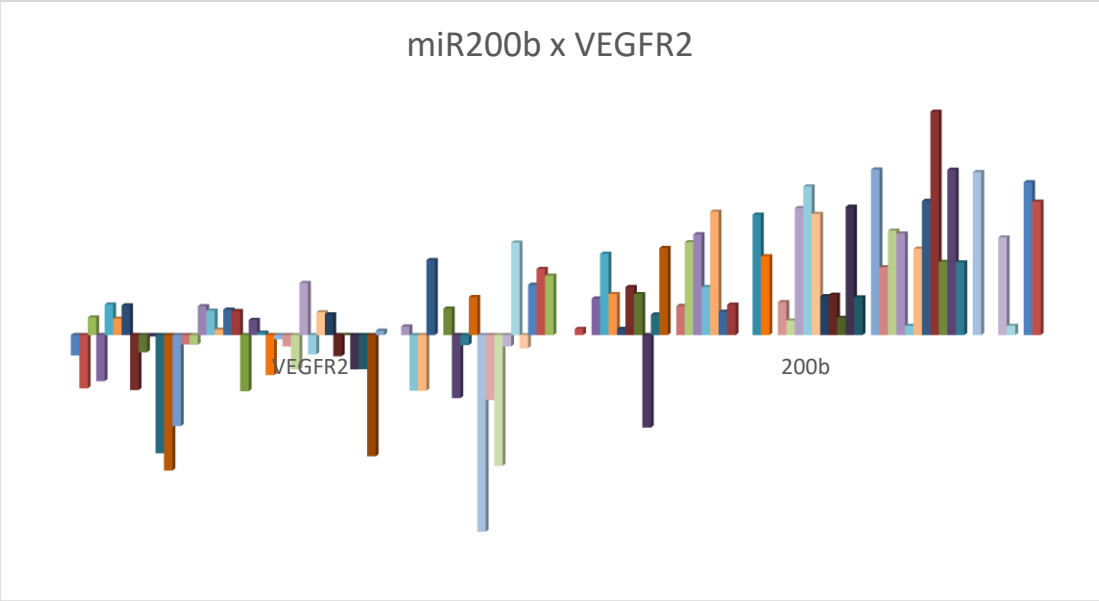

Figura 8 - Expressão do miRNA 200b comparada ao seu gene alvo VEGFR2.

O gene PDGF é regulado pelos miRNAs 29a e 29b. Entretanto em nossos casos não observamos uma possível regulação, pois o gene em questão estava superexpresso em 63% dos casos, e ambos os miRNAs estavam subexpressos em 53,57% dos casos (Figura 9).

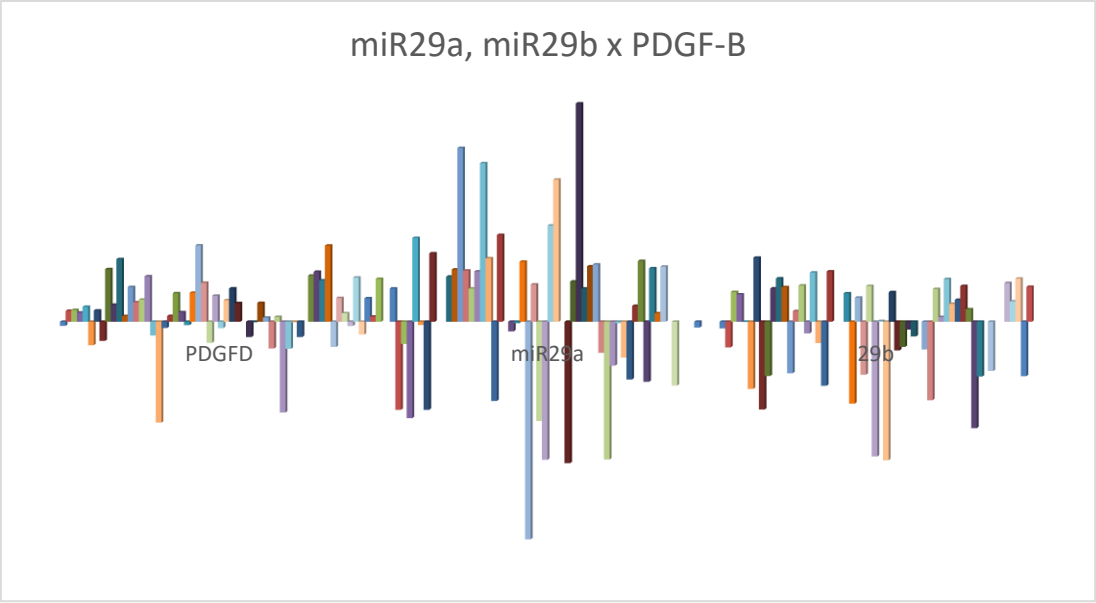

Figura 9 - Expressão dos miRNAs 29a e 29b em relação ao seu gene alvo PDGF.

Finalmente, o VHL foi encontrado subexpresso em 86% dos casos, os miRNAs que são associados a ele são o 106a e 106b, e em nossos casos estes mostraram uma superexpressão de 100,0% e 97,0% respectivamente (Figura 10), demonstrando uma possível regulação.

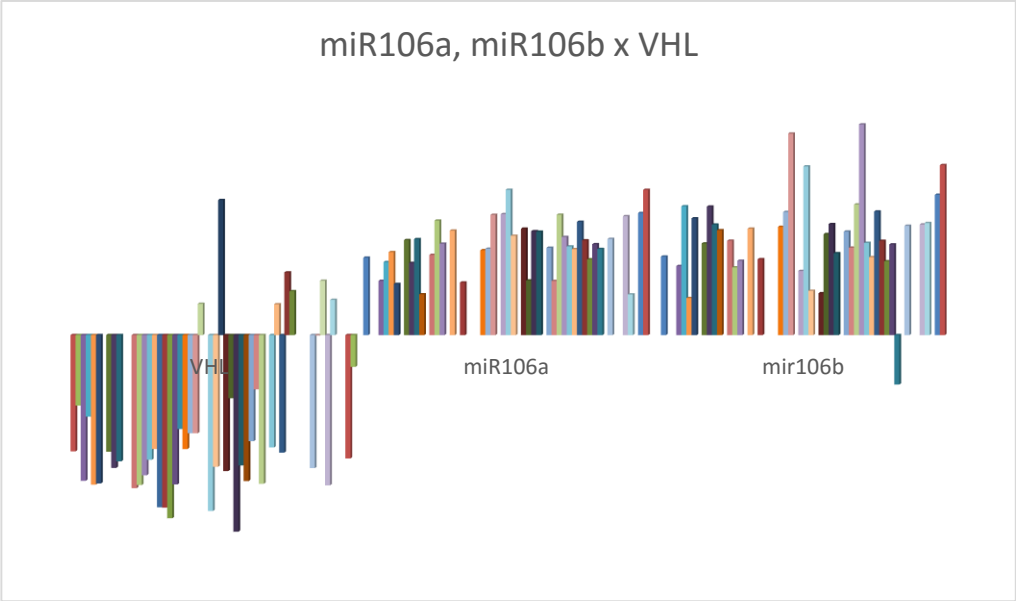

Figura 10 - Expressão dos miRNAs 106a e 106b em relação ao gene VHL.

5. DISCUSSÃO

Avaliamos a expressão dos miRNAs 99a, 99b, 100, 126, 29a, 29b, 200b, 106a e 106b devido ao seu possível envolvimento ao processo de angiogênese do CRCC pois são tidos como regulatórios de genes sabidamente associados ao processo de angiogênese. O miRNA 126 é descrito na literatura como um regulador do gene VEGF-a. Aqui em nosso trabalho conforme o esperado encontramos uma subexpressão do miR126 e uma superexpressão do VEGFa. Além disso, também mostramos associação entre a maior expressão do miR126 em pacientes que possuíam menor grau de Fuhrman.

Khella *et. al.* realizaram um estudo para comparar a expressão de vários miRNAs diferentes em tecidos de tumores renais primários e metastáticos. Neste estudo eles também estudaram a relação entre a expressão do miRNA 126 e o gene VEGF especificamente, e perceberam que existe uma significante relação das expressões destes fatores, e assim como encontramos em nosso trabalho, foi observada uma relação inversamente proporcional entre o miRNA 126 e seu alvo [54]. Em um estudo mais recente Khella *et. al.* descreveu o miRNA 126 como um possível marcador prognóstico, pois, sua baixa expressão está diretamente associada à tumores mais agressivos, menor tempo de sobrevida específica do tumor e evoluções tumorais mais rápidas [47].

Em nossos casos o miR126 estava mais expresso nas amostras de CRCC que apresentaram menor grau de Fuhrman. Neste mesmo sentido, a subexpressão deste miRNA também foi associada ao grupo de pacientes de alto risco no câncer de pâncreas [55] além de ser descrito como elemento inibitório da proliferação celular e induzir apoptose no carcinoma hepatocelular, através da repressão que exerce sobre o gene Sox2 [56]. Considerando estes fatores

achamos coerente a associação que encontramos do miRNA126 com o melhor fator prognóstico do CRCC visto que ele inibe um oncogene que é o VEGFa.

Como esperado encontramos uma superexpressão do gene VEGFa em nossos casos de CRCC. Este gene está fortemente associado ao processo da angiogênese no CRCC, e em outros tipos de câncer como, por exemplo, o câncer de pulmão, de ovário [57], e carcinoma hepatocelular [58]. Djordjevick *et. al*. encontraram uma relação da superexpressão do gene VEGFa com alto grau de Fuhrman analisando 93 amostras de tecido utilizando a técnica de imunohistoquímica [59].

Burgesser *et al.* realizaram um estudo em 83 pacientes analisando a expressão do VEGFa e de outras 3 proteínas (HIF1a, CD34 e Ki67), correlacionando a expressão destes com os principais fatores prognósticos do CRCC. Neste estudo foi utilizada a técnica de imunohistoquímica para análise da expressão da proteína produzida pelos genes em observação. Foi observada uma correlação entre a superexpressão do VEGFa com o tempo de sobrevida dos pacientes; indivíduos com porcentagem de expressão do gene VEGFa maiores que 30% apresentaram um menor tempo de sobrevida após o tratamento cirúrgico. Também foi observada uma relação linear direta da superexpressão do VEGFa com o gene Ki67 que é responsável pela proliferação celular, sendo assim um estímulo para o fenômeno da angiogênese [60]. Em nosso trabalho como esperado encontramos uma superexpressão do gene VEGFa entretanto não correlacionamos este gene com nenhum fator prognóstico, entretanto devemos ressaltar que os trabalhos da literatura avaliaram a proteína VEGFa e não o mRNA que foi a molécula avaliada por nós.

Ambos os receptores do VEGF apresentaram um perfil de expressão heterogêneo. Estudos indicam que o VEGFR1 e VEGFR2 em conjunto com o VEGFa agem como marcadores prognósticos importantes no CRCC, muito associados ao estágio tumoral e tempo de sobrevida. Porém estes fatores não agem sozinhos, pois fazem parte da via angiogênica e dependem da expressão um do outro para desempenharem seus papéis [61]. Sendo assim esperávamos uma superexpressão destes receptores, entretanto ambos apresentaram uma expressão heterogênea em nossos casos e nenhuma associação com os fatores prognósticos. Mais uma vez gostaríamos de ressaltar que existem poucos trabalhos na literatura que a avaliaram a expressão gênica destes receptores, e a grande maioria avalia a expressão proteica. Em nosso grupo estes mesmos receptores já foram avaliados no CRCC e eles encontraram uma superexpressão destes dois receptores [62].

O miRNA 200b geralmente é encontrado subexpresso nas amostras de tumor e até o presente momento, sua expressão não foi correlacionada com nenhum fator clínico-patológico do CRCC. No entanto, em nossas amostras este miRNA se mostrou 95% superexpresso, e isso pode talvez explicar o fato dos receptores do VEGFa estarem subexpressos, pois o miR 200b regula diretamente estes genes [63]. Além disso, a maior expressão do miRNA 200b mostrou correlação significativa com tumores de alto risco. Liu *et. al.* Observaram que o miRNA 200b é subexpresso nos tecidos de CRCC comparados com tecidos renais normais, por outro lado ele aparece superexpresso em tecidos de câncer de pulmão e câncer de ovário [64]. O miRNA 200b não foi registrado como marcador prognóstico no CRCC até o presente momento, entretanto no câncer de próstata nosso grupo já demonstrou uma superexpressão deste miRNA, e

uma associação entre a maior expressão com fatores de melhor prognóstico desta neoplasia (Escore de Gleason mais baixo e tumores não invasivos) [65].

O PDGF-B também se mostrou superexpresso. A expressão de PDGF-B não apresentou associação com nenhum dos fatores prognósticos clássicos. Wang *et. al.* estudaram o papel do PDGF-B e seu receptor (PDGFR-β) na progressão do CRCC através de análise de *microarray* em 174 pacientes e foi observado uma redução significativa no risco de morte nos pacientes com maior expressão do PDGF-B dentre as amostras estudadas. Eles também realizaram testes *in vivo*, após a indução de tumor nos modelos experimentais. Foi constatado que a alta expressão de PDGF-B inibe o crescimento do tumor nos ratos além de reduzir a proliferação celular nos mesmos [66]. Além disso, Qi *et. al.* conseguiram correlacionar a alta expressão do gene PDGF com um maior tempo de sobrevida dos pacientes. Foram estudadas 100 amostras de tumores de CRCC, onde 38 casos apresentaram baixa expressão do PDGF-B enquanto 62 apresentaram o gene superexpresso. A expressão de PDGF-B foi significativamente correlacionada com o diâmetro do tumor, estadiamento T, graduação histopatológica e metástase do CRCC [67].

No trabalho já citado de Chow *et. al.* e no trabalho de Wotschofsky *et. al.* os miRNAs da família 29 (29a, 29b e 29c) foram validados como associados ao gene PDGF-B [68]. Nós apenas consideramos a expressão do miRNA 29a e 29b em nossas amostras. O miRNA 29a se mostrou superexpresso em 57% dos casos, enquanto o miRNA 29b se mostrou subexpresso em 52% dos mesmos. Wotschofsky comparou a expressão dos miRNAs em tecidos de rim normal, tumores primários e metástases de CRCC e encontraram uma expressão mais

alta destes miRNAs nos tecidos normais em relação aos tecidos tumorais. He *et. al.* compararam a expressão do miR29a em três estágios diferentes do tumor e também encontraram subexpressão do miRNA nos tecidos tumorais [69]. Não encontramos nenhuma significância estatística considerando a expressão destes miRNAs com os fatores prognósticos do CRCC e também não podemos afirmar que o gene PDGF-B está sendo regulado por eles pois este foi superexpresso na maioria dos nossos casos enquanto seus possíveis reguladores, miR29a e miR29b, apresentaram uma expressão heterogênea.

O gene VHL apresentou uma subexpressão importante em nossos casos (86%), este gene é um dos que desencadeiam eventos cruciais da via angiogênica, pois está diretamente ligado à expressão do HIF1-α, o principal gene da via em estudo. A subexpressão do VHL observada em nossa série pode ser atribuída ao fato de seus dois miRNAs controladores estarem altamente superexpressos. O miR106a apresentou superexpressão em 100% dos casos estudados e o 106b em 97%.

Esse fato pode colaborar para ocorrência do fenômeno da angiogênese no CRCC, visto que o bloqueio da atividade do VHL impede que este se junte ao seu complexo proteico, e com isso não se ligue ao HIF1-α, deixando este último livre no tecido tumoral desencadeando a produção dos outros genes responsáveis pela angiogênese, fato que também pode ser a explicação para alta expressão do VEGF-A também encontrada em nossas amostras.

Shahzad *et. al*. avaliaram a expressão do gene VHL em 30 casos de CRCC, através da técnica de PCR. Foi observado por eles que em 20 casos (95%) o gene VHL apresentava mutações favorecendo a progressão dos

tumores. Além disso, também foi observado que o VHL é mutado no carcinoma renal das células cromófobas e no carcinoma renal papilífero [70]. Em um estudo com linhagem celular proveniente do CRCC Zhang *et. al* observaram a progressão do crescimento celular quando o gene VHL estava inativo. Como resultado, perceberam que devido à baixa expressão do VHL; o HIF1-α se manifesta fortemente. Esse fator não altera o crescimento das células *in vitro*, porém quando esta cultura é utilizada em modelos experimentais os altos níveis do gene HIF1-α contribuem para um crescimento acelerado dos tumores. Além disso, foi observado também que a alta expressão do HIF1-α induz a produção do gene VEGF, fato que aumenta significantemente o crescimento tumoral nos modelos experimentais [71].

Sobre os miRNAs reguladores do VHL, Chow *et.al.* demonstraram em seu estudo que o miRNA 106a é um agente estimulante da hipóxia, já que inibe a expressão do gene VHL, fato também observado em nosso estudo [72]. O miRNA 106b foi relatado como um importante marcador prognóstico por Slaby *et.al*, eles realizaram um estudo com 38 amostras de pacientes com CRCC pós nefrectomia. Para análise da expressão dos genes foi utilizada a técnica de qRT-PCR, e foram encontrados altos níveis de expressão para os miRNAs 106a e 106b (106a apresentou um nível de expressão de 20.557 nos tecidos de CRCC e 4.934 nos tecidos controle, enquanto o miRNA 106b 14.102 nos casos e 2.937 nos tecidos controle). Além disso, eles encontraram significância estatística na relação entre a expressão do miRNA 106b e a recorrência dos tumores após a nefrectomia (p=0,03) [73].

O miRNA 106a também é relacionado com um pior prognóstico no câncer gástrico, sua superexpressão foi relacionada positivamente com estágios mais avançados desta neoplasia além de contribuir para o crescimento dos tumores [74]. Por outro lado, o miRNA 106b é um marcador de bom prognóstico no câncer epitelial ovariano. Ele induz apoptose, diminui proliferação celular nos tecidos tumorais e sua expressão é mais elevada nos tecidos ovarianos normais e em tumores benignos [75]. Não encontramos significância estatística quando comparamos a expressão destes dois miRNAs com os fatores clínico-patológicos, porém sua forte influência na expressão do VHL nos sugere que estes miRNAs são importantes na ocorrência do processo angiogênico no CRCC.

O gene HIF1-α apresentou uma expressão heterogênea em nossas amostras. Entretanto esperávamos encontrar um padrão de superexpressão mais significativo já que HIF1-α é um potente agente pró angiogênico. Villaamil *et. al.* compararam a expressão do gene HIF1-α em três variantes de carcinoma das células renais diferentes. Eles registraram que os níveis de HIF1-α são significantemente mais altos no CRCC do que nas outras variantes, o HIF1-α apareceu superexpresso em 66 amostras de CRCC, 20 de carcinoma celular renal papilífero e em apenas 6 amostras de carcinoma renal das células cromófobas [76].

Além disso, Berghoff *et. al.* observaram os níveis de HIF1-α em amostras de metástase cerebral de CRCC, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer colorretal e melanoma através de imunohistoquímica. Eles também encontraram níveis mais altos de HIF1-α nas metástases cerebrais provenientes dos

pacientes de CRCC. Eles ainda registraram que as metástases cerebrais de CRCC apresentavam maiores efeitos da angiogênese em seus tecidos quando comparadas aos outros tumores [77].

Chow *et. al.* descreveu o miRNA 199a como associado ao gene HIF1-α no CRCC. Em nosso estudo, o gene HIF1-α apresentou um padrão heterogêneo de expressão, e o miRNA 199a demonstrou este mesmo padrão de expressão, fato que nos impede de afirmar a existência de uma correlação entre o gene HIF1-α e o miRNA 199a nos casos que estudamos. Si *et. al.* obtiveram resultados interessantes ao associar a expressão do miRNA 199a com os fatores clínico-patológicos do CRCC. Os resultados positivos de expressão do miR-199a foram detectados tanto nos tecidos de CRCC quanto em tecidos normais adjacentes, porém os tecidos tumorais apresentaram níveis de expressão significativamente menores uma média de 13,7 vezes ($p = 0,003$). A expressão de miR-199a foi negativamente correlacionado com recorrência tumoral ($P < 0,05$), mas não apresentaram correlações significativas com a idade dos pacientes, tipo histológico do tumor, metástase de nódulo linfático, metástase à distância, ou grau de Fuhrman. Os pacientes com expressão reduzida de miR-199a no tecido tumoral tinham um tempo de sobrevida significativamente mais curto do que aqueles com uma expressão maior do miRNA ($P = 0,017$ pelo teste de Log-rank) [78].

Além desta associação no CRCC, o miRNA 199a também foi encontrado regulando a via do gene HIF1-α no câncer ovariano [79], inibindo a proliferação celular no carcinoma hepatocelular [80] além de estar associado a um outro gene

responsável pela progressão tumoral no CRCC, o Fator de Crescimento dos Hepatócitos (HFG) [81].

O gene mTOR foi o gene que apresentou a mais alta taxa de subexpressão entre os genes estudados, ele esteve subexpresso em 88% dos casos. O mTOR é responsável pela ativação de vários outros genes ligados à via principal da angiogênese, e estes têm como função principal atuar na proliferação das células e aumento do tecido tumoral. Níveis mais baixos de expressão de mTOR já foram relacionados à um melhor prognóstico dos pacientes. Neste estudo Haddad et. al. demonstraram uma relação do mTOR e mais 4 elementos de sua via como marcadores prognósticos em espécimes cirúrgicos de 566 pacientes portadores do CRCC. Ficou provado que uma maior expressão do gene mTOR está diretamente ligada à possíveis recorrências dos tumores, além da expressão deste gene estar relacionada com fatores clínico-patológicos, como por exemplo, tumores de mais alto grau e com necrose presente. Aqui em nosso trabalho não correlacionamos a expressão do gene mTOR com nenhum dos fatores clínico-patológicos avaliados.

Os miRNAs 99a, 99b e 100 pertencem à uma mesma família e já foram descritos como miRNAs regulatórios do gene mTOR. Em nossos casos o miRNA 100 apareceu subexpresso em sua maioria bem como o gene mTOR o que nos impede de afirmar que houve relação entre estes dois elementos. Por outro lado em nosso grupo, Morais *et. al.* demonstrou que o miRNA 100 induz um efeito inibitório no gene mTOR em linhagens celulares de câncer de bexiga. Houve uma redução de 53% na expressão do gene após a exposição das células ao miRNA 100 [82]. Em contrapartida, os outros miRNAs da família do miRNA 100

(99a e 99b) apresentaram 80% e 94% de superexpressão, respectivamente, nos fazendo postular que em nossos casos o miR99a e 99b possam estar inibindo a expressão de mTOR. Cui*et. al.* estudaram os efeitos do miRNA 99a sobre o gene mTOR através da transfecção do miRNA em linhagens celulares de CRCC e xenoenxerto em modelos experimentais. O resultado descoberto foi que o miRNA 99a atua inibindo a expressão do gene mTOR tanto nas linhagens celulares como nos modelos experimentais. Ficou comprovado que a alta expressão do miRNA 99a interferia na fase G-1 do ciclo celular das células cancerosas retardando a proliferação celular e proporcionando um melhor prognóstico aos pacientes e, além disso, diminuía a progressão tumoral *in vivo* [83].

Tanto a função quanto a expressão do miRNA 100 nos tecidos tumorais são controversas, parecem ser tecidos e contexto dependente. Wang *et. al.* estudaram a expressão e a correlação do miRNA 100 com os principais fatores prognósticos e evolução do CRCC. Eles encontraram superexpressão de miR100 nas amostras de tumores em relação ao grupo controle. Além disso, a expressão do miRNA 100 foi significativamente associada a tumores de alto grau e a presença de metástase. Os pacientes que apresentaram alta expressão do miRNA 100 também tiveram menor tempo de sobrevida câncer específica. Este trabalho concluiu que o miRNA 100 é um importante marcador prognóstico pois está relacionado com um desfecho clínico desfavorável para os pacientes [84]. Neste mesmo sentido em câncer de próstata nosso grupo já demonstrou que a maior expressão de miR100 é associada com recidiva bioquímica e com menor tempo de sobrevida livre de recidiva desta neoplasia [85]. Em câncer de bexiga

nosso grupo demonstrou que este miRNA apresenta 100% de subexpressão nos tumores de baixo grau, enquanto que em tumores de alto grau este padrão reverte e o miR100 foi encontrado superexpresso na maioria dos casos, demonstrando não só seu papel tecido específico, mas também contexto dependente pois em um mesmo tumor ele possuiu dois padrões diferentes de expressão [86].

Com relação aos outros miRNAs da família do miR100, Gowrishankar *et. al.* observaram expressão de miRNAs em 95 amostras de CRCC. Foi utilizada a técnica de *microarray* para a análise das amostras, e o miRNA 99b apareceu subexpresso nas amostras de mais alto grau e amostras de pacientes que apresentaram progressão do tumor. O miRNA 99b também regula o gene mTOR no câncer pancreático, segundo Wei*et. al.* Eles perceberam que quando o gene mTOR era silenciado através de terapia com droga alvo, o nível de expressão do miRNA 99b subia drasticamente, levando a crer que o miRNA 99b é também um elemento ligado ao melhor prognóstico no câncer pancreático. Embora não tenhamos registrado significância estatística em relação a expressão do miRNA 99b em nosso estudo e os fatores prognósticos, podemos especular que este exerça uma regulação ativa no gene mTOR, juntamente com o miRNA 99a.

Dentre as limitações de nosso estudo podemos citar o nosso grupo controle, representado por tecido renal de apenas 5 pacientes com estenose de JUP. Um dos grandes problemas em biologia molecular é a captação do grupo controle, pois realizar biópsia em pacientes saudáveis é eticamente incorreto. Também podemos citar a falta de estudos funcionais para comprovação das interações entre miRNAs e os genes alvo, entretanto não possuímos em nosso

laboratório culturas celulares de carcinoma renal e para finalizar a falta da análise das proteínas também é uma limitação de nosso trabalho, porém mesmo não sendo um objetivo desta dissertação informamos que a análise proteica será realizada e os resultados serão incorporados a estes achados em um artigo final.

6. CONCLUSÕES

No geral, demonstramos uma superexpressão dos miRNAs analisados com exceção do miR100 e 126 que foram subexpressos, de acordo com a expressão genica observamos uma subexpressão da maioria dos genes analisados com exceção do VEGFa e PDGF. Quando avaliamos a expressão dos miRNAs com os genes alvo encontramos uma possível regulação por parte dos miRNAs 106a e 106b sobre o gene VHL, e do miR99a sobre o mTOR. Além disso, a superexpressão do VEGFa pode ser explicada pela subexpressão do miRNA126 visto que este último regula o gene.

Considerando os fatores prognósticos correlacionamos a expressão dos miRNAs 200b e 126 com dois fatores prognósticos importantes. A superexpressão do miRNA200b foi relacionado com pacientes de alto risco de acordo com a tríade patológica e a maior expressão do miRNA 126 com pacientes com baixo grau de Fuhrman, o que sugere que estes miRNAs possam ser possíveis marcadores prognósticos do CRCC.

7. REFERÊNCIAS

1. Ljungberg B, Hanbury DC, Kuczyk MA, Merseburger AS, Mulders PF, Patard JJ, et al. Renal cell carcinoma guideline. *European urology*. 2007;51(6):1502-10.
2. Câncer INd. Estimativa/2014- Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro-Brasil: INCA; 2014. Available from: http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf.
3. Pompeo A.C.L. MACP, Souza Jr A.E.P. , Abrantes A.S. , Buzaid A.C. , Dubeux A.C. , Wroclawski E.R. , Carvalhal E.F. , Carrerette F.B. , Hering F.L.O. , Maluf F. , Carvalhal G.F. , Sabaneeff J. , Milfont J.C.A. , Colombo Jr J.R. , Sadi M.V. , El Hayek O. , Clark O. , Scaletscky R. , Reis R.B. , Baroni R. H. , Marins R.L. , Ferreira U. , Matheus W.E. *Câncer Renal: Prognóstico*. 2006.
4. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *The American journal of surgical pathology*. 2013;37(10):1469-89.
5. Genetics of Kidney Cancer (Renal Cell Cancer) (PDQ(R)): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD)2002.
6. Hora M, Hes O, Reischig T, Urge T, Klecka J, Ferda J, et al. Tumours in end-stage kidney. *Transplantation proceedings*. 2008;40(10):3354-8.
7. Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2005;114(1):101-8.
8. Bjorge T, Tretli S, Engeland A. Relation of height and body mass index to renal cell carcinoma in two million Norwegian men and women. *American journal of epidemiology.* 2004;160(12):1168-76.
9. Ellimoottil C, Greco KA, Hart S, Patel T, Sheikh MM, Turk TM, et al. New modalities for evaluation and surveillance of complex renal cysts. *The Journal of urology*. 2014;192(6):1604-11.
10. Shah S, Watnick T, Atta MG. Not all renal cysts are created equal. *Lancet*. 2010;376(9745):1024.
11. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(1):9-29.
12. Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *Lancet*. 2015.
13. Brookman-May SD, May M, Wolff I, Zigeuner R, Hutterer GC, Cindolo L, et al. Evaluation of the Prognostic Significance of Perirenal Fat Invasion and Tumor Size in Patients with pT1-pT3a Localized Renal Cell Carcinoma in a Comprehensive Multicenter Study of the CORONA project. Can We Improve Prognostic Discrimination for Patients with Stage pT3a tumors? *European urology*. 2015.
14. Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World journal of urology*. 2010;28(3):319-27.
15. Grivas N, Kafarakis V, Tsimaris I, Raptis P, Hastazeris K, Stavropoulos NE. Clinico-pathological prognostic factors of renal cell carcinoma: A 15-year review from a single center in Greece. *Urology annals*. 2014;6(2):116-21.
16. Lee C, You D, Park J, Jeong IG, Song C, Hong JH, et al. Validation of the 2009 TNM Classification for Renal Cell Carcinoma: Comparison with the 2002 TNM Classification by Concordance Index. *Korean journal of urology*. 2011;52(8):524-30.
17. Bedke J, Kruck S. [Renal cell carcinoma - poorer prognosis in microvascular invasion]. *Aktuelle Urologie*. 2013;44(3):171-2.
18. Santiago-Agredano B, Alvarez-Kindelan J, Font-Ugalde P, Blanca-Pedregosa A, Lopez-Beltran A, Requena-Tapia MJ. Prognostic value of microvascular invasion in predicting survival in renal cell carcinoma. *Actas urologicas espanolas*. 2013;37(8):504-12.
19. Dall'Oglio MF, Antunes AA, Sarkis AS, Crippa A, Leite KR, Lucon AM, et al. Microvascular tumour invasion in renal cell carcinoma: the most important prognostic factor. *BJU international*. 2007;100(3):552-5.

20. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 1982;6(7):655-63.
21. Dutcher JP. Recent developments in the treatment of renal cell carcinoma. *Therapeutic advances in urology*. 2013;5(6):338-53.
22. Finn NA, Searles CD. Intracellular and Extracellular miRNAs in Regulation of Angiogenesis Signaling. *Current angiogenesis*. 2012;4(102):299-307.
23. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*. 1971;285(21):1182-6.
24. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2005;54(1):53-61.
25. Kramann R, Humphreys BD. Kidney pericytes: roles in regeneration and fibrosis. *Seminars in nephrology*. 2014;34(4):374-83.
26. Haagedoorn E, Oldhoff J, Bender W, Clarke W, Sleijfer DT. Oncologia básica para profissionais de saúde: Associação Paulista de Medicina; 2000.
27. Del Bufalo D, Ciuffreda L, Trisciuoglio D, Desideri M, Cognetti F, Zupi G, et al. Antiangiogenic potential of the Mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer research*. 2006;66(11):5549-54.
28. Alamdari FI, Rasmuson T, Grankvist K, Ljungberg B. Angiogenesis and other markers for prediction of survival in metastatic renal cell carcinoma. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 2007;41(1):5-9.
29. Patel PH, Chadalavada RS, Chaganti RS, Motzer RJ. Targeting von Hippel-Lindau pathway in renal cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(24):7215-20.
30. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American journal of physiology Cell physiology*. 2001;280(6):C1358-66.
31. Jockers R, Marullo S. Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics. *Wiley Online Library New York*; 2005.
32. Makihara N, Arimura K, Ago T, Tachibana M, Nishimura A, Nakamura K, et al. Involvement of platelet-derived growth factor receptor beta in fibrosis through extracellular matrix protein production after ischemic stroke. *Experimental neurology*. 2015;264:127-34.
33. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*. 2005;309(5740):1573-6.
34. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
35. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
36. Kaur IP, Chopra K, Rishi P, Puri S, Sharma G. Small RNAs: the qualified candidates for gene manipulation in diverse clinical pathologies. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2014;31(4):305-29.
37. Ricarte Filho JC, Kimura ET. [MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2006;50(6):1102-7.
38. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(5):376-85.
39. Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, et al. Distinct roles for Drosophila Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell*. 2004;117(1):69-81.
40. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
41. Sobin LH. TNM: evolution and relation to other prognostic factors. *Seminars in surgical oncology*. 2003;21(1):3-7.

42. Viana NI. O papel dos micro RNAs 143 e 145 e seus genes alvo na etiopatogenia da hiperplasia prostática benigna: Universidade de São Paulo; 2012.
43. Takahashi A, Sasaki H, Kim SJ, Tobisu K, Kakizoe T, Tsukamoto T, et al. Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis. *Cancer research*. 1994;54(15):4233-7.
44. Sakamoto S, Ryan AJ, Kyprianou N. Targeting vasculature in urologic tumors: mechanistic and therapeutic significance. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;103(3):691-708.
45. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76.
46. Schodel J, Grampp S, Maher ER, Moch H, Ratcliffe PJ, Russo P, et al. Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *European urology*. 2015.
47. Zhang C. MicroRNAs in vascular biology and vascular disease. *J Cardiovasc Transl Res*. 2010;3(3):235-40.
48. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Developmental cell*. 2008;15(2):272-84.
49. van Solingen C, Seghers L, Bijkerk R, Duijs JM, Roeten MK, van Oeveren-Rietdijk AM, et al. Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2009;13(8A):1577-85.
50. Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, et al. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2011;123(9):999-1009.
51. Roy S, Sen CK. miRNA in wound inflammation and angiogenesis. *Microcirculation*. 2012;19(3):224-32.
52. Li Y, Fan L, Liu S, Liu W, Zhang H, Zhou T, et al. The promotion of bone regeneration through positive regulation of angiogenic-osteogenic coupling using microRNA-26a. *Biomaterials*. 2013;34(21):5048-58.
53. Zaravinos A, Radojicic J, Lambrou GI, Volanis D, Delakas D, Stathopoulos EN, et al. Expression of miRNAs involved in angiogenesis, tumor cell proliferation, tumor suppressor inhibition, epithelial-mesenchymal transition and activation of metastasis in bladder cancer. *J Urol*. 2012;188(2):615-23.
54. Khella HW, White NM, Faragalla H, Gabril M, Boazak M, Dorian D, et al. Exploring the role of miRNAs in renal cell carcinoma progression and metastasis through bioinformatic and experimental analyses. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2012;33(1):131-40.
55. Frampton AE, Krell J, Jacob J, Stebbing J, Castellano L, Jiao LR. Loss of miR-126 is crucial to pancreatic cancer progression. *Expert review of anticancer therapy*. 2012;12(7):881-4.
56. Zhao C, Li Y, Zhang M, Yang Y, Chang L. miR-126 inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis of hepatocellular carcinoma cells partially by targeting Sox2. *Human cell*. 2015;28(2):91-9.
57. Lu C, Thaker PH, Lin YG, Spannuth W, Landen CN, Merritt WM, et al. Impact of vessel maturation on antiangiogenic therapy in ovarian cancer. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2008;198(4):477 e1-9; discussion e9-10.
58. Yamaguchi R, Yano H, Nakashima O, Akiba J, Nishida N, Kurogi M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C in human hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2006;21(1 Pt 1):152-60.
59. Djordjevic G, Mozetic V, Mozetic DV, Licul V, Ilijas KM, Mustac E, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear cell renal cell carcinoma. *Pathology, research and practice*. 2007;203(2):99-106.

60. Burgesser MV, Riva V, Ojeda SM, Munoz Morales D, Calafat P, Diller A. Expression of VEGF-A, HIF-1 A, CD34 and Ki67 in clear cell renal cell carcinomas and their relationship with conventional prognostic markers. *Revista de la Facultad de Ciencias Medicas*. 2014;71(1):7-15.
61. Ljungberg BJ, Jacobsen J, Rudolfsson SH, Lindh G, Grankvist K, Rasmuson T. Different vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-receptor 1 and -2 mRNA expression profiles between clear cell and papillary renal cell carcinoma. *BJU international*. 2006;98(3):661-7.
62. Abe DK. Análise da expressão dos genes CD105 (endoglina), VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no carcinoma de células renais e correlação com fatores prognósticos [Tese]. São Paulo

Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo; 2013.
63. Silva-Santos RM, Costa-Pinheiro P, Luis A, Antunes L, Lobo F, Oliveira J, et al. MicroRNA profile: a promising ancillary tool for accurate renal cell tumour diagnosis. *British journal of cancer*. 2013;109(10):2646-53.
64. Liu H, Brannon AR, Reddy AR, Alexe G, Seiler MW, Arreola A, et al. Identifying mRNA targets of microRNA dysregulated in cancer: with application to clear cell Renal Cell Carcinoma. *BMC systems biology*. 2010;4:51.
65. Katz B, Reis ST, Viana NI, Morais DR, Moura CM, Dip N, et al. Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *PloS one*. 2014;9(11):e113700.
66. Wang W, Qi L, Tan M, Zhang Z, Du J, Wei X, et al. Effect of platelet-derived growth factor-B on renal cell carcinoma growth and progression. *Urologic oncology*. 2015.
67. Qi LF, Sun D, Zheng JH, Du J, Yao X. [Detection and clinical significance of platelet derived growth factor-BB and microvessel density in clear cell renal cell carcinoma]. Zhonghua zhong liu za zhi [*Chinese journal of oncology*]. 2013;35(9):672-7.
68. Wotschofsky Z, Liep J, Meyer HA, Jung M, Wagner I, Disch AC, et al. Identification of metastamirs as metastasis-associated microRNAs in clear cell renal cell carcinomas. *International journal of biological sciences*. 2012;8(10):1363-74.
69. He H, Wang L, Zhou W, Zhang Z, Wang L, Xu S, et al. MicroRNA Expression Profiling in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Identification and Functional Validation of Key miRNAs. *PloS one*. 2015;10(5):e0125672.
70. Shahzad H, Kehar SI, Ali S, Tariq N. Expression of Von Hippel - Lindau (VHL) gene mutation in diagnosed cases of renal cell carcinoma. *Pakistan journal of medical sciences*. 2014;30(4):880-5.
71. Zhang T, Niu X, Liao L, Cho EA, Yang H. The contributions of HIF-target genes to tumor growth in RCC. *PloS one*. 2013;8(11):e80544.
72. Chow TF, Youssef YM, Lianidou E, Romaschin AD, Honey RJ, Stewart R, et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis. *Clinical biochemistry*. 2010;43(1-2):150-8.
73. Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, Svoboda M, Poprach A, Fabian P, et al. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *Journal of experimental & clinical cancer researc*h : CR. 2010;29:90.
74. Li PF, Chen SC, Xia T, Jiang XM, Shao YF, Xiao BX, et al. Non-coding RNAs and gastric cancer. *World journal of gastroenterology* : WJG. 2014;20(18):5411-9.
75. Chen S, Chen X, Xiu YL, Sun KX, Zhao Y. Inhibition of Ovarian Epithelial Carcinoma Tumorigenesis and Progression by microRNA 106b Mediated through the RhoC Pathway. *PloS one*. 2015;10(5):e0125714.
76. Villaamil VM, Gallego GA, Santamarina Cainzos I, Valladares-Ayerbes M, Anton Aparicio LM. Searching for Hif1-a interacting proteins in renal cell carcinoma. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. 2012;14(9):698-708.

77. Berghoff AS, Ilhan-Mutlu A, Dinhof C, Magerle M, Hackl M, Widhalm G, et al. Differential role of angiogenesis and tumour cell proliferation in brain metastases according to primary tumour type: analysis of 639 cases. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2015;41(2):e41-55.
78. Si T, Liu C, Xu K, Gui Y. [Association of miR-199a expression with clinicopathologic characteristics and prognosis of renal cell carcinoma]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 2012;32(11):1568-71.
79. He J, Jing Y, Li W, Qian X, Xu Q, Li FS, et al. Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis. *PloS one*. 2013;8(2):e56647.
80. Jia XQ, Cheng HQ, Qian X, Bian CX, Shi ZM, Zhang JP, et al. Lentivirus-mediated overexpression of microRNA-199a inhibits cell proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Cell biochemistry and biophysics*. 2012;62(1):237-44.
81. Huang J, Dong B, Zhang J, Kong W, Chen Y, Xue W, et al. miR-199a-3p inhibits hepatocyte growth factor/c-Met signaling in renal cancer carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(6):5833-43.
82. Morais DR, Reis ST, Viana N, Piantino CB, Massoco C, Moura C, et al. The involvement of miR-100 in bladder urothelial carcinogenesis changing the expression levels of mRNA and proteins of genes related to cell proliferation, survival, apoptosis and chromosomal stability. *Cancer cell international*. 2014;14(1):119.
83. Cui L, Zhou H, Zhao H, Zhou Y, Xu R, Xu X, et al. MicroRNA-99a induces G1-phase cell cycle arrest and suppresses tumorigenicity in renal cell carcinoma. *BMC cancer*. 2012;12:546.
84. Wang G, Chen L, Meng J, Chen M, Zhuang L, Zhang L. Overexpression of microRNA-100 predicts an unfavorable prognosis in renal cell carcinoma. *International urology and nephrology*. 2013;45(2):373-9.
85. Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sanudo A, Dall'Oglio MF, et al. MicroRNA-100 expression is independently related to biochemical recurrence of prostate cancer. *The Journal of urology*. 2011;185(3):1118-22.
86. Dip N, Reis ST, Timoszczuk LS, Viana NI, Piantino CB, Morais DR, et al. Stage, grade and behavior of bladder urothelial carcinoma defined by the microRNA expression profile. *The Journal of urology*. 2012;188(5):1951-6.

APÊNDICE

Resumos aceitos nos congressos:

- 30º Congresso Brasileiro de Patologia
- XXXV Congresso Brasileiro de Urologia
- 2016 Annual Meeting AUA

Título: **Perfil de expressão de genes e microRNAs relacionados a angiogênese no carcinoma renal de células claras**

Autores: Rita de Cássia Oliveira, Nayara I. Viana, Katia Leite, Vanessa Guimarães, Denis Reis Morais, Iran Silva, Caio Martins Moura, Alexandre Iscaife, Ruan Pimenta, Adriano Nesrallah, Miguel Srougi, William Nahas, Sabrina Reis

Introdução/Objetivos: A angiogênese é essencial para o crescimento do carcinoma renal das células claras (CRCC). Neste estudo, avaliamos a expressão de miRNAs, pequenos RNAs reguladores da expressão gênica e possíveis genes alvo associados à angiogênese em pacientes com CRCC.
Material e Métodos: Os miRNAs estudados foram: 99a, 106a, 106b, 126, 200b. Os genes foram: VEGFa, PDGF-B, mTOR, VHL, HIF1-α. Utilizamos amostras teciduais de 56 pacientes submetidos à nefrectomia. O grupo controle foram 5 pacientes com JUP. Para análise da expressão gênica, utilizamos a técnica de qRT-PCR. Os pacientes foram divididos nos grupos baixo, intermediário e alto considerando a Tríade Patológica (grau de Fuhrman, tamanho tumoral e invasão microvascular). Avaliamos também os fatores clínico patológicos isoladamente.
Resultados: A análise da expressão gênica mostrou subexpressão da maioria dos genes citados, exceto do VEGFa e PDGF. Comparamos a expressão dos genes com seus possíveis miRNAs reguladores, e vimos que o mTOR apresentou-se subexpresso enquanto miR99a apresentou-se superexpresso na maioria das amostras. Essa relação também ocorre entre VEGFa e miR126 e entre os miRNAs 106a e 106b sobre o gene VHL. Também vimos que a superexpressão do miR200b é associada aos pacientes de alto risco considerando a tríade patológica (p= 0,01) e a maior expressão do miR126 se dá em pacientes com menor grau de Fuhrman (I-II) (p=0,03).
Conclusão: Demonstramos uma regulação dos miRNAs 106a e 106b sobre o gene VHL, e do miRNA 99a sobre o gene mTOR; e a superexpressão do VEGFa pode ser explicada pela subexpressão do miRNA 126. O miRNA 200b foi relacionado com pacientes de alto risco e o miRNA 126 com pacientes com baixo grau de Fuhrman, sugerindo que estes miRNAs agirem como marcadores prognósticos do CRCC.

XXXV CONGRESSO BRASILEIRO UROLOGIA
31/OUT A 4/NOV DE 2015

CERTIFICADO
CERTIFICATE

Certificamos que

RITA DE CÁSSIA OLIVEIRA

participou do evento "XXXV Congresso Brasileiro de Urologia ", realizado de 31 de outubro a 04 de novembro de 2015, no SulAmérica Centro de Convenções em Rio de Janeiro/RJ.
Carga Horária: 33h20min

Rio de Janeiro, 04 de novembro de 2015

INICIATIVA
INITIATIVE

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA

Archimedes Nardozza Jr.
Comissão Organizadora do
XXXV Congresso Brasileiro de Urologia

Francisco Flávio Horta Bretas
Presidente da Comissão Científica do
XXXV Congresso Brasileiro de Urologia

Carlos Eduardo Corradi Fonseca
Presidente da Sociedade Brasileira de Urologia

16-6456

Angiogenesis related microRNAs and gene expression profile in renal cell carcinoma, clear cell type

Rita de Cássia Oliveira, Nayara Viana, Katia Leite, Vanessa Guimarães, José Pontes, Sao Paulo, Brazil, Renato Ivanovic, São Paulo, Brazil, Caio Moura, Sao Paulo, Brazil, Denis Reis, São Paulo, Brazil, Nelson Dip, William Nahas, Miguel Srougi, Sabrina Reis, Sao Paulo, Brazil*

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: There are more than 200,000 cases of renal cell carcinoma (RCC) each year in the world, accounting for approximately 2% of all cancers. RCC clear cell type (ccRCC) is the most common subtype of RCC and accounts for 75 to 80% of the cases with highest rates of local invasion, development of metastasis and mortality. New target therapy is based on antiangiogenic antibodies and molecules, changing the course of the disease, but the results so far are disappointing. Our aim is to study miRNAs and their target genes related to angiogenesis in ccRCC trying to bring some new knowledge to the molecular pathways related to the disease

METHODS: The expression levels of miRNAs miR-99a, 99b, 100; 199a; 106a; 106b; 29a; 29b; 29c; 126; 200a, 200b and their respective target genes: mTOR, HIF1-I±, VHL, PDGF, VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 were evaluated using qRT-PCR.in snap-frozen tumor tissue samples from 56 patients diagnosed with ccRCC and 5 samples of benign renal tissue as control. The results were related to tumor size, Fuhrman nuclear grade and microvascular invasion, considering the risk criteria proposed by Dall'Oglio et al. (2007).

RESULTS: We found an underexpression of the most genes except the VEGFA and PDGF, while the analysis of miRNAs showed underexpression only the miR 199a, 100 and 126. We compared the expression of genes with their possible regulatory miRNAs, and we found that mTOR was underexpressed while miR99a was overexpressed in most samples. This relationship also occurs between VEGFA and miR126 and between miRNAs 106a, 106b, and their target gene VHL. Considering the risk groups the overexpression of miR200b was associated with high-risk patients ($p = 0.01$) and the overexpression of miR126 was associated with lower Fuhrman grade (I-II) ($p = 0.03$).

CONCLUSIONS: Our results show that in ccRCC there is an unbalance in the expression of genes and miRNAs related to angiogenesis and cell proliferation and survival. Furthermore with our findings we can speculate the role of miR200b and miR126 in the prognostic of ccRCC. We believe that the relationship between miRNAs and their respective genes should be more profoundly searched as markers and possible therapeutic agents in this neoplasia.

Source of Funding: CNPq 440546/2014-1

ANEXO

Caso	Sexo	Idade	T.T. (cm)	IMV	GF	TNM	MD	Necr.	199a	100	99a	126	99b	29a	200b	29b	106a	106b	mtor	VEGFR1	VEGFR2	VEGFa	HIF1 a	PDGFD	VHL
R44	M	56	5,2	A	3	sem inf.	P	A	8,424	0,002	3,624	13,958	17,485	74,302	17,456	0,987	26,527	323,092	0,213	0,468	2,932	12,793	1,173	2,149	0,026
R45	M	72	12	P	2	pT3a, pNx,pM1	A	A	0,004	0,001	191,899	0,123	0,386	0,608					29,510	0,138	1,703	2,104	4,013	1,631	0,001
R82	F	50	11	A	2	pT2, pN0, pMx	A	A	0,016	0,000	3,176	1,414	0,137	0,929	69,150	4,310			0,062	4,077	1,088	0,652	1,718	0,838	0,015
R86	M	71	15	P	2	pT3b, pN0,pMx	P	P	0,328	0,001	5,199	0,393	11,837	0,038					0,027	1,443	0,010	0,637	1,632	1,548	11,467
R88	M	34	10	A	4	pT3, pN2,pM1	P	P	817,134	13,115	2,119	0,000	1,052	21,847	15,985	0,015	45,080	128,962	0,106	0,149	0,245	10,369	1,107	4,431	0,006
R89	M	56	5,5	A	2	pT1b, pNx,pMx	A	A	0,033	0,000	0,488	0,004	7,879	0,000		3,438	48,081	250,871	0,262	0,563	0,857	6,535	1,130	50,624	0,012
R111	M	46	9	P	2	pT2a, pNx,pMx	P	P	21,089	4,331	59,557	0,023	17,485	6,776	3,179	0,066	220,464	8491,478	1,161	1,247	0,672	4,330	5,555	7,396	0,012
R117	M	67	6	A	3	pT3, pNx,pMx	A	P	0,010	0,000	1,238	0,012	31,979	0,001	86,983	0,001	227,607	17,788	1,148	2,361	6,237	14,214	0,035	3,810	
R132	M	73	14	A	2	pT3a, pNx,pMx	P	A	0,029	0,191	56,111	2,444		140,686	186,195	1,036	679,533	1941,290	0,352	1,063	0,508	7,486	0,145	0,720	0,000
R149	F	76	4	A	4	pT3, pNx,pMx	A	A	0,657	0,009	2,085	0,169	0,913	1492,312	70,898	0,001	86,426	7,305	0,156	1,094	2,231	8,576	0,457	3,016	0,003
R150	F	63	7,9	A	4	pT3, pN1,pMx	P	P	0,080	0,000	2,419	0,326	12,837		3,911	4,583			0,409	0,788	2,067	14,433	2,230	5,528	429,764
R152	F	73	16	A	3	pT3a, pNx,pMx	A	P	0,013	0,000	0,305	0,079	4,096	0,001	4,120	0,229	118,390	6,547	0,242	0,956	0,475	6,387	0,842	2,599	0,002
R154	F	66	16	A	3	pT4, pNx,pMx	A	P	0,305	0,506	16374,917	0,139	0,216	7,892	1,832	0,274	11,619	93,300			1,003	3,756	0,634		0,059

Continuação...

Caso	Sexo	Idade	T.T. (cm)	IMV	GF	TNM	MD	Necr.	199a	100	99a	126	99b	29a	200b	29b	106a	106b	mtor	VEGFR1	VEGFR2	VEGFa	HIF1 a	PDGFD	VHL
R189	F	71	2,2	A	3	pT1a, pN0,pM0	A	A	0,004	0,152	37,225	0,024	3,083	86,662	2,913	13,274	10,603	30,207	0,246	1,011	2,326	13,457	0,486	1,341	0,000
R190	M	67	3	A	3	pT1a, pNx,pMx	A	A	55,540	131,891	32,180	0,000	1,102	5,511		0,712	32,254	34,008	0,001	0,144	0,489	10,044	0,173	0,808	
R199	F	63	4	A	2	pT3a, pNx,pMx	A	A	20,727	24444,123	286902,298	0,067	0,728	75037,978	91,181	0,670	106,035	145,593	0,161	0,954	0,299	11,090	0,179	0,455	0,000
R192	M	71	12,3	P	2	pT3a, pNx,pMx	P	A	1,180	0,001	1,225	0,107	3,100	5,515	3,760	0,470	103,781	39,473	0,056	0,033	0,301	5,713	0,184	0,973	0,003
R193	F	72	3,5	A	1	pT1a, pNx,pMx	A	A	0,081	0,055	2,513	0,201	1,646	0,011	1,240	0,268			0,011	0,007	0,153			1,748	0,005
R195	F	83	2,5	A	1	pT1a, pNx,pMx	A	A	0,081	0,055		0,201	1,646	0,011	1,240	26,937	9,927	188,550	0,063	1,174	2,842	10,449	0,310	1,777	0,001
R203	M	68	5	A	2	pT1b, pNx,pMx	A	A	0,056	0,001		0,178	3,854	33,529	5,414	0,011			0,234	0,499	0,144	2521,821	0,549	0,373	
R205	F	67	17	P	3	pT3a, pN1,pMx	A	P			0,922	2,946							0,138	2,186	0,139	2,207	0,795	4,331	0,000
R206	F	59	6,5	A	2	pT1b, pNx,pMx	A	P	96,364	1,612	150,456		163,619		30,967	7,303	207,706	143,092	0,043	0,814	0,672	2,775	0,184	0,804	0,001
R208	F	66	8	A	2	pT2a, pNx,pMx	A	A	276,173	0,148	3,643	13,958	16,361	0,843	4,236	0,032	41,424	5,270	0,145	1,032	1,778	4,357	1,046	0,299	0,001
R213	F	52	10	A	2	pT3a, pN0,pMx	A	P	14,265	4,870	34,636	3,345	133,085		4,215	0,061	70,983	61,172	6,009	17,599	0,546	73,478	1,633	14,947	0,005
R215	M	69	1,8	A	1	pT1a, pNx,pMx	A	A	0,001	0,458	24,816	0,094	2,377	22,790	13,065	1,893	29,969	27,527	0,459	0,645	2,538	5,185	0,704	10,665	7,177
R220	F	62	11,5	A	3	pT3a, pN0,pMx	A	P	0,002	0,000	1,255	0,957	45,829		0,039	5,527	25,500	320,415	0,212	0,439	0,952	3,517	2,106	2,396	0,003

Continuação...

Caso	Sexo	Idade	T.T. (cm)	IMV	GF	TNM	MD	Necr.	199a	100	99a	126	99b	29a	200b	29b	106a	106b	mtor	VEGFR1	VEGFR2	VEGFa	HIF1 a	PDGFD	VHL
R222	M	64	1,5	A	2	pT1a, pNx,pMx	A	A	0,000	0,000	8,672	0,644	10,959	0,007	3,614	4,066	11,427	22,205	0,030	1,026	0,198	9,384	1,820	1,594	0,001
R226	M	69	7	A	2	pT1b, pN0,pM0	A	A	1,664	0,005	6,737	0,059	1,436	0,320	62,805	4,616	8,068	215,369	0,049	2,545	1,856	14,941	6,201	1,826	0,042
R229	M	71	9	A	2	pT3a, pNx,pMx	A	A	0,001	0,000	0,147	0,859	1,070	13,254	34,599	0,549	60,564	28,125	0,574	0,752	2,762	14,503	0,194	10,330	0,002
R231	M	57	9	A	4	pT3a, pN1,pMx	P	P	0,129	4,733	21,469	0,101	5,630	0,051	111,869	3,079	161,725	256,675	0,155	0,098	13,976	0,057	0,716	0,457	0,005
R232	F	66	10	A	3	pT3a, pN0,pMx	A	A	16140,841	0,009	359143,281	0,049	2,286	17,176	0,609	8,726	8,985	6,558	0,177	0,006	0,014	0,459	0,418	2,628	0,001
R233	M	74	10,5	A	2	pT3b, pN0, pMx	P	A	349,568	0,609	4,467	0,522	102,836	3464,264	5,414	12,532	6,947	6,201	0,609	0,020	2,362	14,244	0,015	0,493	0,004
R235	M	64	5,5	A	2	pT1b, pNx,pM1	P	P	0,000	3,118	7,761	0,225	39,869	26,052	76,568	0,333	109,092	118,834	0,235	0,049	1,207	13,960	0,022	0,006	0,006
R245	M	60	12,5	P	4	pT3b, pNx,pMx	P	A	1,060	0,001	0,800	9,363	18,677	19,005	337,482	0,240	50,437	104,243	0,349	0,708	1,166	9,191	0,907	1,229	0,009
R246	M	61	10,5	A	2	pT4, pNx,pMx	A	P	6,947	0,007	8,068	6,212	6,089	0,203	10,858	0,018	11,372	50,696	0,130	0,140	0,450	12,894	0,225	0,253	0,088
R247	M	82	4,5	A	2	pT1a, pNx,pMx	A	A	1,923	0,002	1,505	0,966	9,897	0,001	39,360	5,367	221,998	350,386	0,303	2,033	6,288	5,933	3,118	1,280	0,001
R250	M	74	10	P	3	pT3a, pN0,pMx	A	P	0,009	0,005	2,090	0,818	1,592	0,104	35,597	1,271	81,935	12781,770	0,003	0,009	1,352	6,357	0,429	0,009	4,733
R254	F	56	4,3	A	3	pT1b, pNx,pMx	A	A	22,982	0,003	0,650	0,415	3,814	0,017	2,267	0,037	1,166	6,201	0,175	1,075	2,447	7,034	0,150	0,726	0,000

Continuação...

Caso	Sexo	Idade	T.T. (cm)	IMV	GF	TNM	MD	Necr.	199a	100	99a	126	99b	29a	200b	29b	106a	106b	mtor	VEGFR1	VEGFR2	VEGFa	HIF1 a	PDGFD	VHL
R255	M	46	6	A	2	pT3a, pN0,pMx	A	P	0,290	0,001	0,828	0,002	1,421	1,544	0,628	6,201	2,104	6,248	0,596	5,944	3,810	0,170	9,195	50,100	8,068
R183	F	59	5	A	2	pT1b, pNx,pMx	A	A	204,567	0,001	11,175	0,724	1,700	10,149	2,059	9,289	74,306	142,202	1,631	0,074	0,015	12,246	1,400	24,981	0,003
R196	M	82	4,5	A	2	pT1b, pNx,pMx	A	A	0,862	0,002	2,967	0,564	19,919	14,665	21,402	5,887	6,248	110,799	0,121	0,539	0,008	10,269	0,008	1,336	1,664
R198	M	46	2,5	A	3	pT1a, pNx,pMx	A	A	134,590	0,013	28,647	0,012	3,558	7592,363	2,447	0,071	6,947	0,288	0,014	0,174	0,041	3,702	1,052	5,933	4,692
R218	M	76	8	P	3	pT3a, pN1,pMx	A	A	0,288	0,001	7,276	0,450	1,808	2,266	2579,126	6,288	70,151	68,870	0,140	8,068	2,447	0,325	15,734	12,256	16,626
R238	M	69	2,5	A	2	pT1a, pNx,pM0	A	A	87,600	0,009	0,917	0,018	7,706	0,046	335,383	0,004	59,113	58,437	0,031	0,175	0,109	11,324	0,463	13,039	0,170
R258	F	64	3,2	A	1	pT1a, pNx,pMx	A	A	0,905	0,000	6,558	0,679	6,396	0,744	215,369	0,061	239,586	542,997	0,726	4,673	5,868	12,521	3,799	3,335	1,256
R261	M	54	4	A	2	pT1a, pNx,pMx	A	A	129,645	0,193	1,975	2,351	4,692	15,577	12,894	0,060	47,551	0,109	0,444	0,892	0,701	11,618	0,581	8,396	0,140
R262	M	46	5,8	A	3	pT1b, pN0,pM0	A	A	2,104	0,126	141,455	0,522	5,210	16,975	308,829	0,080	74,874	135,092	0,006	121,805	0,001	8,726	0,333	0,273	0,003
R266	M	72	10,7	A	4	pT3a, pN0,pM0	A	P	163,079	0,007	2,293	0,754	3,671	0,929	1,386	8,985	53,386	62,805	0,188	0,587	0,141	0,439	0,314	0,249	0,006
R269	M	63	12	A	4	pT4, pNx,pM1	P	P	26,694	0,004	2,601	0,338	4,647	13,826	2,777	1,725	36,641	69,061	0,399	1,706	0,718	10,521	1,229	2,717	0,001
R273	M	44	23,5	P	4	pT3a, pNx,pM0	A	P	2,176	6,201	14,665	0,628	1,664	1,400	1,386	2,845	6,201	153,256	2,104	6,527	25,846	6,248	1,305	9,651	4,861
R274	M	59	8,5	A	3	pT3a, pN0,pMx	A	P	0,023	0,000	0,170	0,008	5,231	0,140	0,003	121,805	8,068	6,947	1,256	6,019	0,102	5,670	0,091	3,389	0,978
R275	M	68	4,5	P	3	pT1b, pNx,pMx	A	P	219,858	0,001	0,138	0,338	19,227	5,519	26,185	6,429	170,355	20,891	0,284	0,227	0,713	8,068	0,483	3,103	0,001

Continuação...

Caso	Sexo	Idade	T.T. (cm)	IMV	GF	TNM	MD	Necr.	199a	100	99a	126	99b	29a	200b	29b	106a	106b	mtor	VEGFR1	VEGFR2	VEGFa	HIF1 a	PDGFD	VHL
R276	M	75	4,5	A	2	pT3a, pNx,pM0	A	A	144,350	0,032	0,364	1,157	1,454	0,158	20,846	2,511	47,518	33,055	0,379	0,375	0,142	0,363	2,981	0,972	3,993
R281	M	56	11,5	P	2	pT3a, pNx,pM1	P	P	121,805	0,000	27,939	0,376	4,463	0,006	1,664	6,261	21,402	0,015	0,416	0,300	0,300	0,740	1,130	0,338	4,065
R282	M	54	10	P	4	pT3a, pNx,pMx	A	P	12,256	2,845	26,694	215,369	6,248	0,288	87,600	9,155	2,447	170,355	0,073	1,256	0,628	2,021	0,325	0,519	0,003
R284	M	40	6,3	A	2	pT2a, pNx,pMx	A	A	135,151	0,226	196,747	0,856	427,328	170,355	108,961	6,001	678,592	2060,530	0,526	0,838	10,245	1,463	1,612	1,305	0,004

Obs: GF = Grau de Fuhrman; **T. T.** = Tamanho do Tumor; **MD** = Metástase à Distância; **Necr**= Necrose