EURICO CLETO RIBEIRO DE CAMPOS

**Análise do perfil de hipermetilação do gene PTEN e
correlação com fatores clínicos e anatomopatológicos no
carcinoma de células renais**

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

Programa de: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Campos, Eurico Cleto Ribeiro de

Análise do perfil de hipermetilação do gene PTEN e correlação com fatores clínicos e anatomopatológicos no carcinoma de células renais / Eurico Cleto Ribeiro de Campos. -- São Paulo, 2011.

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

Orientador: Ademar Lopes.

Descritores: 1.Neoplasias renais 2.Carcinoma de células renais 3.Prognóstico
4.PTEN fosfohidrolase 5.Metilação de DNA 6.Inativação gênica 7.Seguimento
8.Sobrevida.

USP/FM/DBD-156/11

Dedicatória

À Deus que a cada dia me fortalece e me concede a graça de ter uma família excepcional.

Agradecimentos

À Deus que ofereceu a mim e a meu irmão a oportunidade de crescermos em um ambiente de muito carinho, união familiar, amor e respeito às pessoas e que nos permitiu ir a busca de nossos ideais.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes a minha gratidão e admiração como amigo e cirurgião no atendimento exemplar ao paciente e que contribuíram enormemente para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares que acreditou no projeto desde o início e ofereceu todas as condições técnicas e humanas possíveis para sua realização e concretização.

Ao Prof. Dr. João Carlos Simões agradeço por toda a confiança depositada ao longo dos anos. Admiro muito sua obstinação oncológica, seu respeito e trato firme com o paciente, servindo de modelo a mim e aos médicos residentes.

A presença, a orientação e a disponibilidade do biólogo Rodrigo Crespo do laboratório de Patologia Molecular, foram fundamentais para o início e término do projeto. Sua capacidade profissional e o mais importante, sua amizade, serviram em todos os momentos de incentivo para a minha dedicação e compreensão do projeto.

À Prof. Dra. Dirce Carraro pelo interesse no estudo e permissão para o uso das estruturas do laboratório de Patologia Molecular.

À minha esposa Christiane pelo apoio incondicional em todos os momentos e compreensão silenciosa de minha ausência em etapas importantes da vida de nossos filhos.

A alegria, aos abraços, beijos e a companhia do meu filho Lucas e da pequena Clara, são o incentivo para a realização diária de minhas atividades e o retorno com muitas saudades ao nosso lar.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Rosely, que sempre estiveram presentes e se dedicam integralmente ao meu bem estar. Agradeço diariamente à Deus por suas presenças em minha vida.

Agradeço a Julio Ribeiro de Campos Neto, irmão e pai exemplar, por todos os excelentes momentos compartilhados desde a infância.

Aos meus avós (in memorian) agradeço pelos exemplos de honestidade, correção, resignação e humildade que fazem parte de mim e servirão de exemplo aos meus filhos.

À minha estimada madrinha Consuelo Souza Campos que sempre esteve presente ao meu lado e dedicou sua vida ao atendimento de meus avós.

À Sra. Marfiza Leffer por sua dedicação à família que culminou no bem estar de todos.

Ao Prof. Dr. Francisco Paulo da Fonseca, a minha admiração desde o período da graduação médica e pela amizade e oportunidades de pesquisa nos dias atuais.

Ao Prof. Dr. Luis Paulo Kowalski que me ofereceu a oportunidade de iniciar as atividades ambulatoriais e cirúrgicas na oncologia durante a graduação médica. Agradeço também por todos os ensinamentos teóricos e práticos alcançados durante residência médica e na pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Antônio Hugo Campos pelo pronto atendimento às necessidades do projeto e revisão histopatológica das amostras de tumores renais do banco de tumores.

À Sra. Suely Francisco e Francyne Pólen Gomes de Lima agradeço pela amizade, atenção e ajuda em todos os momentos da residência e pós-graduação. Admiro vocês e agradeço muito por nossas amizades.

À Cyntia Aparecida Osório que desde a residência médica tem sido uma grande amiga e contribuído para minhas conquistas profissionais.

À Aline Damascena que demonstrou durante a análise estatística do estudo ser uma pessoa muito atenciosa, criteriosa e dedicada.

A todos do Departamento de Cirurgia Pélvica que sempre me trataram com muito carinho e respeito, permitindo que amizades fossem ali construídas.

Ao Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital A.C.Camargo pela disponibilidade e atendimento às solicitações durante o período inicial e de coleta dos dados.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP por acreditar na importância deste projeto e financiar sua execução.

Normalização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por 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 figuras e gráficos	ix
Lista de quadros	x
Lista de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas	xii
Resumo.....	xiv
Summary	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Carcinoma de células renais	2
1.1.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos.....	2
1.1.2 Aspectos terapêuticos	4
1.1.3 Fatores prognósticos.....	10
1.2 O gene PTEN e o Carcinoma de Células Renais	14
1.3 Hipermetilação do DNA.....	18
2 JUSTIFICATIVA DO PROJETO	24
3 OBJETIVOS	27
4 CASUÍSTICA e MÉTODOS	29
4.1 Critérios de inclusão	30
4.2 Critérios de exclusão	30
4.3 Metodologia	31
4.3.1 Microdissecção das amostras e extração do DNA	31
4.3.2 Protocolo de tratamento com bissulfito de sódio	32
4.3.3 Pirosequenciamento	34
4.3.4 Critérios de análise do perfil de metilação	38
4.3.5 Protocolo de acompanhamento	40
4.4 Variáveis do estudo	41

4.5	Situação clínica ao final do estudo	49
4.6	Sobrevida Global e Livre de Doença	50
4.7	Análise estatística	51
4.8	Aspectos éticos	52
5	RESULTADOS.....	53
5.1	Análise univariada da sobrevida global e livre de doença	54
5.2	Modelo Múltiplo	57
5.2.1	Sobrevida global considerando o estadiamento	59
5.2.2	Sobrevida livre de doença considerando o estadiamento	60
5.2.3	Adequação dos modelos ajustados	61
5.3	Análise da associação do perfil de metilação do PTEN com os principais fatores prognósticos	61
5.4	Análise do impacto da hipermetilação do PTEN nas taxas de sobrevida global e livre de doença.....	63
6	DISCUSSÃO.....	64
7	CONCLUSÕES	94
8	ANEXOS	96
9	REFERÊNCIAS	106

Apêndice

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Demonstração das principais vias de sinalização celular mediadas pelo VEGF, HIF e m-Tor e alvos de terapias moleculares.....	9
Figura 2	Demonstração do mecanismo de ação do gene supressor tumoral PTEN.....	16
Figura 3	Demonstração do processo de metilação na região promotora do gene.....	18
Figura 4	PCR com gene beta-actina após tratamento com bissulfito de sódio nas primeiras 20 amostras.....	33
Figura 5	Demonstração do processo enzimático da reação de pirosequenciamento.....	35
Figura 6	Demonstração da sequencia genômica do PTEN.....	36
Figura 7	Piogramas de incorporação de nucleotídeos T nas ilhas CpGs para os primers ADS955FS1 e ADS955FS2.....	40
Figura 8	Demonstração da ausência de hipermetilação nas ilhas CpG.....	48
Figura 9	Demonstração da presença de hipermetilação em todas as ilhas CpG.....	49
Gráfico 1	Estimador Kaplan-Meier para os tempos de sobrevida global e livre de doença.....	56
Gráfico 2	Estimador Kaplan-Meier para os tempos de sobrevida global (A) e livre de doença (B), de acordo com a metilação do PTEN.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Evolução do tratamento do câncer renal metastático.....	7
Quadro 2	Sequência de iniciadores para amplificação do gene β -actina após tratamento de bissulfito.....	33
Quadro 3	Primers FS1 e FS2 e sequências de análise e após a leitura do DNA.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sobrevida global e sobrevida livre de doença em 5 anos segundo as variáveis epidemiológicas.....	54
Tabela 2	Sobrevida global e sobrevida livre de doença em 5 anos segundo as variáveis clínicas.....	55
Tabela 3	Sobrevida global e sobrevida livre de doença em 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas.....	55
Tabela 4	Resultados do ajuste do modelo para a sobrevida global (considerando o estadiamento).....	59
Tabela 5	Resultados do ajuste do modelo para a sobrevida livre de doença (considerando o estadiamento).....	61
Tabela 6	Associação do perfil de metilação do PTEN com as variáveis epidemiológicas e clínicas.....	62
Tabela 7	Associação do perfil de metilação do PTEN com as variáveis anatomopatológicas.....	62
Tabela 8	Principais estudos na avaliação do perfil de hipermetilação do PTEN em diferentes tipos neoplásicos	87

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	protein kinase B
ASA	American Society of Anesthesiology
CCR	carcinoma de células renais
DNMT	DNA metiltransferases
ECOG	Eastern Cooperative Oncologic Group
Enos	endothelial nitric oxide synthase
FISH	fluorescence in situ hybridization
GBM	glioblastoma multiforme
HIF 1	Fator induzível por hypoxia tipo 1 (do inglês Hypoxia Inducible Factor)
HIF-α	Fator induzível por hypoxia tipo 1-subunidade α (do inglês Hypoxia Inducible Factor)
IIQ	imunoistoquímica
IRA	insuficiência renal aguda
IRC	insuficiência renal crônica
IVM	invasão venosa microscópica
mTor	Mamalian Target of rapamicin
NP	nefrectomia parcial
NR	nefrectomia radical
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia (do inglês polymerase chain reaction)
PTEN	phosphatase with tensin homology deleted in chromosome 10
PI3K	phosphatidylinositol 3-OH kinase
PI-3,4,5-P3	phosphatidyl 3,4,5 – triphosphatase
PS	performance status
RTQ	receptor tirosino quinase
SG	sobrevida global
SLD	sobrevida livre de doença

TGF-α	Fator α Transformador de Crescimento (do inglês Transforming Growing α Factor)
TMA	tissue microarray
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (do inglês Vascular Endotelial Growing Factor)
VHL	von-Hipell Lindau
UICC	International Union Against Cancer

RESUMO

Campos ECR. *Análise do perfil de hipermetilação do gene PTEN e correlação com fatores clínicos e anatomopatológicos no carcinoma de células renais*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Introdução: Apesar da identificação de fatores prognósticos clínicos e patológicos, muitos pacientes portadores de carcinoma de células renais (CCR) apresentam metástases ao diagnóstico e outros irão desenvolver recorrência local ou à distância durante o seguimento. Novos fatores prognósticos e de origem molecular têm sido avaliados no CCR, destacando-se o PTEN como um dos principais genes envolvidos na carcinogênese renal. **Objetivos:** Avaliar os fatores clínicos e anatomopatológicos mais significativos nas taxas de sobrevida, identificar a frequência de hipermetilação do gene PTEN através da técnica do pirosequenciamento, o impacto da hipermetilação do gene nas taxas de sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD), como também, a associação da presença de hipermetilação com os principais fatores prognósticos. **Material e métodos:** Foram avaliados 137 pacientes portadores de CCR submetidos a tratamento cirúrgico do tumor primário entre 1997 e 2009. Foram considerados os dados epidemiológicos, clínicos, anatomopatológicos, de estadiamento (TNM 2004) e os obtidos da reação de pirosequenciamento. **Resultados:** O tempo de seguimento médio foi de 32,3 meses e mediana de 28,8 meses. Considerando o estadiamento clínico, foram fatores independentes para a SG: idade ($p<0,01$), ASA ($p=0,02$), margens cirúrgicas ($p=0,04$), grau de Fuhrman ($p=0,01$), estágio clínico ($p<0,001$) e subtipo histológico ($p<0,01$). No modelo múltiplo a SLD foi influenciada unicamente pelo estágio clínico ($p<0,001$). Dos 137 casos analisados, hipermetilação do gene foi detectada em cinco casos (3,6%). Devido a baixa frequência detectada optou-se por não realizar a associação da metilação do PTEN com os fatores prognósticos. Em relação às taxas de SG e SLD, de acordo com o perfil de hipermetilação do PTEN, não houve a ocorrência de nenhum evento, ou seja, morte, morte por CCR ou recorrência da doença para os cinco casos que apresentavam hipermetilação. **Conclusões:** A hipermetilação do

PTEN foi detectada com baixa frequência, sugerindo a participação de outros genes ou mecanismos moleculares diferentes da metilação na inativação deste gene frequentemente envolvido na carcinogênese renal. As taxas de sobrevida não foram influenciadas pelo perfil de hipermetilação do PTEN, permanecendo o estadiamento clínico do TNM como a principal variável determinante da evolução e do risco de recidiva pelo CCR.

Descritores: 1. Neoplasias renais, 2. Carcinoma de células renais, 3. Prognóstico, 4. PTEN fosfohidrolase, 5. Metilação de DNA, 6. Inativação gênica, 7. Seguimento, 8. Sobrevida.

SUMMARY

Campos ECR. *Analysis of hypermethylation profile of PTEN gene and correlation with clinical and pathological findings in renal cell carcinoma*. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

Introduction: Despite the identification of clinical and pathological prognostic factors, many patients with renal cell carcinoma (RCC) have metastases at diagnosis and others will develop local or distant recurrence during follow-up. New prognostic factors and of molecular origin have been evaluated in RCC, highlighting PTEN, one of the main genes involved in renal carcinogenesis. **Objetives:** To assess the most significant clinical and pathological factors in survival rates, and identify the frequency of hypermethylation of the PTEN gene by the pyrosequencing technique, the impact of gene hypermethylation on overall survival (OS) rates and disease free interval (DFS), as well as associating presence of hypermethylation with main prognostic factors. **Methods:** We evaluated 137 patients with RCC that underwent surgical treatment of primary tumor between 1997 and 2009. We considered the epidemiological, clinical, pathological, staging (TNM 2004) data and those obtained from pyrosequencing. **Results:** Mean follow-up was of 32.3 months and the median of 28.8 months. Considering the clinical TNM stage, the OS was influenced in the multiple model by age ($p < 0.01$), ASA ($p = 0.02$), surgical margins ($p = 0.04$), Fuhrman's grade ($p = 0.01$), clinical stage ($p < 0.001$) and cell subtype ($p < 0.01$). DFS were influenced in multivariate analysis only by presence of clinical stage ($p < 0.001$). Of the 137 cases examined, gene hypermethylation was detected in five cases (3,6%). Because of this low frequency perceived, we elected not to carry out the association of PTEN methylation with prognostic factors. Regarding OS and DFS rates, according to the hypermethylation of PTEN profile, no event occurred, that is to say death, death from RCC or disease recurrence in the five cases with hypermethylation. **Conclusions:** Hypermethylation of PTEN was detected with low frequency suggesting involvement of other genes or different molecular mechanisms of methylation upon inactivation of this gene, frequently involved in renal

carcinogenesis. Survival rates were not influenced by the hypermethylation of PTEN profile, with clinical TNM staging remaining as the main determinant for development and risk of RCC recurrence.

Descriptors: 1. Renal neoplasm, 2. Renal cell carcinoma, 3. Prognosis, 4. PTEN Phosphatase, 5. DNA methylation, 6. Genic inactivation, 7. Follow-up, 8. Survival.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de Células Renais

1.1.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos

O carcinoma de células renais (CCR) corresponde a 3% das neoplasias em pacientes adultos. Entre as neoplasias urológicas é a terceira mais freqüente, porém, é a primeira em mortalidade (Godley e Ataga 2000; Garcia et al., 2009). Para o ano de 2010 foram estimados 58.240 novos casos de carcinoma de células renais nos Estados Unidos da América (EUA) com cerca de 13.040 mortes, configurando entre as dez neoplasias mais freqüentes. No Brasil não dispomos de estatística oficial para o CCR.

Apesar da maior frequência de tumores renais pequenos e assintomáticos diagnosticados mediante a realização rotineira de exames complementares e consequente aumento nas taxas de sobrevida, houve também aumento na mortalidade pelo CCR.

A maior mortalidade por CCR seria decorrente do diagnóstico de neoplasias em estágio avançado, como também, pela evolução incerta das neoplasias renais que mesmo pequenas e assintomáticas ao diagnóstico evoluem com metástases durante o seguimento (Kirkali e Obek 2003; Volpe e Jewwet 2005; Liptworth et al., 2006; Garcia et. al., 2009).

Predominam casos esporádicos e não associados a síndromes hereditárias, acometendo preferencialmente pacientes do sexo masculino com idade entre 50 e 70

anos. Nas formas hereditárias, que correspondem a até 5% dos casos, o diagnóstico é mais precoce e geralmente ao redor dos 40 anos (Volpe e Jewwet 2005).

Entre as formas hereditárias de apresentação do CCR destaca-se a Síndrome de Von Hippel Lindau (VHL) como a mais frequente, cuja caracterização molecular demonstrada pela inativação do gene supressor tumoral VHL tem contribuído para o desenvolvimento de novas terapias no tratamento do CCR esporádico (Mulders 2009).

Diferentes fatores de risco têm sido implicados no desenvolvimento do CCR, destacando-se o tabagismo, a obesidade e a hipertensão arterial como os principais fatores e presentes em até 50% dos casos (Kirkali e Obek 2003).

Mais de 60% dos casos de CCR são assintomáticos e descobertos incidentalmente através de exames de imagem. Estes casos apresentam melhores prognósticos, pois, em mais de 85% dos casos a doença está localizada, quando comparados a 40-45% na presença de sintomatologia. Quando presentes, os sintomas mais frequentes são: hematúria (40-60%), dor lombar (40%) e massa palpável (30%) e são determinantes de menores taxas de sobrevida (Harada et al., 2006; Karakiewicz et al., 2006).

A tríade clássica de dor, massa palpável e hematúria, tão freqüente no passado, atualmente não ultrapassa a 10% dos casos em decorrência do diagnóstico precoce e incidental. Sintomas constitucionais como febre, emagrecimento e fadiga, estão mais associados à doença avançada localmente e metastática (Kirkali e Obek 2003).

1.1.2 Aspectos terapêuticos

A cirurgia é a única modalidade terapêutica potencialmente curativa no CCR, destacando-se a nefrectomia radical e parcial. A nefrectomia radical, preconizada por Robson et al. (1969), consistiu no tratamento principal do CCR e envolve a remoção do rim envolto pela gordura peri-renal, glândula supra-renal e linfonodos do hilo renal.

Inicialmente, os procedimentos parciais eram indicados no tratamento cirúrgico dos pacientes portadores de insuficiência renal crônica, rim único, ou doença bilateral. Com os avanços no conhecimento da biologia tumoral renal, nas técnicas de estadiamento pré-operatórias e do modo de apresentação do CCR, a nefrectomia parcial passou também a ser indicada aos pacientes com bom performance status e rim contralateral normal com resultados similares a nefrectomia radical e maior preservação da função renal em relação ao procedimento radical (Uzzo e Novick et al., 2001; Lam et al., 2006).

Recentemente, outros procedimentos poupadores de néfrons e representados principalmente pela crioterapia e radiofrequência, foram incorporados no tratamento de pacientes portadores de comorbidades que limitassem o tratamento cirúrgico radical, nefropatias ou do CCR hereditário em que há maior tendência à bilateralidade e multifocalidade (Abreu e Gill 2003; Van Poppel et al., 2007; Mouraviev et al., 2007).

Devido ao crescimento lento e baixo índice de metástases de nódulos renais descobertos incidentalmente e de pequenas dimensões, alguns autores tem proposto a observação ativa destes nódulos em pacientes idosos ou com contraindicações ao tratamento cirúrgico. Nestes casos, torna-se importante a identificação dos pacientes

de baixo risco para progressão e ocorrência de metástases, considerando-se as características dos nódulos aos exames de imagem e sugerindo também a análise das características patológicas e moleculares à biópsia renal (Rathmell et al., 2005; Volpe e Jewwett 2005).

A biópsia percutânea de nódulos renais tem ressurgido como uma nova abordagem do CCR, permitindo o diagnóstico de lesões renais sem indicação de tratamento cirúrgico e melhor caracterização molecular e imunoistoquímica (IIQ) de pequenas massas renais, que em 10% dos casos apresentam alto grau histológico e comportamento biológico agressivo. A acurácia é superior a 90% na avaliação de malignidade e determinação do tipo histológico, com índices de falso negativos e complicações inferiores a 5% e 1%, respectivamente (Volpe et al., 2006; Wang et al., 2008).

No tratamento do CCR não há terapias adjuvantes ou neoadjuvantes efetivas. Futuramente, a obtenção de informações em nível molecular de neoplasias renais, poderá permitir oferecer tratamentos neoadjuvantes baseados nas alterações moleculares às neoplasias avançadas localmente e não passíveis de ressecção com margens adequadas, assim como, adjuvância às neoplasias de pior prognóstico e elevado risco para recorrência local e à distância.

Na presença de doença metastática, a imunoterapia baseada em altas doses de α interferon ou de interleucina 2, foram durante anos consideradas as terapias mais efetivas, mas sem produzir respostas longas ou superiores a 22%, além da elevada toxicidade (Heng et al., 2009). Nos casos de metástase única e principalmente de sítio pulmonar, a cirurgia pode ser empregada com intenção curativa.

A partir de 2001, Flanigan et al. (2001) demonstraram que a associação de nefrectomia citorrredutora combinada à imunoterapia no pós operatório promovia ganhos superiores a 50% nas taxas de sobrevida em relação à imunoterapia isolada, para aqueles pacientes com bom performance status e portadores de metástases à distância, excluindo as metástases cerebrais ou hepáticas que limitavam a complementação do tratamento após a cirurgia, tornando-se o tratamento padrão do CCR metastático.

Em 2006, novos tratamentos conhecidos como inibidores de alvos moleculares foram inseridos no manejo do CCR metastático através de conhecimentos biomoleculares obtidos da doença de Von Hippel Lindau. Nesta síndrome, mutações germinativas do gene VHL promovem o acúmulo de HIF-1 (*Hipoxic induction factor*), que é um potente estimulador da angiogênese tumoral (Mulders 2009).

A ativação do HIF 1 (*Hipoxic induction factor*) ocorre por um mecanismo de inibição da ubiquitinação, assim como, pela ação do VEGF (*vascular endotelial grow factor*), moléculas estas estimuladoras da angiogênese e inibidoras da apoptose celular (Lam et al., 2005; Heng et al., 2009). O Quadro 1 demonstra a evolução no tratamento do CCR metastático.

Quadro 1. Evolução no tratamento do CCR metastático.

AUTOR	TRATAMENTO	N	RESULTADO
Mickisch et al., (2001)	Nefrectomia + IFN- α X IFN- α	85	Respostas 19% versus 12%, sobrevida 17 X 7 meses (p=0,03)
Yang et al., (2003)	Alta dose de IL-2 X baixa dose	283	Respostas de 21% versus 11%, sem benefícios na sobrevida global
Escudier et al., (2005)	Sorafenib X placebo, pacientes que receberam terapias prévias	903	TPP 5,5 versus 2,8 meses (p<0,001)
Motzer et al., (2006a)	Sunitinib (pacientes com progressão da doença com imunoterapia)	63	Taxas de resposta de 40%, TPP de 8,2 meses
Motzer et al., (2006b)	Sunitinib (1ª linha no CCR metastático) versus IFN- α	750	Taxas de resposta de 31% versus 6%, TPP 11,1 versus 5 meses (p<0,001)

Legendas: IFN – Interferon α , IL-2 – Interleucina 2, TPP – Tempo para progressão.

No tratamento do CCR avançado, a terapia de alvo molecular pode agir por dois mecanismos distintos: através da inibição da angiogênese e bloqueio do VEGF, mediante ação dos medicamentos sunitib e sorafenib ou por uma ação mais específica e inibidora da proteína m-Tor através do tensirolimus e everolimus.

O sunitinib e sorafenib atuam através da inibição dos receptores do tipo tirosino quinases com atividade para o VEGF, que são receptores transmembrana localizados na membrana plasmática e portadores de domínios intra e extracelulares, que quando ativados desencadeiam toda uma cascata de sinalização intracelular com atividade final de transcrição junto ao núcleo celular (Mulders 2009).

Assim, o VHL/HIF-1 e, principalmente, o VEGF se tornaram uma das principais vias da carcinogênese renal e alvo de terapia de alvos moleculares,

tornando-se o tratamento de primeira linha do CCR metastático (Bellmunt et al., 2009; Di Lorenzo et al., 2009). Os dois medicamentos são igualmente efetivos, não havendo estudos que demonstrem a superioridade de um em relação ao outro.

Outra via molecular envolvida na progressão tumoral renal é decorrente da inativação do gene supressor tumoral PTEN, que age por um mecanismo de "down regulation" do PI3K (*phosphatidylinositol 3-OH kinase*) e de seu produto, o PI-3,4,5-P3 (*phosphatidyl 3,4,5 – triphosphatase*) que são importantes no estímulo da proliferação e sobrevivência celular, resultando na formação de outras proteínas efetoras/sinalizadoras do ciclo celular, que são as proteínas Akt e m-Tor (Samuels e Ericson 2006; Gericke et al., 2006).

O temsirolimus e o everolimus são medicamentos análogos da rapamicina, substância que ativa o sistema de ubiquitinação intracelular e forma um complexo protéico de degradação de moléculas estimuladoras do ciclo celular e da angiogênese, resultando na inibição da atividade quinase da proteína m-Tor. Os inibidores da m-Tor são mais eficazes em pacientes de pior prognóstico e portadores do subtipo histológico de células claras, constituindo o tratamento de terceira linha do CCR metastático (Mulders 2009).

Fonte: Modificado de MULDER (2009).

Legendas: Akt: proteína quinase B; HIF- α : Fator induzível por hypoxia tipo 1-subunidade α (do inglês Hypoxia Inducible Factor), m-Tor: Mamalian Target of rapamicin, VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular (do inglês Vascular Endothelial Growing Factor).

Ação de diferentes vias que estimulam a proliferação, crescimento celular e resistência a apoptose. O Bevacizumab liga-se ao VEGF circulante, enquanto o Sunitinib e Sorafenib inibem o receptor tirosino quinase com atividade para o VEGF. Temsirolimus e everolimus atuam na inibição da proteína m-Tor.

Figura 1. Terapias de alvos moleculares e respectivos sítios de ação no CCR.

Apesar dos inibidores de alvos moleculares serem o tratamento padrão do CCR metastático, ainda é desconhecido o papel da nefrectomia citorrredutora e o uso destes medicamentos.

Warren et al. (2009) demonstraram maiores taxas de sobrevida global para os pacientes submetidos à nefrectomia citorrredutora anterior ao uso do inibidor de alvo molecular quando comparado ao uso de imunoterapia, porém, além de ser um estudo

retrospectivo, os grupos eram heterogêneos e pouco comparáveis, pois, predominaram pacientes com melhor performance status no grupo que recebeu ITK e por ser um tratamento mais recente, os pacientes tratados com imunoterapia constituem um grupo histórico de tratamento e não beneficiados pelos avanços ocorridos no tratamento do câncer renal.

Novas drogas, assim como estratégias de combinar os inibidores de alvo moleculares ou utilizá-los de maneira sequencial considerando sua eficácia e perfis de toxicidade têm sido empregados, objetivando melhorar os resultados no tratamento do CCR metastático.

1.1.3 Fatores prognósticos

Os principais fatores prognósticos e determinantes do tratamento, evolução e sobrevida dos pacientes são: estadiamento clínico patológico, grau histológico (Fuhrman), PS (performance-status) e em alguns estudos o subtipo histológico (Uno et al., 2004; Lam et al., 2005; Lam et al., 2007).

O estadiamento clínico patológico é o principal fator prognóstico no tratamento do CCR. Há duas classificações utilizadas no estadiamento do CCR: o TNM modificado em 2004 (Sobin e Wittekind 2004) e a classificação de Robson proposta inicialmente em 1969 (Robson et al., 1969). Apesar da classificação de Robson ter como vantagem a sua praticidade, apresenta limitações por incluir no mesmo estágio tumores de prognósticos e condutas diferentes.

A classificação TNM é mais utilizada no estadiamento do CCR e através de critérios anatômicos, faz uma avaliação do tamanho do tumor primário (T), extensão de doença linfonodal (N) e presença ou ausência de metástases (M) classificando os pacientes em quatro estádios (Anexo A).

O tamanho tumoral é um dos principais componentes do estadiamento, devendo ser mais considerado nos tumores localizados (EC I e II TNM), em que não há outros fatores de pior prognóstico associados como invasão de glândula adrenal, linfonodos positivos ou invasão vascular macroscópica.

A presença de doença linfonodal histologicamente positiva (pN+) ou metastática (M1) é determinante de pior prognóstico. Cerca de 2 a 10% dos pacientes apresentam linfonodos positivos, resultando em taxas de sobrevida que variam de 11 a 35% (Karakiewicz 2007; Lam et al., 2009).

Apesar do impacto negativo nas taxas de sobrevida decorrente da presença de linfonodos histologicamente positivos, a linfadenectomia no CCR apresenta maior valor no estadiamento do que terapêutica, pois, mesmo com a remoção dos linfonodos comprometidos, outros fatores prognósticos e determinantes de pior evolução estão presentes e contribuem para as baixas taxas de sobrevida observadas nestes pacientes (Delacroix e Wood. 2009).

A sobrevida dos pacientes portadores de metástases à distância raramente ultrapassa 10% em 5 anos (Kim et al., 2003). O performance status, o intervalo livre de doença entre a data da cirurgia e o aparecimento da metástase, número e sítio metastáticos, são os principais fatores determinantes da sobrevida de pacientes metastáticos (Kontak e Campbell 2003). Os melhores resultados são observados entre os pacientes portadores de metástase única, sítio pulmonar e completamente ressecada.

Diferentes estudos demonstram que o estágio TNM é o principal fator prognóstico no CCR (Lam et al., 2005; Garcia et al., 2009; Lam et al., 2009; Volpe e Patard 2010).

O grau histológico de Fuhrman é um dos principais fatores prognósticos, conjuntamente com o estadiamento TNM. Faz uma avaliação do tamanho, formato e conteúdo do núcleo e nucléolo. Varia de grau um a quatro conforme aumentam as desproporções entre célula e núcleo e surgem irregularidades no formato e conteúdo celular (Furhman et al., 1982) (Anexo B).

Fuhrman et al. (1982) demonstraram diferentes taxas de sobrevida entre os graus 1, 2, 3 e 4 sendo, respectivamente, de 64%, 34%, 31% e 10%. Recentemente, a análise do grau histológico em baixo grau (graus 1 e 2) ou alto grau (graus 3 e 4) ou na forma de graus 1 e 2 versus 3 versus 4 têm demonstrado valor prognóstico similar à descrição inicial composta por quatro graus (Hsu et al., 2004; Jain et al., 2009).

As classificações de Karnofski e ECOG (Anexo C) são as principais escalas na avaliação do performance status de pacientes portadores de CCR e fazem uma avaliação do impacto que a neoplasia causa na saúde global dos pacientes. O ECOG, descrito inicialmente em 1982, se tornou a classificação mais utilizada como parte integral de avaliação dos pacientes por ser composta unicamente por cinco itens e apresenta menor complexidade em relação ao Karnofski, que utiliza-se de valores entre 0 e 100%.

Em pacientes portadores de CCR metastático é o principal fator prognóstico, pois, selecionam quais pacientes serão beneficiados de tratamento cirúrgico, imunoterápico ou ensaios clínicos (Uno et al., 2004; Lam et al., 2009).

Recentemente, a classificação do ASA (do inglês, American Society Anesthesiologists) têm sido utilizada por algumas instituições com valor prognóstico similar ao ECOG (Teloken et al., 2009; Zequi et al., 2010) (Anexo D). Essa escala, muito utilizada pelos anesthesiologistas no pré-operatório para estimar o risco

cirúrgico, estratifica os pacientes em cinco categorias de acordo com a presença ou ausência de comorbidades. Para Gabr et al. (2009), o prognóstico dos pacientes portadores de CCR é melhor avaliado com a combinação de fatores patológicos a outros fatores como a idade e comorbidades presentes na escala do ASA.

O impacto do subtipo histológico nas sobrevidas dos pacientes portadores de CCR é controverso. Os subtipos histológicos de células claras, papilífero e cromóforo são os mais frequentes e presentes em 70 a 80%, 10 a 20% e 5%, respectivamente. Cada subtipo histológico apresenta características próprias histológicas e citogenéticas, resultando em prognósticos e evoluções distintas (Cheville et al., 2006).

O subtipo de células claras e a variante sarcomatóide estão mais frequentemente associados a tumores de alto grau histológico, estágio clínico avançado e menores taxas de sobrevida (Teloken et al., 2009).

Alguns parâmetros biológicos como: hemoglobina, desidrogenase láctica e cálcio sérico têm sido utilizados na avaliação do CCR, mas seu valor prognóstico permanece indefinido. Motzer et al. (2009) utilizaram estes parâmetros na composição de um nomograma com a finalidade de prever a sobrevida média de pacientes portadores de CCR metastático e submetidos a tratamento com sunitib.

Atualmente, o prognóstico de pacientes portadores de CCR submetidos a tratamento cirúrgico é avaliado através de nomogramas, onde os principais fatores prognósticos e outros fatores, definidos de acordo com a instituição em que foi elaborado são agrupados, permitindo que estimativas das taxas de sobrevida e de recorrência sejam obtidas selecionando quais os pacientes de maior risco para recorrência e morte pelo CCR, permitindo definir estratégias de seguimento

ambulatorial e participação em ensaios clínicos (Motzer et al., 1999; Kattan et al., 2001; Zysman et al., 2001; Frank et al., 2002).

Mesmo assim, muitos pacientes portadores de CCR localizado e localmente avançado desenvolvem metástases, justificando a busca de novos fatores e acredita-se serem de origem molecular para que o risco de metástase e recorrência possa ser mais bem avaliado e permita selecionar os pacientes para os tratamentos baseados nas alterações moleculares presentes.

Novos métodos baseados em arrays de DNA, RNA e TMAs (Tissue Microarray) têm permitido testar milhares de genes e proteínas quanto ao potencial prognóstico no CCR. Entre os principais marcadores moleculares analisados no CCR, destacam-se aqueles relacionados à proliferação celular (Ki-67, MIB-1), ao controle do ciclo celular (p53, Akt, Bcl-2, PTEN, p27, p21), adesão celular (E-caderina, EpCAM, caderina-6), hipóxia (CA IX, HIF, VEGF) e mistos (vimentina, CD 44, gelsolina e VEGFR) (Lam et al., 2005; Lam et al., 2009).

1.2 O Gene PTEN e o Carcinoma de Células Renais

O *phosphatase with tensin homology deleted in chromossome 10* (PTEN) é um dos principais genes estudados na carcinogênese renal e de outras neoplasias. É o segundo gene com maior número de mutações após o P53 (Kim et al., 2010).

Mutações germinativas podem determinar a ocorrência de síndromes familiares e maior predisposição para o desenvolvimento de neoplasias como: câncer colorretal e de pele. As principais síndromes são: Bannayan-Riley-Ruvalcaba, Doença de Cowden e Proteus “like” síndromes (Hara et al., 2005; Blanco-Aparicio et al., 2007).

A atividade transcricional do PTEN é regulada por diferentes fatores destacando-se gene TGF- β , interação proteína-proteína, processos de fosforilação e eventos epigenéticos (Kim et al., 2004) e sua inibição pode ser decorrente de mutação, deleção e hipermetilação em diferentes neoplasias primárias e metastáticas.

Este gene também conhecido como MMAC1 (*mutated in multiple advanced cancer*) ou TEP 1 (*TGF β regulated and epithelial cell enriched phosphatase*) está localizado no cromossomo 10q23. É constituído por nove éxons, produzindo uma proteína composta por 403 aminoácidos e peso de 55 Kb que atua principalmente no controle da migração, proliferação e apoptose celular (Gericke et al., 2006).

Através da proteína tensina, mantém o esqueleto intracelular em contato com meio externo, enquanto a enzima fosfatase promove a remoção do grupo fosfato de moléculas fosforiladas na membrana plasmática pelos receptores tirosino-quinases (RTQ), inibindo a ação proliferativa e de resistência a apoptose (Blanco-Aparicio et al., 2007).

O PTEN age por um mecanismo de "down regulation" do PI3K (*phosphatidylinositol 3-OH kinase*) e de seu produto, o PI-3,4,5-P3 (*phosphatidyl 3,4,5 – triphosphatase*) que são importantes no estímulo da proliferação celular e resistência a apoptose (Osaki et al., 2004; Sansal e Sellers 2004; Samuels e Ericson 2006). A ativação do PI3K e do PIP3, resulta na formação de moléculas pró-mitóticas, destacando-se a proteína quinase B, também chamada de Akt, como a principal proteína com função de estimular o crescimento e a divisão celular (Kim et al., 2004; Gericke et al., 2006) (Figura 2).

Fonte: Modificado de Stiles et al. (2004).

Legendas: AKT: proteína quinase B, m-Tor: Mamalian Target of rapamicin, PI3K (do inglês *phosphatidylinositol 3-OH kinase*), PIP2: (do inglês *phosphatidylinositol 3,4 kinase*), PIP3 (*phosphatidyl 3,4,5 – triphosphatase*) RTQS: receptores tirocino-quinases.

Diferentes vias de sinalização controladas pelo PTEN, destacando-se a defosforilação do PIP3, molécula esta formada a partir do PI3K. O Akt é a principal proteína efetora/sinalizadora do ciclo celular e controlada indiretamente pelo PTEN.

Figura 2. Demonstração do mecanismo de ação do gene supressor tumoral PTEN.

A interrupção do ciclo celular pelo PTEN é decorrente do aumento da proteína p27 que inibe a progressão da fase G0 para G1, como também, pela diminuição dos níveis totais e da localização nuclear de ciclina D (Gericke et al., 2006). Já o estímulo para apoptose celular ocorre pelo aumento da concentração de moléculas próapoptóticas como as moléculas Faz e bin, bem como, pela redução total de moléculas antiapoptóticas como a família Bcl-2 (Kim et al., 2004).

No CCR o gene PTEN tem sido avaliado principalmente por metodologia IIQ e sua hipoexpressão tem sido associada a tumores de alto grau e a menores taxas de sobrevida (Lee et al., 2003; Hyung et al., 2004).

Lee et al. (2003) analisaram a expressão IIQ do gene PTEN em 67 amostras de tumores renais provenientes de pacientes submetidos à nefrectomia radical. A hipoexpressão do gene PTEN foi determinante de menor sobrevida na análise univariada, mas permanecendo o estágio TNM como a principal variável prognóstica no modelo múltiplo.

Em 318 amostras de CCR, Hyung et al. (2004) demonstraram que a hipoexpressão do PTEN foi um fator prognóstico independente na sobrevida de 318 pacientes portadores de CCR localizado e metastático, sendo incorporado a nomogramas em conjunto com fatores clínicos e anatomopatológicos.

Campos (2007) encontrou elevada frequência de hipoexpressão do PTEN à IIQ, porém, não mostrou correlação estatisticamente significativa entre a deleção do gene, avaliada através de hibridização in situ, com a hipoexpressão IIQ observada.

A identificação dos diferentes níveis de ação do PTEN, os principais mecanismos moleculares envolvidos na inibição de sua atividade transcricional, assim como, o impacto dessas alterações moleculares na evolução dos pacientes, tornaram-se importantes para a identificação de novos fatores prognósticos e desenvolvimento de novas terapias para o tratamento do câncer renal.

1.3 Hipermetilação do DNA

A metilação do DNA corresponde a um evento epigenético em que ocorre a adição do radical metil (CH_3) a partir do doador S-adenosilmetionina ao carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas (C) localizadas a 5' das guaninas (G), resultando na formação de 5-metilcitosina. Este processo é mediado pela ação de uma ou de grupos de enzimas chamadas DNA metiltransferases (DNMT), destacando-se a DNMT1, DNMT2 e DNMT3 (Wajed et al.; 2001; Egger et al.; 2004) (Figura 3).

Fonte: Modificado de Stiles et al. (2004).

Legendas: CH_3 : radical metil, DNMT metiltransferase.

Demonstração de metilação através da adição do radical metil (CH_3) a região promotora do gene mediante a ação da enzima DNA metiltransferases.

Figura 3. Demonstração do processo de metilação na região promotora do gene.

Metionina e colina são as principais fontes doadoras do radical metil, destacando-se também cofatores como vitamina B12 e ácido fólico. O radical metil ocupando a região promotora do gene impede a formação do transcrito primário, ocasionando seu silenciamento (Robertson e Jones 2000; Wajed et al., 2001; Clark e Melki 2002; Egger et al., 2004).

A atividade de transcrição do gene é inibida através da ligação de proteínas específicas conhecidas como *methyl CpG-binding domain proteins* (MBDs) ao DNA metilado. Estas proteínas reconhecem e ligam-se preferencialmente as ilhas CpG metiladas, independentemente da sequência do gene (Robertson e Jones 2000).

As MBDs contêm um domínio repressor da atividade transcricional formando complexos protéicos com moléculas correpressoras e conhecidas como histonas deacetilases. A ligação destes complexos protéicos ao DNA metilado resulta na deacetilação das histonas e alteração conformacional da cromatina, evitando assim que a atividade de transcrição seja realizada (Jones e Baylin 2002; Worm e Guldberg 2002; Robertson 2005).

A metilação do DNA além de inibir a atividade transcricional de genes supressores de tumor também aumenta a probabilidade de ocorrência de mutações. Os radicais livres de oxigênio são inibidos pela ação da enzima glutathione-S-transferase e por proteínas de reparo do DNA e, a presença de metilação destes genes pode tornar o DNA instável e mais susceptível ao efeito deletério dos radicais livres de oxigênio, favorecendo o aparecimento de mutações (Wajed et al., 2001).

Apesar da baixa frequência dos dinucleotídeos CG, detectados em somente 1 a 2% do genoma, são os principais alvos da metilação aberrante ou hipermetilação (Robertson e Jones 2000).

A denotação CpG descreve a união de uma citosina a uma guanina por uma ligação fosfodiéster em uma mesma fita de DNA, diferindo dos pares de CG que são unidos por pontes de hidrogênio e localizados em fitas opostas da dupla hélice de DNA. A denominação de ilha (*island*) CpG é decorrente da localização na parte 5'-terminal dos genes (Costello e Plass 2001; Egger et al., 2004; Jones e Baylin 2004; Robertson 2005).

A metilação do DNA tem um importante papel no desenvolvimento embrionário, inativação de um cromossomo X nas mulheres, silenciamento de sequências repetidas, inibição da atividade transcricional de certos genes e *imprinting* genômico (Clark et al., 2002; Tost 2010). É uma etapa importante do desenvolvimento embrionário ao determinar tipos celulares específicos e mais susceptíveis a metilação, os chamados epigenomas.

Duas etapas de reprogramação epigenômica ocorrem no desenvolvimento embrionário: no zigoto e na célula germinativa primordial. Durante a fase de pré-implantação a reversão da metilação do DNA elimina o padrão pré-existente de metilação herdado do DNA parenteral, permitindo que a diferenciação celular ocorra normalmente (Wajed et al., 2001; Tost 2010).

Uma vez estabelecido o padrão de metilação do embrião, ele permanece constante e é mantido durante a vida permitindo desta forma que as células controlem sua própria atividade de transcrição e inibam a atividade de certos genes quando necessário. Este mecanismo explica a inibição do cromossomo X nas mulheres, prevenindo a dupla expressão de informação genética quando comparada ao sexo masculino.

A metilação do DNA contribui para o desenvolvimento e funcionamento do organismo, sendo importante no silenciamento de sequências repetidas e manutenção da estabilidade cromossômica, permitindo a adaptação do genoma ao ambiente e, assim, contribuindo para a definição do fenótipo (Robertson 2005). Não é um evento celular definitivo, ocorrendo mudanças de acordo com a idade e fatores ambientais.

O genoma materno e paterno não são funcionalmente iguais, mas importantes para o desenvolvimento do zigoto. O *imprinting* genômico corresponde a um grupo de genes expressos assimetricamente e de origem única do alelo materno ou paterno em que apenas um dos dois alelos parenterais é expresso, enquanto o outro gene é mantido silenciado (Tost 2010).

Na célula tumoral, há eventos de hipermetilação de genes específicos concomitantemente a hipometilação global de sequências dinucleotídeas CG (Robertson e Jones 2000). Estas alterações levam à ativação de proto-oncogenes ou à perda da função de genes supressores tumorais, resultando na instabilidade celular e consequente ganho no crescimento e potencial metastático tumoral.

O motivo da ocorrência de hipermetilação das ilhas CpG é desconhecido, como também, se a metilação do DNA é um evento primário no silenciamento gênico ou secundário na inativação alélica. Fatores como alterações estruturais no DNA, exposição a agentes carcinógenos e maior atividade da enzima DNA metiltransferase, já foram correlacionados a padrões anormais de metilação das ilhas CpG (Robertson 2005).

A análise do perfil de metilação de determinados genes tem sido testada quanto à capacidade de: diagnosticar lesões pré-malignas ou neoplasias em estágio

inicial, prognóstico mediante a correlação com fatores clínicos e anatomopatológicos, avaliação do risco de vir a desenvolver neoplasias mediante a pesquisa de metilação em fluídos corpóreos, alvo de terapias com o objetivo de reverter o fenótipo e normalizar o crescimento celular e identificar diferentes tipos tumorais mediante a caracterização molecular das neoplasias (Robertson e Jones 2000; Cheung et al., 2004; Robertson 2005; Baylin e Ohm 2006).

Reverter a metilação do DNA confere a possibilidade teórica de tratar células tumorais com medicamentos que alterem o padrão de metilação e recuperem a sua expressão gênica normal. Sabendo que, a metilação do DNA é um processo reversível como outras modificações bioquímicas de fosforilação e defosforilação de proteínas, acetilação e deacetilação de histonas, novas enzimas demetiladoras do DNA necessitam ser identificadas para que ocorra a reversão do fenótipo metilador e o gene recupere sua atividade transcricional.

Recentemente, novos medicamentos inibidores da metilação têm sido testados em ensaios clínicos, destacando-se as DNMT como os principais alvos para a reversão da metilação, pois são enzimas que fazem parte de um complexo protéico múltiplo e atuam diretamente na replicação do DNA, no controle da transcrição nuclear e remodelação da cromatina (Kisselijova et al., 2005).

A proteína MDB 2 aparece como uma das principais enzimas responsáveis pela demetilação do DNA. Esta enzima é capaz de detectar as ilhas CpG metiladas e catalizar a quebra do radical metil da 5-metilcitosina sem alterar estruturalmente o DNA. A expressão exógena da proteína MDB 2 em células renais embrionárias promoveu a demetilação DNA e induziu a atividade transcricional de genes metilados em vitro (Kisselijova et al., 2005).

Apesar do grande interesse e futuro promissor com o desenvolvimento de novas terapias com potencial inibitório da metilação deve-se considerar o possível efeito da demetilação do DNA na carcinogênese, pois este processo pode ocasionar nas células tumorais a alteração da expressão de genes opostos à transformação maligna, assim como, a inativação de genes supressores tumorais e a ativação de proto-oncogenes e de genes associados ao processo metastático.

JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O carcinoma de células renais (CCR) corresponde a um conjunto de neoplasias heterogêneas e de involução incerta. Cerca de 30% dos pacientes são metastáticos ao diagnóstico e outros 30 a 50% dos pacientes irão desenvolver metástases durante o seguimento, mesmo entre aqueles portadores de doença localizada (Arsanious et al., 2009; Kuticov et al., 2009).

Apesar da identificação de fatores prognósticos como: estadiamento TNM, grau histológico e performance status e, em alguns estudos o subtipo histológico, tumores com mesmo estadiamento, prognóstico e tratamento apresentam evoluções muito distintas (Uno et al., 2004; Lam et al., 2005; Ljungberg 2007; Lam et al., 2009).

A biologia molecular tem analisado o papel de alterações genéticas e epigenéticas, como mutação, deleção e metilação e o efeito destas alterações na expressão gênica e comportamento celular, procurando identificar diferentes genes que adicionados aos fatores clínicos e anatomopatológicos utilizados na avaliação prognóstica do CCR sejam capazes de melhor predizer a evolução dos pacientes.

Recentemente, uma nova classe de medicamentos conhecidos como inibidores de alvos moleculares foi inserida no tratamento do CCR metastático, configurando como tratamento de primeira, segunda e terceira linha; a partir da identificação de elevada atividade angiogênica e mediada pelo *vascular endothelial grown factor* (VEGF), decorrente de mutação, deleção e/ou hipermetilação do gene VHL e presente em 80% dos carcinomas de células claras renais (Rathmel et al., 2005; Ljungberg 2007).

A metilação do DNA é o principal mecanismo de modulação epigênica e por sua origem epigenética, o DNA celular é mantido estruturalmente íntegro tornando-se, teoricamente, um possível alvo de terapia medicamentosa com consequente reversão do fenótipo metilador (Plasencia e Gonzalez 2006).

Genes com elevada frequência de metilação têm sido testados como marcadores biomoleculares para o diagnóstico de neoplasias, identificação de grupos de risco para o desenvolvimento de câncer, assim como, potencial prognóstico e de seguimento (Tost 2010).

A frequência e o impacto da metilação do PTEN na carcinogênese renal são desconhecidos. Campos (2007) sugeriram a metilação do PTEN como possível mecanismo molecular para justificar a elevada frequência de hipoexpressão IIQ detectada, uma vez que, não houve correlação entre a deleção analisada do gene por hibridização in situ e a hipoexpressão à IIQ e, considerando-se também, a baixa frequência de mutação descrita na literatura para o PTEN no CCR (Sakurada et al., 1997; Sukosd et al., 2001).

Assim, torna-se necessário a melhor caracterização da carcinogênese e progressão tumoral renal a nível molecular, para que, novos fatores prognósticos e preditivos para a recorrência, progressão tumoral e resposta a terapia de alvo molecular sejam identificados.

Sabendo-se que a via de carcinogênese do gene PTEN/PI3K/Akt pode ser alvo de terapia molecular baseada nos inibidores da proteína mTOR, além do potencial prognóstico que o gene PTEN tem demonstrado em diferentes neoplasias e a possibilidade teórica de reversão medicamentosa do fenótipo metilador, decidimos selecioná-lo e avaliá-lo no CCR (Hyung et al., 2004; Salvessen et al., 2004; Cheung et al., 2009).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Em pacientes portadores de carcinoma de células renais e submetidos a tratamento cirúrgico da neoplasia renal, pretende-se:

1. Avaliar a influência dos fatores epidemiológicos, clínicos, anatomopatológicos e terapêuticos nas taxas de sobrevida global e livre de doença.
2. Avaliar a frequência e o impacto da metilação do PTEN através da técnica de pirosequenciamento nas taxas de sobrevida global e livre de doença.
3. Avaliar a associação de metilação do PTEN com os fatores clínicos e anatomopatológicos tradicionalmente utilizados na definição do prognóstico de pacientes portadores de carcinoma de células renais.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Critérios de Inclusão

Foram selecionados prontuários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) de pacientes portadores de CCR comprovados histologicamente nos estádios T1 a T4, N1 a N2 e portadores ou não de metástase à distância ao diagnóstico, tratados exclusivamente no Hospital A.C. Camargo no período de 1997 a 2009 e com material anatomopatológico disponível no banco de tumores da instituição.

Foram inicialmente selecionados 152 casos de CCR, porém, após a primeira revisão de lâminas e confirmação diagnóstica, 15 casos necessitaram ser excluídos devido à ausência de DNA tumoral na amostra ou presença excessiva de fibrose, necrose ou hemorragia no material que impediriam a extração do DNA.

Todos os pacientes receberam tratamento cirúrgico da neoplasia renal que consistiu em nefrectomia radical, parcial ou laparoscópica.

4.2 Critérios de Exclusão

Os critérios estabelecidos para exclusão das pacientes no estudo foram: 1) tratamento em outro serviço, 2) pacientes submetidos a outros tipos de tratamentos oncológicos (imunoterapia, quimioterapia, hormonioterapia, radioterapia) que não a cirurgia, 3) ausência de material disponível no banco de tumores ou material

disponível, mas sem condições de análise pela excessiva quantidade de fibrose ou necrose presente no tecido, impossibilitando a macrodissecção da região tumoral ou a degradação do DNA tumoral no momento da extração 4) pacientes com comorbidades graves que limitassem sua expectativa de vida ou que tivessem outra neoplasia maligna em atividade.

4.3 Metodologia

Os registros dos pacientes foram obtidos em arquivos nos departamentos de anatomia patológica e cirurgia pélvica. Os dados epidemiológicos, clínicos, relacionados ao tratamento, dados anatomopatológicos e informações a respeito do seguimento dos pacientes foram coletados junto ao SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatístico) do Hospital A.C. Camargo.

4.3.1 Microdissecção das amostras e extração do DNA

As amostras selecionadas para a extração do DNA tumoral foram aquelas disponíveis no banco de tumores. Após o exame de congelação intraoperatório, foram selecionadas as áreas mais representativas e livres de necrose e fibrose para, posteriormente, serem submetidas ao congelamento rápido em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Após a identificação das amostras no banco de tumores, a região tumoral foi isolada por um patologista por meio de microdissecção manual, sendo o DNA tumoral extraído utilizando-se o Kit de extração QIAamp DNA Micro Kit 50 (Qiagen, Uniscience do Brasil) (Anexo E).

Para a microdissecção manual, foi realizado um corte de cinco μm de cada amostra e corado imediatamente com hematoxilina-eosina para avaliar a quantidade de tumor e demarcar a área a ser submetida à microdissecção manual, considerando-se sempre a existência de quantidade superior a 70% de células tumorais na região de onde foi extraído o DNA.

As amostras de DNA extraídas foram quantificadas através de espectrofotometria no NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, Estados Unidos). Para verificar a integridade do DNA genômico extraído, 200ng de cada amostra foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.3.2 Protocolo de tratamento com bissulfito de sódio

Após sua extração, 1 μg de DNA tumoral de cada amostra foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio mediante a utilização do Kit “*Ez Dna Methylation*” da empresa *Zymo Research* (Kaneda et al., 2004)(Anexo F).

A escolha deste Kit, que consiste em três etapas de reação entre as citosinas e o bissulfito de sódio, foi baseada na menor degradação do DNA durante o tratamento, assegurando a completa conversão do DNA. Este tratamento promove a deaminação de citosinas não-metiladas, convertendo-as em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas.

Como controle de qualidade do tratamento do DNA com o bissulfito, foi amplificado via PCR, um fragmento de 133Pb do gene constitutivo beta-actina, com a utilização de primers desenhados para este gene pós-tratamento com bissulfito de sódio (Quadro 2).

Quadro 2. Sequência de iniciadores para amplificação do gene β -ACTINA após tratamento de bisulfito.

GENE	INICIADOR SENSO (5'-3')	INICIADOR ANTISENSE (3'-5')
B-ACTINA	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA

Para a reação foram utilizados 2 μ l de DNA tratado; 2,5 μ l de solução tampão de reação 10X; 1 μ l de $MgCl_2$ (1,5 mM); 0,5 μ l de dNTPs (10 mM) (*Invitrogen*); 1 μ l de cada primer (10 mM) e 0,2 μ l de Taq DNA Polymerase Platinum (*Invitrogen*) e H_2O ultra pura para completar um volume final de reação de 25 μ l. As seguintes condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de (95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto), com uma fase de extensão final de 72°C por 7 minutos e 4°C infinito.

A figura 4 demonstra a amplificação do gene beta-actina via PCR convencional de 20 amostras, após o tratamento com bissulfito numa eletroforese em gel de agarose 2%.

Figura 4. PCR com gene beta-actina nas primeiras 20 amostras utilizadas no estudo e após o tratamento com bisulfito de sódio.

4.3.3 Pirosequenciamento

A maioria das técnicas que avaliam a metilação de sítios específicos é baseada na modificação do DNA após a exposição ao bissulfito de sódio. Citosinas metiladas no DNA original permanecem não afetadas com o uso do bissulfito, enquanto que, citosinas não metiladas são convertidas em uracil e, posteriormente, em timina (Ahmadian et al., 2006).

Assim, a retenção da citosina em uma posição específica indica a presença de metilação e a presença da timina em um sítio onde normalmente há citosina indica a presença de citosina não metilada na molécula original de DNA (Tost e Gut 2007).

A técnica do pirosequenciamento é um método que analisa qualitativamente e quantitativamente em tempo real a incorporação de nucleotídeos mediante a conversão enzimática e liberação de pirofosfato através de detecção luminométrica (Dupont et al., 2004).

Na reação de pirosequenciamento as enzimas, os substratos e os nucleotídeos A, T, C e G, são carregados em um cartucho e dispensados um de cada vez em cada poço, na ordem determinada pelo aparelho. Após ser dispensado, o nucleotídeo é incorporado a fita simples de DNA e libera um Pi (pirofosfato), este Pi se liga ao ADP formando ATP, que é degradado pela luciferina liberando um pico de luz que é capturado por uma câmara de CCD e convertido em pico no pirograma (gráfico). O sinal fluorescente é gerado proporcionalmente à quantidade de nucleotídeo incorporado, de modo que, os picos presentes no pirograma indicam o número e tipo de nucleotídeos presentes. Posteriormente, os nucleotídeos não incorporados são degradados pela apirase (Figura 5).

Figura 5. Demonstração do processo enzimático da reação de pirosequenciamento.

A enzima DNA polimerase promove a incorporação de nucleotídeos e a liberação de PPI que reage com a luciferase produzindo luz. Os nucleotídeos não incorporados são degradados pela apirase para que ocorra a incorporação dos próximos nucleotídeos.

O uso do pirosequenciamento na pesquisa de metilação permite algumas vantagens em relação a outras técnicas: 1) controlar a qualidade da reação após o tratamento com bissulfito, 2) analisar sítios de metilação adjacentes ao sítio principal, identificando inclusive sequências parcialmente metiladas, 3) confirmar a correta posição do primer na molécula de DNA modificada através da sequência de nucleotídeos gerada ao redor do sítio de metilação, que é rica em adenina e timina (Dupont et al., 2004; Ahmadian et al., 2006).

Em nosso estudo foram avaliados os níveis de metilação de 27 sítios CpG localizados entre os códons 795 a 606 do gene PTEN, demonstrados em negrito na região promotora do PTEN (figura 5). Este experimento foi realizado utilizando o kit Human PTEN CpG Methylation (Epigendx, EUA).

Figura 6. Demonstração da sequência genômica do PTEN (verde, segmento 5'; negrito – ilhas CpG na região promotora e alvo dos primers, amarelo – início do sítio transcripcional).

Devido a extensão dos pares de bases nucleotídicas a serem analisados e as limitações da técnica do pirosequenciamento em analisar sequências superiores a 100 pares de bases, foram utilizados dois primers que avaliaram, respectivamente, as ilhas CpG de 1 a 11 e 12 a 27, localizadas entre os códons 795 a 606 (Quadro 3).

Quadro 3. Primers FS1 e FS2, sequências de análise e sequência após a leitura do DNA.

Primer	Sequência de análise	Sequência após leitura
ADS955FS1 (CpG 1 a 11)	GTYGTTGTGAGGYGAGGTYGGGTTTAGG YGAGGGAGATGAGAGAYGGYGGYGGTY GYGGTTYGGAGTTTTTTTTAGYGTTTGTG AGTAGT	AGT CG CTGTGATGT CG AGT CG TCATG T CG AGAGATGAGAGTATCAGT CG TCA GT CG TCAGT CG AGTCTAGT CG T
ADS955FS2 (CpG 12 a 27)	GTYGYGGGGGTAGYGTTTYGGGGAGTY GGTYGGTTTGYGGYGGYGGTAGYGGYG GYGTTTTYGTYYYYTTTTYGTYYYYTTTA ATYGTGTAGTTTTTTTTYGGTTTTTTTTTG AAAGGGAAGGTGGA	AGT CG T CG GTCACTCAGTT CG GATGT CAGT CG T CG T CG T CG T CG CTATGTCA GT CG TCAGTT CG TT CG TTGAT CG TGT ATGTT CG T

A preparação da fita simples de DNA para o Pirosequenciamento foi realizada usando o PSQ Vaccuun Prep Tool (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com as instruções do fabricante. Vinte e cinco µl do produto de PCR são imobilizados em streptavidin-coated Sepharose beads (Streptavidin Sepharose High Performace, GE Healthcare).

Em uma placa de 96 poços são transferidos 25 µl do produto amplificado por PCR e adicionado 55 µl do mix de beads de sefarose (3 µl de beads de sefarose, 40 µl de tampão de ligação e 15 µl de água deionizada) em cada poço. A placa é agitada por 15 min a 1350rpm e em seguida é levada à bomba de vácuo (Vaccuun Presp Toll), onde o produto de PCR ligado as beads é precipitado com álcool 70%, desnaturado em Denaturation buffer e lavado em Washing buffer.

Em seguida os produtos purificados são incubados com 0,4 $\mu\text{mol/L}$ de primers de sequenciamento, previamente diluídos em 38,6 μl de Annealing buffer à 80°C por 2 min em placa de sequenciamento (PSQ 96 plate), 5 minutos na placa aquecedora e 5 minutos em temperatura ambiente.

Os produtos purificados ligados ao primer de sequência são transferidos a base do PSQ HS 96 A Pyrosequencer (Qiagen, Valencia, CA), onde acontece o sequenciamento em tempo real do PTEN usando PyroGold reagents (Qiagen, Valencia, CA)

Nas reações de pirosequenciamento, foram utilizados linfócitos hipermetilados e hipometilados como controles positivos e negativos, respectivamente (Anexo G).

4.3.4 Critérios de Análise do Perfil de Metilação

Não há consenso na literatura em relação a valores utilizados para determinar um *cutoff*, bem como, quais critérios devem ser utilizados para considerar casos metilados ou não.

Alguns estudos consideram casos metilados aqueles em que há mais de 5% de ilhas CpG metiladas, enquanto outros, consideram valores superiores a 20% das ilhas CpG para considerar metilação positiva (Mirmohammadsade et al., 2006; Joo et al., 2010).

No presente estudo, para considerarmos o nível de metilação de uma amostra empregamos os critérios utilizados por Joo et al. (2010) e Matos (2010), em que o valor de *cutoff* foi estabelecido a partir do cálculo da média de metilação encontrada no tecido normal.

Matos (2010) estabeleceu o índice de metilação (MtI) para cada sítio CpG avaliado utilizando a fórmula: $mC/(mC+C)$. Neste estudo, mC correspondeu ao número de citosinas metiladas e C ao número de citosinas não metiladas. De acordo com a reação de pirosequenciamento, as citosinas metiladas demonstram uma porcentagem correspondente ao dinucleotídeo C, enquanto as citosinas não metiladas demonstram uma porcentagem correspondente ao dinucleotídeo T.

Após a determinação deste índice para cada sítio CpG entre os 27 avaliados, foi realizada uma média dos 11 sítios avaliados pelo primer ADS955FS1 e dos 16 sítios avaliados pelo primer ADS955FS2. O valor final correspondeu à média entre os valores obtidos pelos primers ADS955FS1 e ADS955FS2.

No estudo de Joo et al. (2010) a média de metilação encontrada no tecido normal foi de 4%, sendo estabelecido como *cutoff* o valor de 5% que correspondeu ao valor limite da frequência de metilação no tecido normal.

No presente estudo, foi avaliado o nível de metilação do gene PTEN em sete amostras de tecido renal normal. Os sítios CpG no tecido normal apresentaram uma variação de 0 a 4%, permitindo definir o *cutoff* para a presença ou ausência de metilação. Como foram freqüentes os casos que não apresentavam metilação nas ilhas CpG avaliadas, consideramos o valor de 4% como *cutoff*. Valores iguais ou inferiores a 0,04 foram considerados dentro do padrão de variabilidade dos casos não metilados, enquanto que, índices de metilação superiores a 0,04 foram considerados metilados.

Para o cálculo do MtI., a figura abaixo demonstra os pirogramas resultantes da incorporação do nucleotídeo T nas ilhas CpGs de 1 a 11 e 12 a 27. O MtI final correspondeu a média entre o MtI das ilhas CpGs de 1 a 11 e o MtI das ilhas 12 a 27.

Figura 7. Pirogramas de incorporação de nucleotídeos T nas ilhas CpGs para os primers ADS955FS1 e ADS955FS2. O valor do MtI final foi de 0,017, demonstrando a ausência de hipermetilação do gene.

4.3.5 Protocolo de Acompanhamento

De acordo com a rotina do departamento de cirurgia pélvica do Hospital A.C. Camargo, o acompanhamento no pós-operatório consiste de consultas trimestrais nos primeiro e segundo anos, semestrais no terceiro e quarto anos e anualmente após o quinto ano. Em todas as consultas realiza-se exame físico geral e específico, além de

radiografias de tórax simples nas incidências de frente e perfil e dosagem sérica de uréia e creatinina.

Também são realizadas ultrassonografias de abdômen total alternadas com tomografias abdominais e pélvicas. A cintilografia óssea é realizada nos casos de suspeita clínica ou laboratorial de metástase óssea.

4.4 Variáveis do Estudo

- **Epidemiológicas**

Tempo de seguimento

O tempo de seguimento foi calculado em meses e correspondeu ao intervalo de tempo decorrido entre a data da cirurgia e a data do último seguimento clínico do paciente. O tempo de seguimento dos pacientes variou de 0 a 102 meses com média de 32,3 meses e mediana de 28,8 meses.

Idade

Considerada em anos completos, a idade ao diagnóstico variou de 23 a 71 anos, com média e mediana de 52 e 55 anos, respectivamente. Considerando três grupos etários, 14 pacientes (10,2%) apresentavam idade inferior a 40 anos, 79 (57,7%) idade inferior a 60 anos e em 44 pacientes (32,1%) a idade era superior a 60 anos.

Raça

Os pacientes foram classificados como brancos e não brancos. Predominou a raça branca em 119 pacientes (86,9%), enquanto que, 18 pacientes (13,1%) foram classificados como não brancos.

Sexo

Classificados como masculino e feminino. O sexo masculino foi o mais frequente, correspondendo a 78 pacientes (56,9%). Cinquenta e nove pacientes (43,1%) eram do sexo feminino.

Sintomatologia

Qualquer sintoma ou sinal que tenha motivado o diagnóstico foi classificado como queixa. Foram selecionadas as queixas mais frequentes citadas na literatura como: dor lombar, hematúria, perda de peso, massa palpável e febre. Os pacientes assintomáticos ao diagnóstico tiveram o diagnóstico incidental da neoplasia.

Predominaram pacientes com diagnóstico incidental em relação aos pacientes sintomáticos sendo, 78 (56,9%) versus 59 (43,1 %), respectivamente. Entre os pacientes sintomáticos, predominaram: hematúria em 21 casos (15,3%), dor lombar em 18 casos (13,1%), emagrecimento sete casos (5,1%), massa palpável em um paciente (0,7%) e um único paciente (0,7%) apresentou a tríade de hematúria, dor lombar e massa palpável. Cinco pacientes (3,6%) apresentaram outros sintomas como febre e seis pacientes (4,4%) apresentaram mais de um sintoma.

Metástase ao diagnóstico

Quando havia disseminação metastática da neoplasia renal no momento do diagnóstico, demonstrada clinicamente ou através de biópsia. Dezenove pacientes (13,9%) apresentavam metástases ao diagnóstico.

- **Dados clínicos**

Performance / status

Os pacientes foram avaliados inicialmente com a escala de Karnofski (1940) e, posteriormente, convertidos para a classificação do ECOG (European Cooperative Oncologic Group, 1982) através de uma escala conversora disponível no Anexo C. Por terem sido selecionados pacientes tratados cirurgicamente do tumor primário, não houve pacientes com Karnofski inferior a 50% e correspondentemente ao ECOG 3 (Karnofski 50-60%). ECOG 0, 1 e 2 foram identificados em 81 pacientes (59,1%), 52 (38%) e 4 (2,9%), respectivamente.

Para a análise estatística, os pacientes foram classificados em dois grupos: ECOG 0 versus ECOG 1 e 2. Oitenta e um pacientes (59,1%) eram ECOG 0 e 56 (40,9%) ECOG 1 e 2.

ASA

Foram identificadas as seguintes frequências de ASA 1, 2, 3 e 4, respectivamente: 16 pacientes (11,7%), 87 (63,5%), 33 (24,1%) e 1(0,7%). Para a análise das taxas de sobrevida e associação com o perfil de hipermetilação do PTEN, os pacientes foram analisados em dois grupos: ASA 1 e 2 versus ASA 3 e 4. Cento e três pacientes (75,2%) eram ASA 1 e 2 e 34 pacientes (24,8%) ASA 3 e 4.

Hemoglobina

A hemoglobina pré-operatória mediana foi de 13,9 g/dl, variando de 9,0 g/dl a 18,5 g/dl. A hemoglobina média foi de $13,7 \pm 0,17$ g/dl.

Tipo de cirurgia

Nefrectomia radical aberta e laparoscópica e nefrectomia parcial foram os procedimentos cirúrgicos realizados no tratamento do CCR. Os casos tratados por videolaparoscopia foram analisados conjuntamente com os procedimentos parciais. A nefrectomia radical foi o procedimento realizado mais frequente, correspondendo a 80 cirurgias (58,4%). Cinquenta e quatro cirurgias (39,4%) foram procedimentos parciais e três (2,2) laparoscópicos.

O tempo médio de duração das cirurgias foi de 187,81 minutos e mediana de 180 minutos, com variação de 60 a 500 minutos. Em relação à via cirúrgica de acesso ao rim, a lombotomia foi a mais utilizada e realizada em 73 casos (53,3%), seguida de incisão abdominal em 61 casos (44,5%).

O tempo médio de internamento e mediana foram, respectivamente, de 5,5 e 4 dias, com tempo de internamento variando de um até 70 dias.

- **Dados Anatomopatológicos**

Tamanho tumoral: Considerou-se, em centímetros, o maior eixo tumoral durante a realização do exame anatomopatológico, de acordo com o estadiamento TNM (Sobin e Wittekind 2004). O tamanho médio dos tumores operados foi de 6,28 cm, com mediana de 5,0 cm. Os tamanhos variaram de 1 a 24 cm. Tumores T1a, T1b, T2, T3a, T3b e T4 ocorreram com frequências, respectivamente, de 27%, 35%, 10,9%,

13,9%, 8,8% e 4,4%. O tamanho tumoral patológico foi analisado conjuntamente com o estadiamento clínico TNM (Sobin e Wittekind 2004).

Para verificar o impacto prognóstico do tamanho tumoral isoladamente, os pacientes foram classificados como portadores ou não de tumor renal maior ou menor a sete cm. Tumores inferiores e superiores a sete cm foram identificados em 98 (71,5%) e 39 pacientes (28,5%), respectivamente.

Revisão de lâminas: Foram revisadas as lâminas originais dos exames anatomopatológicos de todos os casos por um único patologista.

O grau histológico foi avaliado através da graduação proposta por Furhman et al. (1982) que é composta por 4 graus. O grau 2 de Fuhrman foi o mais frequente e presente em 72 casos (52,6%). Os graus 1, 3 e 4 ocorreram em 17 casos (12,4%), 27 casos (19,7%) e 21 casos (15,3%), respectivamente.

Para a análise das taxas de sobrevida e associação com o perfil de hipermetilação do PTEN, dois grupos foram criados e divididos em tumores de baixo grau de Fuhrman (Graus 1 e 2) e alto grau (Graus 3 e 4) (Al-Aynati et al., 2003; Ficarra et al., 2005). Baixo grau ocorreu com frequência de 89 casos (65%) e alto grau em 48 casos (35%).

Para a classificação dos subtipos histológicos foi empregada a classificação mais recente e definida em 2004 (Bruder et al., 2004). Os seguintes tipos histológicos e suas respectivas frequências foram encontrados:

- Carcinoma células claras, 81,8%;
- Carcinoma renal papilífero, 10,2%;
- Carcinoma renal cromofóbico, 6,6%;

- Carcinoma dos ductos coletores, 0,7%;
- Carcinoma medular, 0%;
- Carcinoma relacionado ao TFE3 gene, 0%;
- Carcinoma renal inclassificável, 0,7%.

Na avaliação do subtipo histológico na SG e SLD e associação com o status de hipermetilação do PTEN, os pacientes foram classificados como portadores ou não do subtipo histológico de células claras. O subtipo células claras correspondeu a 112 casos (81,8%) e não células claras a 25 casos (18,2%).

Invasão venosa microscópica (IVM): Foi considerada presente quando foram encontradas células neoplásicas isoladas ou agrupadas no lúmen vascular com hemáceas e com revestimento endotelial podendo haver fibras musculares lisas. Assim, os tumores foram classificados como tendo IVM presente ou ausente. IVM foi detectada em 24 casos (17,5%), enquanto que, 113 (82,5%) dos CCR não apresentavam IVM.

Necrose tumoral: Foi considerada positiva quando havia material decorrente da lise celular tumoral macro ou microscopicamente. Necrose tumoral foi detectada em 57 casos (41,6%) e ausente em 80 (58,4%).

Acometimento linfonodal regional e número de linfonodos: Considerado positivo (pN+) quando o exame anatomopatológico demonstrava o envolvimento neoplásico. Considerado como negativo (pN-) quando pelo menos um linfonodo estivesse livre de comprometimento neoplásico ao exame anatomopatológico. Os casos em que não

havia linfonodos no produto de nefrectomia foram classificados como pNx. De acordo com o acometimento linfonodal foram encontradas as seguintes frequências para pN+, pN- e pNx: 10 casos (7,3%), 79 casos (57,7%) e 48 casos (35%), respectivamente.

Dois grupos foram criados para verificar o significado do acometimento linfonodal na sobrevida dos pacientes. O grupo definido como N+ foi composto por tumores pN1 e pN2 e ocorreram 10 casos (7,3%). No grupo definido como N0 os linfonodos estavam livres de comprometimento (pN0) ou ausentes (pNx) e ocorreram em 127 casos (92,7%).

Margens cirúrgicas: pacientes em que todos os limites de ressecção do espécime cirúrgico estiveram livres de comprometimento neoplásico foram considerados como tendo margens cirúrgicas livres. Se em um dos limites da peça cirúrgica houvesse células neoplásicas, foi considerado como sendo margens comprometidas. Em 127 pacientes (92,7%) as margens cirúrgicas estavam livres de comprometimento neoplásico, enquanto que, em 10 pacientes (7,3%) as margens estavam comprometidas.

- **Estadiamento**

Para o estadiamento foram empregados os sistemas TNM propostos pela UICC (Sobin e Wittekind 2004). Quanto ao estadiamento clínico TNM 2004, os pacientes foram classificados em 4 estádios, a saber: I, II, III e IV. Tumores EC I, II, III e IV ocorreram em 85 pacientes (62%), 13 (9,5%), 22 (16,1%) e 17 (12,4%).

Para a análise das SG e SLD e associação com o status de hipermetilação do gene PTEN os pacientes foram classificados em dois grupos e definidos como portadores de tumores localizados (EC I e II) ou avançados (EC III e IV). Em 98 pacientes (71,5%) predominaram os tumores localizados e em 39 pacientes (28,5%) os tumores avançados localmente ou metastáticos.

- **Pirosequenciamento**

Entre as 137 amostras de CCR avaliadas por pirosequenciamento, havia hipermetilação do gene em cinco amostras (3,6%). Em 132 amostras (96,4%) não havia hipermetilação do gene.

Figura 8. Demonstração da ausência de hipermetilação com uma única ilha CpG apresentando 3% de metilação.

Figura 9. Presença de hipermetilação em todas as ilhas CpG.

4.5 Situação Clínica ao Final do Estudo

Situação clínica do paciente verificada na data do último seguimento. Os pacientes foram classificados quanto à situação clínica como:

- Vivos assintomáticos: pacientes tratados do CCR sem evidencia clínica, laboratorial e radiológica de atividade da doença.
- Vivos com câncer em atividade: pacientes que após a nefrectomia mantiveram evidencia clínica, laboratorial ou radiológica da doença, ou que, apresentaram recidiva durante o seguimento.
- Mortos por câncer: pacientes que morreram decorrente do CCR ou de causa diretamente relacionada a seu tratamento.
- Mortos por doença não relacionada ao câncer: pacientes que morreram por causas não relacionadas ao CCR ou a seu tratamento.

- Perdidos de vista: pacientes que não retornaram a consulta num período de tempo igual ou maior ao dobro do estipulado para o seu retorno, e com os quais não foi possível estabelecer contato para informações no decorrer do estudo. O limite máximo de pacientes perdidos de vista aceitável foi estabelecido em 10%.

Ao final do seguimento havia 94 pacientes (68,6%) vivos e sem doença, 14 pacientes (10,2%) vivos e com doença, 22 óbitos (16,5%) e sete pacientes (5%) perdidos de vista. Ocorreram 22 óbitos (16%), dos quais 15 (10,9%) pelo câncer e sete mortes (5,1%) por outras causas. Recidiva tumoral foi detectada em 20 pacientes (14,6%), predominando pacientes (85,4%) sem recorrência tumoral.

Os sítios mais frequentes de recorrência tumoral foram: pulmão (33,3%), osso (9,5%), sistema nervoso central (4,8%), local (4,8%) e mais de um sítio (38,1%). No tratamento da doença metastática, a cirurgia foi empregada em sete casos (33,3%), os inibidores de tirosino-quinases em seis casos (28,6%) e a imunoterapia isolada em dois casos (9,5%). Em seis casos (28,6%), mais de uma modalidade terapêutica foi empregada no tratamento da doença metastática, incluindo: cirurgia, radioterapia, ITQ e imunoterapia.

4.6 Sobrevida Global e Livre de Doença

A sobrevida global (SG) foi definida pelo período de tempo, em meses, decorrido entre a data da nefrectomia e a data do óbito ou do último seguimento.

A sobrevida livre de doença (SLD) foi determinada pelo período de tempo, em meses, decorrido entre a data da nefrectomia e a data do diagnóstico da recidiva

ou do último seguimento. Para cálculo da SLD foram excluídos os pacientes portadores de metástases ao diagnóstico, assim como, aqueles com margens positivas após a cirurgia.

4.7 Análise Estatística

Os dados obtidos dos prontuários foram digitados e arquivados em um banco de dados com auxílio do software *Statistical Package for Social Science* (SPSS). Na análise estatística foi empregado o SPSS for Windows na versão 16.0 e o software estatístico livre R cran (<http://www.r-project.org.br>) na versão 2.12. A mensuração das variáveis quantitativas foi expressa pelas médias e respectivos desvios-padrão e as variáveis qualitativas pelas respectivas frequências absolutas e relativas.

Para estudar os tempos de sobrevida global e os tempos de sobrevida livre de doença utilizou-se o estimador de Kaplan-Meier como ferramenta para estimar a probabilidade de um paciente com CCR estar vivo ou não apresentar recidiva até o instante de tempo considerado. Para a comparação das curvas estimadas para cada categoria dentro de uma determinada variável utilizou-se o teste não-paramétrico de LogRank. O nível de significância adotado foi de 10%.

O modelo de Riscos Proporcionais de COX foi utilizado para a identificação dos principais fatores de risco que afetam o tempo de sobrevida global e o tempo de sobrevida livre de doença. A proporcionalidade dos riscos foi avaliada através dos gráficos $\ln - \ln [s(t)]$.

Mais detalhes sobre a construção dos gráficos ou sobre os testes e modelos realizados podem ser encontrados em, por exemplo, COLOSIMO e GIOLO (2006).

4.8 Aspectos Éticos

Por se tratar de estudo retrospectivo não houve necessidade de elaboração de termo de consentimento pós-informado. Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital A.C. Camargo (parecer nº 1009/07, de 04/11/2007), bem como, pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (parecer nº 0746/08). O pesquisador comprometeu-se a manter sigilo sobre a identificação dos pacientes.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise univariada da sobrevida global e livre de doença

As variáveis epidemiológicas, sintomatologia e metástase ao diagnóstico, influenciam os tempos de sobrevida global, determinando menores taxas sobrevida. A sobrevida livre de doença parece ser influenciada apenas por sintomatologia (Tabela 1).

Tabela 1. Sobrevida global e sobrevida livre de doença em 5 anos segundo as variáveis epidemiológicas

Variável	categoria	n	SG	p	n	SLD	p
Raça	Branca	119	0,79	0,28	97	0,67	0,36
	Não branca	18	0,83		15	0,80	
Gênero	Feminino	59	0,86	0,20	50	0,76	0,75
	Masculino	78	0,73		62	0,63	
Sintomatologia	Não	78	0,87	0,01	71	0,79	0,04
	Sim	59	0,67		41	0,57	
Metástase ao diagnóstico	Não	118	0,90	<0,001	112	0,70	
	Sim	19	0,00		-	-	

Todas as variáveis clínicas consideradas parecem influenciar a sobrevida global. A sobrevida livre de doença foi influenciada apenas pelo tipo de cirurgia, sendo que os pacientes que realizaram nefrectomia parcial/laparoscópica apresentaram maior sobrevida livre de doença (Tabela 2).

Tabela 2. Sobrevida global e sobrevida livre de doença em 5 anos segundo as variáveis clínicas.

Variável	categoria	n	SG	p	n	SLD	p
ECOG	0	81	0,91	<0,001	73	0,74	0,74
	1 e 2	56	0,57		39	0,55	
ASA	1 e 2	103	0,89	<0,001	91	0,69	0,65
	3 e 4	34	0,43		21	0,85	
Tipo de cirurgia	Parcial/laparoscópica	57	0,90	0,04	50	0,78	0,02
	Radical	80	0,71		62	0,64	

Dentre as variáveis anatomopatológicas, tamanho tumoral, grau de Fuhrman, invasão venosa, necrose tumoral, margens cirúrgicas e estadiamento parecem influenciar tanto a sobrevida global quanto a sobrevida específica. A sobrevida livre de doença parece ser influenciada apenas por tamanho tumoral, grau Fuhrman, invasão venosa e estadiamento (Tabela 3).

Tabela 3. Sobrevida global e sobrevida livre de doença em 5 anos segundo as variáveis anatomopatológicas.

Variável	categoria	n	SG	p	n	SLD	p
Tamanho tumoral	≤7	98	0,91	<0,001	91	0,84	<0,001
	≥7	39	0,52		21	0,27	
Grau de Fuhrman	Alto grau	48	0,59	<0,001	30	0,53	<0,001
	Baixo grau	89	0,89		82	0,85	
Subtipo histológico	Células claras	112	0,82	0,28	93	0,64	0,16
	Não células claras	25	0,67		19	0,94	
Invasão venosa microscópica	Não	113	0,85	<0,001	73	0,68	<0,001
	Sim	24	0,65		39	0,37	
Necrose	Não	80	0,88	<0,001	73	0,68	0,30
	Sim	57	0,60		39	0,74	
Margens cirúrgicas	Negativas	127	0,80	<0,001	112	0,70	
	Positivas	10	0,60		-	-	
Estádio N	N+	10	0,27	0,79	-	-	0,50
	N0	127	0,90		112	0,70	
Estadiamento clínico TNM	I e II	98	0,92	<0,001	92	0,86	<0,001
	III e IV	39	0,48		20	0,16	

Analisando o Gráfico 1, podemos observar que em 5 anos a sobrevida global foi de 78% e a sobrevida livre de doença foi de 70%.

Gráfico 1. Estimador Kaplan-Meier para os tempos de SG (A) e SLD (B).

5.2 Modelo Múltiplo

Como se sabe tamanho tumoral patológico, estágio N e metástase são as variáveis que basicamente determinam o estadiamento clínico. Deste modo, para evitarmos problemas de multicolinearidade (Hosmer e Lemeshow, 2000) para cada tempo de sobrevida durante a seleção das variáveis, tomou-se o cuidado de ajustar modelos apenas com o estadiamento clínico e modelos sem o estadiamento clínico, mas com as três variáveis citadas anteriormente. Foram realizadas basicamente duas etapas para a obtenção dos modelos com as variáveis que mais influenciam a sobrevida de pacientes com CCR. A estratégia adotada para a seleção das variáveis do modelo múltiplo para a sobrevida global, considerando-se o estadiamento clínico, é descrita a seguir. De modo análogo os demais modelos foram obtidos.

Etapas 1: Modelos unidimensionais

Para cada tempo de sobrevida ajustaram-se 14 modelos nos quais foi avaliada a significância de cada uma das 14 variáveis de interesse separadamente. As variáveis de interesse são: idade, gênero, raça, sintomatologia, ECOG, ASA, tipo de cirurgia, grau de Fuhrman, subtipo histológico, invasão venosa, necrose, margens cirúrgicas e estágio clínico. Nessa etapa foi adotado o nível de significância de 10%. Foram selecionadas para o modelo múltiplo as variáveis: idade, hemoglobina, sintomatologia, ASA, ECOG, tipo de cirurgia, grau de Fuhrman, invasão venosa microscópica, necrose, margens cirúrgicas e estadiamento clínico.

Etapa 2: Modelos multidimensionais

Considerando as variáveis significativas da etapa 1 (12 variáveis), foi ajustado um modelo multidimensional (modelo completo). Em seguida, utilizando o teste da razão de verossimilhanças (Colosimo e Giolo, 2006), comparou-se o modelo completo com 12 modelos de interesse. Em cada um dos modelos de interesse foi excluída apenas uma das variáveis explicativas do modelo completo. Desse modo, conseguimos verificar se a variável excluída é significativa para o modelo na presença das demais variáveis. Novamente, o nível de significância adotado foi o de 10%. Permaneceram no modelo completo: idade, ASA, margens cirúrgicas e estadiamento clínico.

Na próxima etapa o modelo completo é composto pelas 4 variáveis e mais 8 modelos foram ajustados. Para cada um dos modelos foi incluída apenas uma das 8 variáveis explicativas que haviam sido excluídas. Novamente, utilizando o teste da razão de verossimilhanças, comparou-se o modelo completo com cada um dos 8 modelos ajustados. Desse modo, voltaram para o modelo completo: necrose e grau de Fuhrman.

Nessa etapa o modelo completo é composto por: idade, ASA, margens cirúrgicas, estadiamento clínico, necrose e grau de Fuhrman. Agora 3 modelos foram ajustados, sendo que, em cada modelo foi incluída cada uma das variáveis não selecionadas pela análise univariada. A variável subtipo histológico entra no modelo completo.

Finalmente, utilizando-se o teste da razão de verossimilhanças e considerando o nível de significância de 5%. Em cada um dos modelos de interesse foi excluída apenas uma das variáveis explicativas do modelo completo. Desse modo, chegou-se

a um modelo em que todas as variáveis explicativas são estatisticamente significantes. Os fatores prognósticos que se mostraram mais importantes na predição da sobrevida global do paciente com CCR foram: idade, ASA, margens cirúrgicas, grau de Fuhrman, estadiamento clínico e subtipo histológico. Os resultados obtidos para o modelo final estão resumidos na Tabela 4.

5.2.1 Sobrevida global considerando o estadiamento

Tabela 4. Resultados do ajuste do modelo para a sobrevida global (considerando o estadiamento).

Variável	Estimativa	Ep(estimativa)	RR	LI(95%)	LS(95%)	p
Idade	0,06	0,02	1,06	1,02	1,12	<0,01
ASA (3 e 4)	1,31	0,56	3,70	1,23	11,13	0,02
Margens cirúrgicas (sim)	1,34	0,63	3,81	1,10	13,21	0,04
Grau de Fuhrman (alto grau)	1,41	0,56	4,08	1,36	12,25	0,01
Estádio TNM (III e IV)	2,07	0,56	7,92	2,62	23,92	<0,001
Subtipo histológico (não céls. claras)	1,49	0,57	4,42	1,45	13,52	<0,01

ep = erro padrão, RR=Risco Relativo, LI(95%) e LS(95%) = limites inferior e superior do intervalo com 95% de confiança para o risco relativo.

As estimativas para os riscos relativos apresentados acima podem ser interpretados do seguinte modo:

- mantendo-se as demais variáveis fixadas, o risco de morte aumenta cerca de 6% para cada aumento de um ano na idade do paciente;
- mantendo-se as demais variáveis fixadas, o risco de morte para pacientes classificados na categoria 3 ou 4 da variável ASA fica multiplicado por cerca

de 4, quando comparado com o risco de morte de pacientes classificados na categoria 1 ou 2 da variável ASA;

- mantendo-se as demais variáveis fixadas, o risco de morte para pacientes que apresentaram margens cirúrgicas é cerca de 4 vezes (podendo chegar a 13), quando comparado com o risco de morte dos pacientes que não apresentaram margens cirúrgicas;
- mantendo-se as demais variáveis fixadas, o risco de morte para pacientes com alto grau Fuhrman é cerca de 4 vezes o risco de morte dos pacientes com baixo grau de Fuhrman;
- mantendo-se as demais variáveis fixadas, o risco de morte para pacientes classificados nos estádios 3 ou 4 fica multiplicado por cerca de 8, quando comparado com o risco de morte dos pacientes classificados nos estádios 1 ou 2 de estadiamento clínico;
- e finalmente, mantendo-se as demais variáveis fixadas, o risco de morte para pacientes com tumores de subtipo histológico não células claras é cerca de 4 vezes (podendo chegar a 8) o risco de morte de pacientes com tumores de subtipo histológico células claras.

5.2.2 Sobrevida livre de doença considerando o estadiamento

A principal variável e determinante de menores taxas de SLD em 5 anos foi a presença de EC III ou IV.

Tabela 5. Resultados do ajuste do modelo para a sobrevida livre de doença (considerando o estadiamento)

Variável	Estimativa	Ep(estimativa)	RR	LI(95%)	LS(95%)	p
TNM (III e IV)	2,61	0,54	13,61	4,70	39,41	<0,001

ep = erro padrão, RR=Risco Relativo, LI(95%) e LS(95%) = limites inferior e superior do intervalo com 95% de confiança para o risco relativo.

- o risco de recidiva para pacientes nos estadiamentos 3 ou 4 é multiplicado por 14, quando comparado com o risco de recidiva de pacientes nos estádios 1 ou 2.

5.2.3 Adequação dos modelos ajustados

Não temos evidências da violação da suposição de riscos proporcionais ao longo do tempo para os modelos ajustados.

5.3 Análise da associação do perfil de hipermetilação do PTEN com os principais fatores prognósticos

Analisando as tabelas 6 e 7 podemos observar que dos 137 tumores estudados apenas 5 apresentaram hipermetilação do PTEN (3,6%). Devido a essa baixa frequência não temos poder estatístico para a realização de testes que nos permitam ter evidências da associação do perfil de metilação do PTEN com os fatores prognósticos, uma vez que, os resultados obtidos possam ser advindos do acaso.

Tabela 6. Associação do perfil de metilação do PTEN com as variáveis epidemiológicas e clínicas.

		Metilação				
		Hiper		Hipo		
Variável	Categoria	n	%	n	%	Total
Idade	≤ 55	3	4,3	66	95,7	69
	>55	2	2,9	66	97,1	68
Gênero	Feminino	3	5,1	56	94,9	59
	Masculino	2	2,6	76	97,4	78
Raça	Branca	5	4,2	114	95,8	119
	Não branca	0	0,0	18	100,0	18
Sintomatologia	Não	3	3,8	75	96,2	78
	Sim	2	3,4	57	96,6	59
ECOG	0	3	3,7	78	96,3	81
	1 e 2	2	3,6	54	96,4	56
ASA	1 ou 2	3	2,9	100	97,1	103
	3 ou 4	2	5,9	32	94,1	34
Tipo de cirurgia	Parcial/laparoscópica	1	1,8	56	98,2	57
	Radical	4	5,0	76	95,0	80

Tabela 7. Associação do perfil de metilação do PTEN com as variáveis anatomopatológicas.

Metilação						
		Hiper		Hipo		
Variável	Categoria	n	%	n	%	Total
Tamanho	< 7cm	4	4,1	94	95,9	98
	>7cm	1	2,6	38	97,4	39
Grau de Fuhrman	Alto grau	1	2,1	47	97,9	48
	Baixo grau	4	4,5	85	95,5	89
Subtipo histológico	Céls claras	4	3,6	108	96,4	112
	Não céls claras	1	4,0	24	96,0	25
Invasão venosa microscópica	Não	3	2,7	110	97,3	113
Necrose	Sim	2	8,3	22	91,7	24
	Não	1	1,3	79	98,8	80
Margens cirúrgicas	Sim	4	7,0	53	93,0	57
	Não	5	3,9	122	96,1	127
Linfonodos patológicos	Sim	0	0,0	10	100,0	10
	Não	0	0,0	10	100,0	10
Estadiamento TNM	Sim	5	3,9	122	96,1	127
	I ou II	4	4,1	94	95,9	98
	III ou IV	1	2,6	38	97,4	39

5.4 Análise do impacto da hipermetilação do PTEN nas taxas de SG e SLD

Abaixo apresentamos os gráficos do estimador Kaplan-Meier para os tempos de sobrevida. Notamos que, para os cinco casos que apresentaram hipermetilação do PTEN não houve a ocorrência de nenhum evento, ou seja, morte, morte por CCR ou recorrência da doença. Novamente, devido à baixa frequência de hipermetilação do PTEN, não podemos realizar um estudo mais detalhado para a sobrevida.

Gráfico 2. Estimador Kaplan-Meier para os tempos de sobrevida global (A) e livre de doença (B), de acordo com a metilação do PTEN.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, notou-se um aumento nas taxas de incidência e mortalidade por CCR (Garcia et al., 2009). Apesar dos avanços ocorridos ao longo dos anos no diagnóstico, estadiamento e tratamento do CCR, muitos pacientes apresentam metástases ao diagnóstico e outros de baixo risco podem vir a desenvolver recorrência local ou à distância durante o seguimento.

Pelo amplo espectro de apresentação e prognósticos distintos observados no tratamento do CCR, novos fatores epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos, além dos marcadores biomoleculares, têm sido avaliados e acrescidos aos fatores já utilizados rotineiramente para melhor prever a evolução dos pacientes e estimar suas sobrevidas.

Entre os novos fatores identificados destacam-se fatores epidemiológicos, como idade ao diagnóstico, clínicos como sintomatologia e diagnóstico incidental do CCR e, aqueles relacionados à patologia tumoral como invasão venosa microscópica, necrose e tamanho tumoral, como também, a análise de marcadores imunoistoquímicos e moleculares.

O papel da idade ao diagnóstico no prognóstico do CCR é controverso. Em determinados tipos tumorais, pacientes mais jovens ao diagnóstico da neoplasia têm apresentado maior frequência de tumores indiferenciados e comportamento biológico incerto, justificando a adoção de tratamentos mais radicais na abordagem inicial (Rodriguez et al., 2002).

Na doença de von-Hippel-Lindau, o CCR geralmente se apresenta em idade mais precoce e com maior frequência de tumores localizados e de baixo grau histológico. O subtipo histológico TFE3 gene, recentemente identificado a partir da presença da translocação Xp11.2, também caracteriza-se pelo acometimento de pacientes em idade mais jovem (Verhoest et al., 2007). A associação existente entre idade e diferentes fatores clínicos, patológicos e biológicos tem permitido analisar o impacto da idade ao diagnóstico na sobrevida de pacientes portadores de CCR.

Na literatura, a frequência de pacientes portadores de CCR com idade inferior a 40 anos varia de 3,4% a 6% (Abou El Fettouh et al., 2002; Verhoest et al., 2007). Na presente série, 14 pacientes (10,2%) tiveram o diagnóstico do CCR com idade inferior a 40 anos. A não exclusão de casos de CCR familiar da análise, como também, a inclusão de pacientes operados nos últimos anos pode justificar a maior frequência observada.

Em uma casuística de 4474 pacientes, Verhoest et al. (2007) demonstraram que tumores renais diagnosticados em pacientes jovens caracterizam-se mais frequentemente pela presença de doença localizada e baixo grau nuclear, de modo que, idade inferior a 40 anos foi um fator determinante de maiores taxas de SG no modelo múltiplo. Gillett et al. (2005) e Denzinger et al. (2007) também demonstraram a associação do CCR esporádico e em idade jovem com fatores de bom prognóstico.

Nesta série, idade ao diagnóstico foi estatisticamente significativa nas taxas de SG em análise multivariada, de modo que, o risco de morte aumenta cerca de 6%, para cada aumento de um ano na idade do paciente ($p < 0,01$).

Em mais de 30.000 pacientes portadores de CCR em estágio inicial, Kuticov et al. (2010) demonstraram que o principal fator preditivo de mortalidade por causas não relacionadas ao CCR foi a idade ao diagnóstico. Segundo Hollingsworth et al. (2007), 30% dos pacientes com idade superior a 70 anos vêm a falecer por outras causas que não o CCR.

Assim, a SG ao considerar em sua análise outras causas de morte não relacionadas ao câncer parece ser influenciada pela idade nos pacientes portadores de CCR em estágio inicial e com idade mais avançada, em que achados patológicos e clínicos adversos estão ausentes e as comorbidades são mais frequentes. Para Verhoest et al. (2007), a menor sobrevida detectada em pacientes com idade mais avançada é decorrente, principalmente, do pior performance status observado neste grupo em relação a pacientes mais jovens.

O prognóstico adverso da idade jovem ao diagnóstico foi demonstrado em um estudo com pequeno número de pacientes sendo os resultados contraditórios, uma vez que, pacientes jovens apresentaram maior incidência de metástases linfonodais e sintomatologia ao diagnóstico, porém, suas taxas de sobrevida foram significativamente superiores aos pacientes com idades maiores (Ortiz et al., 2004).

Como demonstrado no presente estudo e por diferentes autores, mais de 50% dos pacientes não apresentam sintomas ao diagnóstico e têm o diagnóstico incidental da neoplasia (Luciani et al., 2000; Gudbjartsson et al., 2005; Verhoest et al., 2007; Jain et al., 2009; Sunela et al., 2010). Mudanças ocorreram no modo de apresentação do CCR ao longo dos anos, visto que, somente 10% dos pacientes eram assintomáticos na década de 70, ao passo que nos dias atuais ultrapassam 60% (Patard et al., 2004).

A casuística deste estudo é composta por pacientes submetidos a tratamento cirúrgico da neoplasia renal a partir de 1997, ano em que foi instituída e iniciada a coleta de amostras tumorais a fresco para o banco de tumores. Zequi (2008) avaliou 110 pacientes portadores de CCR tratados cirurgicamente entre os anos de 1980 e 2005 na mesma instituição do presente estudo, e somente 40% dos pacientes eram assintomáticos comparados aos 56% de pacientes com diagnóstico incidental identificados nesta série.

Exemplo do impacto do diagnóstico incidental do CCR está na menor frequência da clássica tríade de Virchow, bem como, na redução da média do tamanho tumoral ao diagnóstico (Pantuck et al., 2001; Volpe e Jewet 2005).

A clássica tríade de Virchow, descrita inicialmente com frequência de até 10%, tornou-se uma síndrome rara de modo a não ultrapassar frequências de 3 a 5,5% (Kirkali e Obek (2003). Nos 137 pacientes analisados, somente um paciente (0,7%) apresentou a tríade clássica, valor este igual ao apresentando por Sunela et al. (2010) em 970 pacientes analisados.

Dados do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* (MSKCC) demonstram uma redução significativa da média do tamanho tumoral do CCR ao diagnóstico, variando de um valor máximo de 7,3 cm para 5,8 cm nos últimos anos (Lee et al., 2000). No presente estudo, a média do tamanho tumoral ao diagnóstico foi de 6,24 cm e superior à detectada pelo MSKCC. A realização mais rotineira de exames complementares em uma população de maior risco para o desenvolvimento do CCR e que apresenta valores crescentes de índices de massa corpórea, podem ter contribuído para o diagnóstico do CCR em dimensões menores.

Em 729 pacientes analisados, Patard et al. (2004) identificaram um aumento significativo no diagnóstico de tumores renais menores que quatro centímetros e que atualmente representam 26,9% das neoplasias diagnosticadas, quando comparado ao período de 1984 a 1992 em que somente 12,2% das neoplasias apresentavam menos do que quatro centímetros. Na presente série, 27% das 137 neoplasias analisadas apresentavam tamanho inferior a quatro cm (pT1a), valor muito próximo ao encontrado por Patard et al. (2004), demonstrando a tendência no diagnóstico mais precoce do CCR.

Analisando a casuística de pacientes tratados na mesma instituição entre os anos de 1980 a 2005, o tamanho tumoral foi de 7,38 cm, demonstrando uma redução de cerca de um cm ao longo dos anos. Esta redução do tamanho tumoral observada ao longo dos anos é importante, pois pode representar a migração “downstaging” de um estágio patológico T2 para um estágio de melhor prognóstico como o estágio pT1b e, conseqüentemente, resultar no aumento das taxas de sobrevida, principalmente nas neoplasias localizadas, em que o tamanho tumoral é o principal fator prognóstico.

Um estudo realizado pela Universidade de Michigan e com grande casuística demonstrou que o modo de apresentação do CCR, sintomático versus incidental, foi uma variável independente para a sobrevida livre de doença dos pacientes analisados (Lee et al., 2002). Patard et al. (2004) encontraram taxas de sobrevida significativamente maiores para os pacientes com diagnóstico incidental versus sintomáticos, sendo respectivamente, de 85,3% e 62,5%. Ficarra et al. (2007) demonstraram as menores taxas de sobrevida para os pacientes sintomáticos ao

diagnóstico que correspondeu a 43,3% em 5 anos, porém, deve-se considerar que neste estudo foram incluídos somente pacientes portadores de estádios pT3 e pT4.

Nesta série, as taxas de sobrevida global e livre de doença foram significativamente diferentes em análise univariada, mas não houve significância no modelo múltiplo em relação à presença de sintomas ao diagnóstico. Fatores relacionados diretamente ao paciente como idade e ASA parecem melhor determinar a evolução nas neoplasias predominantemente localizadas.

Segundo Patard et al. (2004), o CCR pode ser classificado em três grupos de acordo com a sintomatologia ao diagnóstico: tumores assintomáticos, tumores com sintomas locais ou com sintomas sistêmicos. A sobrevida de pacientes portadores de tumores com sintomas sistêmicos é significativamente inferior às demais.

No presente estudo, a maior frequência de sintomas relacionados com doença localizada, como hematúria e dor, e a menor frequência de febre e emagrecimento, presentes em somente cerca de 8% dos pacientes e associados mais frequentemente a doença metastática (Karakiewicz et al., 2006), podem ter contribuído para a ausência de significância de sintomatologia no modelo multivariado. Denzinger et al. (2007) também não detectaram o impacto da presença de sintomatologia ao diagnóstico nas taxas de sobrevida em modelo múltiplo, ao analisar 1042 pacientes portadores de CCR localizado.

Avanços tecnológicos ocorridos nos últimos anos nos métodos diagnósticos e de estadiamento, assim como nas técnicas cirúrgicas, permitiram o aumento no número de nefrectomias parciais, representando 60% das cirurgias empregadas no tratamento do CCR (Van Poppel et al., 2007). Crepel et al. (2010) analisaram os dados do *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER) quanto as frequências

de nefrectomia parcial realizadas em diferentes instituições dos EUA entre os anos de 1988 a 1990, 1991 a 2000 e 2001 a 2004 e, encontraram taxas de 4,0%, 34,9% e 61,1%, respectivamente.

Apesar da casuística do presente estudo ser composta principalmente por pacientes operados após o ano de 2000, a nefrectomia parcial foi realizada com menor frequência à demonstrada por Crepel et al. (2010) entre os anos de 2001 e 2004, podendo refletir diferenças no acesso aos recursos diagnósticos, que permitem o diagnóstico mais precoce do CCR, como também a inclusão de instituições com grandes volumes de cirurgias/ano e consideradas referências para a realização deste tipo de procedimento.

Diferentes estudos mostram que até 30% dos pacientes portadores de CCR são metastáticos ao diagnóstico e apresentam taxas de sobrevida limitadas (Lam et al., 2005; Lam et al., 2009). O predomínio de tumores localizados e diagnosticados incidentalmente nesta série pode justificar a menor frequência de 14,4% pacientes que apresentavam metástase ao diagnóstico inicial.

No presente estudo, metástase ao diagnóstico foi determinante de menores taxas de sobrevida global em análise univariada. No modelo múltiplo, EC III e IV foi a variável mais significativa, mas considerando que o EC IV inclui pacientes portadores de metástase ao diagnóstico, uma vez que, um número pequeno de pacientes era portador de EC IV em decorrência da presença de linfonodos positivos.

Diferentes estudos tem demonstrado o valor prognóstico do ECOG na sobrevida de pacientes portadores de CCR localizado ou metastático (Uno et al., 2004; Lam et al., 2005; Karakiewicz et al., 2007), permanecendo controversa a

aplicação da classificação do ASA na definição do performance status e estimativa da sobrevida dos pacientes.

Nesta série, predominaram pacientes de baixo risco cirúrgico e representados em 75% dos casos por ASA 1 e 2, 23% por ASA 3 e somente um paciente (0,7%) ASA 4. Apesar dos critérios subjetivos utilizados na definição do ECOG e do ASA e do ECOG não considerar as doenças associadas apresentadas pelos pacientes e que exigem tratamento, as frequências foram semelhantes ao predominar pacientes ECOG 0 e 1 e ASA 1 e 2 e, não terem sido identificados pacientes ECOG 3 e 4, ASA 5 e um único paciente era ASA 4.

As taxas de sobrevida global para os pacientes ASA 1 e 2 versus 3 e 4 foram significativamente diferentes, 88,6% e 43,2%, respectivamente. Em análise multivariada, pacientes portadores de ASA 3 e 4 tiveram risco de morte até quatro vezes superior aos pacientes portadores de ASA 1 e 2. Zequi et al. (2010) encontraram taxas de sobrevida de 95,7%, 71,1% e 39,8% para ASA 1, 2 e 3, respectivamente, e risco de morte três vezes superior para pacientes portadores de ASA 3.

A praticidade, simplicidade e assimilaridade por cirurgiões da escala do ASA envolvidos diretamente no tratamento desta neoplasia, permitem sua utilização na avaliação prognóstica do CCR, necessitando de novos estudos com maior número de pacientes e de diferentes instituições para comprovar sua aplicação na seleção de pacientes candidatos a tratamentos adjuvantes ou à participação em ensaios clínicos e que atualmente é definida através da escala do ECOG e Karnofski.

O tratamento cirúrgico e prognóstico dos tumores renais localizados (EC I e II) é definido principalmente pelo tamanho tumoral (Becker et al., 2006). Nesta série,

predominaram os tumores renais localizados, de modo que, 62% dos casos eram pT1a e pT1b. A nefrectomia radical foi o procedimento mais realizado em 58,4% dos casos, seguida da nefrectomia parcial em 39,4% dos casos. Embora a nefrectomia parcial tenha indicação principal no tratamento dos tumores de até quatro cm, alguns estudos têm demonstrado baixas taxas de recorrência e elevadas taxas de sobrevida no tratamento de tumores de até sete cm (Crepel et al., 2010).

Apesar desta série demonstrar maior frequência de tumores localizados, a nefrectomia radical foi o procedimento mais frequente, demonstrando que outros fatores como localização em terço medial, acometimento de via excretora renal e experiência do cirurgião são importantes na indicação dos procedimentos parciais, além do tamanho tumoral (Leibovich et al., 2004).

A cirurgia surge como a única opção potencialmente curativa no CCR, e a presença de margens cirúrgicas comprometidas têm sido reportadas na literatura com baixas frequências, inferiores a 6,3% (Zucchi et al., 2002; Porpiglia et al., 2005). Em 809 pacientes portadores de CCR e submetidos a procedimento cirúrgico parcial, Bernhard et al. (2010) identificaram 12 casos (1,5%) de margens cirúrgicas comprometidas que foram determinantes na análise multivariada de maior recorrência tumoral.

Na presente série, a frequência de margens cirúrgicas comprometidas foi superior à descrita na literatura, sendo de 7,3%. O tipo de cirurgia (parcial x radical), a extensão tumoral detectada no intra-operatório e justificada pela presença de casos pT3a, pT3b e pT4, assim como, a presença de doença multifocal podem justificar os casos com margens positivas.

Zucchi et al. (2002) não demonstraram o impacto negativo de margens

positivas na sobrevida câncer específica de 63 pacientes, porém, foram analisados casos de bom prognóstico e tratados com procedimentos parciais. Segundo Sengupta e Zincke (2005), margens cirúrgicas positivas estão mais associadas à recorrência local, e no presente estudo foram, em análise multivariada, determinantes de maior risco de morte justificando, sempre que possível, a ressecção completa da lesão com margens cirúrgicas negativas.

Entre os 137 pacientes, três (2,2%) pacientes foram tratados através de cirurgia laparoscópica, que nos dias atuais é considerada a via de abordagem principal para as neoplasias T1-T3aN0M0, apresentando resultados similares a nefrectomia radical em termos de complicações e sobrevida (Abreu e Gill 2003).

Nesta série, não ocorreram recorrências ou mortes nos pacientes operados por via laparoscópica, mas deve-se considerar o viés de seleção, pois foram incluídos neste tipo de tratamento somente pacientes de bom prognóstico, uma vez que, a maioria apresentava tumor inferior a quatro cm e ausência de achados adversos aos exames pré-operatórios. Devido ao pequeno número de cirurgias laparoscópicas nesta série, sua análise torna-se limitada e pelo bom prognóstico observado ela foi analisada conjuntamente com a nefrectomia parcial.

Apesar de diferentes estudos demonstrarem não haver diferenças nas taxas de sobrevida entre pacientes submetidos a NP ou NR, a NP está significativamente associada a melhor qualidade de vida e menor incidência de insuficiência renal crônica (Leibovich et al., 2004; Becker et al., 2006; Crepel et al., 2010).

Nesta série, os pacientes submetidos à nefrectomia radical apresentaram em análise univariada taxas de SG e SLD em 5 anos inferiores aos pacientes tratados com procedimentos parciais, devido provavelmente a maior associação a tumores de

pior prognóstico. As taxas de SG para os pacientes tratados com NP foram de 90% e, segundo Uzzo e Novick (2001), variam de 72 a 100% mediante uma revisão sistemática da literatura e casuística de 1833 pacientes.

Novos fatores prognósticos dependentes do próprio tumor, destacando-se: presença de invasão venosa microscópica e necrose tumoral têm sido avaliados e apresentado resultados conflitantes na literatura, permanecendo muitas vezes o estadiamento patológico como a principal variável (Ishimura et al., 2004).

Nesta série, procuramos avaliar o potencial prognóstico da presença de invasão venosa microscópica e necrose tumoral, porque, além de serem variáveis disponíveis nos laudos anatomopatológicos após o tratamento cirúrgico do CCR, a casuística é composta em sua maioria por tumores localizados e que por não apresentarem achados adversos como: invasão de glândula adrenal, veia renal e linfonodos positivos, constituem um grupo em que novos fatores são necessários e que procurem justificar as recorrências observadas.

No CCR a extensão venosa macroscópica com invasão direta da parede vascular tem demonstrado em diferentes estudos um pior prognóstico (Uno et al., 2004; Lam et al., 2005; Furniss et al., 2008; Lam et al., 2009), mas poucos demonstram o impacto da invasão venosa microscópica na sobrevida dos pacientes portadores de CCR.

Van Poppel et al. (1997), Gonçalves et al. (2004) e Dall'Oglio et al. (2008) demonstraram correlação estatisticamente significativa entre a presença de IVM e fatores de pior prognóstico, como alto grau de Fuhrman, linfonodos histologicamente positivos e variante sarcomatóide. No presente estudo, invasão venosa microscópica foi detectada com frequência inferior à encontrada por van Poppel et al. (1997) e

Gonçalves et al. (2004), pois somente 16,5% dos pacientes analisados a apresentavam.

Esta menor frequência observada é devido ao predomínio de tumores de baixo grau, localizados e assintomáticos ao diagnóstico, diferindo do estudo de van Poppel et al. (1997) em que predominaram tumores pT2 e pT3 e nenhum tumor classificado como pT1 apresentou invasão venosa microscópica.

No estudo de Gonçalves et al. (2004) a casuística é composta em sua maioria por pacientes sintomáticos ao diagnóstico e operados de 1988 a 1999 e que podem estar associados mais frequentemente a fatores de pior prognóstico como a IVM. Analisando somente casos de CCR localizado, Zubac et al. (2008) encontraram baixa frequência de IVM, pois somente 7 pacientes (9%) de 76 analisados apresentavam IVM.

Para van Poppel et al. (1997), Gonçalves et al. (2004) e Zubac et al. (2008) IVM foi uma variável independente nas taxas de SLD dos pacientes submetidos a tratamento cirúrgico do CCR. Segundo Dall'Oglio et al. (2008) a presença de IVM foi o principal fator prognóstico para a recorrência ou morte pelo CCR, pois o risco de morte foi aproximadamente 5 vezes maior no grupo de pacientes que apresentavam IVM.

No presente estudo, a presença de invasão venosa microscópica foi uma variável significativa e de impacto negativo na SG e SLD pela análise univariada, pois as taxas de SG e SLD foram de 65% versus 85% ($p<0,001$) e 37% versus 68% ($p=0,002$), respectivamente.

Além do impacto prognóstico demonstrado pela IVM no CCR, a sua pesquisa é um procedimento simples e evidenciado na maioria das vezes pela técnica da

hematoxilina-eosina, necessitando em raras ocasiões de complementação imunoistoquímica para o esclarecimento diagnóstico. A pesquisa de IVM também não sofre influência de fatores subjetivos e determinantes de variância intra e inter-observadores como é observado na avaliação do grau histológico (Lang et al., 2004).

Nosso estudo corrobora outros descritos na literatura em que pacientes que apresentam IVM em seus produtos de nefrectomia tem menores taxas de sobrevida. A pesquisa de IVM deve ser, sempre que possível, reportada pelo patologista e considerada no seguimento de pacientes tratados cirurgicamente, devido ao maior risco de recorrência observado nos diferentes estudos e associação com outros fatores determinantes de pior evolução.

Acredita-se que a necrose tumoral identificada nos produtos de nefrectomia esteja relacionada à hipóxia, mediante a desproporção entre o crescimento tumoral acelerado e sua vascularização (Mancini et al., 2008). Rey Rey et al. (2010) encontraram 36% de necrose tumoral em uma casuística composta principalmente por tumores pT1a e pT1b e demonstraram sua associação com outros fatores de pior prognóstico como: alto grau de Fuhrman, invasão vascular e achados sarcomatóides.

Na presente série, necrose tumoral esteve presente em 41% dos casos e demonstrou frequência semelhante à descrita por Rey Rey et al. (2010), considerando na casuística a existência de 61,6% de tumores pT1a e pT1b.

Abel et al. (2010) encontraram 21,6% de necrose tumoral em 925 pacientes analisados e a menor frequência identificada poderia ser decorrente da exclusão de casos metastáticos e localmente avançados na análise. Lam et al. (2005) identificaram 54% de necrose em 311 pacientes analisados, sendo que a metodologia adotada para a pesquisa de necrose pode justificar a frequência elevada, uma vez que,

para atingir o objetivo principal foram realizados cortes mais seriados da peça cirúrgica.

O impacto negativo da presença de necrose tumoral nas taxas de sobrevida foi demonstrada por Lam et al. (2005), Rey Rey et al. (2010) e Abel et al. (2010). Lam et al. (2005) e Abel et al. (2010) demonstraram que a presença de necrose tumoral foi determinante de menor SLD em modelo múltiplo. Nesta série, e semelhante ao estudo de Rey Rey et al. (2010), necrose tumoral foi determinante de menor SG em análise univariada, permanecendo outros fatores como o estadiamento no modelo múltiplo.

Deve-se considerar que a falta de padronização em sua definição histológica, de modo que, alguns estudos consideraram a necrose macroscópica e em outros microscópica ou até mesmo sua associação pode também justificar os diferentes resultados encontrados, assim como, limitar a inclusão de necrose tumoral como fator prognóstico no CCR. Novos estudos são necessários para definir a metodologia de pesquisa mais adequada e seu potencial prognóstico, uma vez que sua pesquisa é relativamente simples e de baixo custo (Isbarn et al., 2010).

Há grande heterogeneidade entre os subtipos histológicos renais, sendo que cada subtipo se caracteriza por padrões genéticos específicos, como também de associações a síndromes hereditárias e resposta às terapias sistêmicas, resultando em prognósticos e associações clinicopatológicas distintas. Poucos estudos na literatura demonstram significância do subtipo histológico em análise múltipla (Leibovich et al., 2010).

Esta dificuldade em definir o subtipo histológico no CCR, foi demonstrada por Kümmerlin et al. (2008) em que houve apenas concordância moderada entre

cinco patologistas ao analisar 28 casos de CCR, sendo necessária muitas vezes, a utilização de métodos imunoistoquímicos e citogenéticos, além da hematoxilina-eosina para a confirmação histológica, principalmente entre as neoplasias com predomínio de células eosinofílicas e padrão de crescimento papilar.

A concordância apenas moderada demonstrada por Kümmerlin et al. (2008) pode justificar as diferentes frequências e as taxas de sobrevida observadas na literatura, uma vez que, é necessário para o diagnóstico correto a presença de patologistas experientes devido a grande heterogeneidade entre os subtipos, considerando algumas situações em que predominam padrões não frequentes de apresentação histológica e recursos diagnósticos mais sofisticados, como a análise por hibridização *in situ* e pesquisa de mutações através de sequenciamento gênico direto precisam estar disponíveis para complementar a análise por hematoxilina-eosina.

Outra crítica aos estudos que avaliam o subtipo histológico com fator prognóstico é que em muitos deles não houve revisão do material emblocado em parafina, que segundo Ficarra et al. (2006) pode mudar o diagnóstico em mais de 50% dos casos no CCR.

Na análise do material mais antigo havia a tendência do patologista em classificar o CCR em células claras mediante o achado de características típicas deste subtipo e, muitas vezes, negligenciava o diagnóstico dos subtipos papilífero e cromóforo, principalmente antes da classificação de Heildelbrg que foi estabelecida em 1997 ao acrescentar novos métodos de origem genética, molecular e imunológica no diagnóstico do CCR (Magyarlaki et al., 2001).

Diversos autores têm demonstrado um melhor prognóstico para os subtipos papilífero e cromóforo em relação ao de células claras (Cheville et al., 2003; Ficarra et al., 2006). Porém, essa análise pode ter sido prejudicada pelas diferentes frequências observadas, de modo a formar o subtipo papilífero e cromóforo um grupo com número pequeno de pacientes limitando assim sua comparação e conclusão de melhor sobrevida para estes subtipos em relação ao de células claras.

Nesta série, já que aproximadamente 80% da casuística foi composta por carcinoma renal de células claras e um reduzido número de casos papilíferos e cromóforos, mas condizentes com os dados da literatura, foi optado por analisar os pacientes de acordo com o subtipo histológico em dois grupos, sendo divididos em portadores de células claras e não células claras.

No presente estudo, o subtipo histológico foi uma variável significativa nas taxas de SG na análise univariada, identificando-se menor SG para o grupo não células claras. Na análise multivariada, pacientes portadores de tipo histológico não células claras apresentaram risco de morte superior ao subtipo histológico células claras, contrariando os dados observados na literatura ($<0,01$).

A menor SG identificada no grupo células claras pode ser decorrente da composição do grupo em que estão presentes subtipos histológicos de pior prognóstico em relação ao de células claras, tais como: carcinoma renal indiferenciado e ductos coletores (Amin et al., 2002; Volpe e Patard 2010). Componentes sarcomatóides e a presença de CCR subtipo papilífero tipo II, frequentemente associado a tumores de alto grau e metástase à distância, pode também ter contribuído para as menores taxas de sobrevida observadas neste grupo (Volpe e Patard 2010).

Fuhrman et al. (1982) descreveram inicialmente o grau para a variante de células claras e quatro graus foram definidos, resultando em taxas de sobrevida significativamente diferentes para os graus 1, 2, 3 e 4, sendo respectivamente, 64%, 34%, 31% e 10%. Segundo Ficarra et al. (2005) e Garcia et al. (2009), as taxas de sobrevida variam de 50 a 97%, 30 a 90%, 10 a 78% e 9 a 66% para os graus 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Nesta série, predominaram neoplasias de baixo grau em 65% dos casos e, segundo Bretheau et al. (1995), têm sido detectadas mais frequentemente em neoplasias renais localizadas. No presente estudo, grau de Fuhrman foi determinante de menores taxas de SG e SLD em análise univariada. Pacientes portadores de grau I e II tiveram SG de 89% versus 59% para os graus III e IV ($p<0,001$). Em relação à SLD, pacientes portadores de neoplasias grau I e II tiveram 85% de sobrevida versus 53% dos pacientes portadores de CCR graus III e IV ($p=0,02$).

As diferentes taxas de sobrevida observadas na literatura são decorrentes da variância inter e intra-observadores, cuja concordância tem sido apenas moderada entre os patologistas, da inclusão de outros subtipos e não células claras, além das diferentes técnicas de fixação do material utilizadas na determinação do grau histológico (Al-Aynati et al., 2003; Ficarra et al., 2005; Novara et al., 2007).

Recentemente, tem sido questionada a utilização do grau de Fuhrman para outros subtipos, como o cromóforo. Para Paner et al. (2010) o grau de Fuhrman não foi uma variável significativa no modelo múltiplo ao analisar exclusivamente tumores cromóforos, sugerindo a utilização de uma graduação histológica própria para este subtipo.

Diferindo do estudo de Paner et al. (2010), mas de acordo com diferentes

estudos na literatura (Ficarra et al., 2005; Gudbjartsson et al., 2005; Jain et al., 2009), o grau de Fuhrman foi uma variável significativa na SG em modelo múltiplo, identificando-se maior risco de morte para pacientes portadores de tumores de alto grau.

Em relação ao tamanho tumoral patológico, as seguintes frequências foram obtidas para os tumores T1a, T1b, T2, T3a, T3b e T4, respectivamente: 27%, 35%, 10,9%, 13,9%, 8,8% e 4,4%.

Os tumores pT2 corresponderam a 10,8% dos CCR e foram menos frequentes que os pT1a, pT1b e pT3a. A invasão de seio renal (pT3a) corresponde ao principal sítio de extensão tumoral extra-renal, tornando-se mais frequente quando o tumor ultrapassa quatro cm. Bonsib et al. (2005) identificaram 68% de invasão de seio renal em tumores superiores a quatro cm, podendo chegar a 97% quando o tumor atingia mais de sete cm, demonstrando a relativa infrequência dos tumores pT2.

A análise minuciosa do produto de nefrectomia para tumores maiores que quatro cm resultou no aumento do número de tumores pT3a diagnosticados, tornando os tumores pT2 relativamente infrequentes. Concomitante ao aumento de casos pT3a, o diagnóstico incidental do CCR resultou no aumento de tumores pT1a e pT1b, que atualmente correspondem a mais de 50% dos CCR diagnosticados.

A frequência de tumores pT3b e pT3c variam de 16% a 33% e 4% a 13%, respectivamente (Lam et al., 2005). A ausência de tumores pT3c nesta série é justificada pelos seguintes fatores: baixa frequência deste tipo de apresentação, predomínio de tumores localizados que são tumores que quando diagnosticados necessitam de centros especializados para tratamento e que disponham de circulação extracorpórea e hipotermia, nem sempre presentes em muitos hospitais.

Entre os 137 pacientes analisados neste estudo, 79 pacientes (56,8%) eram pN0, 49 pacientes (35,3%) pNx e 11 pacientes (7,9%) apresentavam pN+. A frequência de pN+ está de acordo com a literatura e, segundo Volpe e Patard (2010), varia de 2 a 9% para tumores localizados e até 45% na presença de doença localmente avançada ou metastática. A ausência de linfonodos nos espécimes cirúrgicos dos 49 pacientes (35,3%) é justificada pela realização de nefrectomias parciais que corresponderam a 40% do total das cirurgias e pelo valor prognóstico controverso na remoção dos linfonodos.

Apesar das menores taxas de SG e SLD terem sido observadas entre os pacientes portadores de doença linfonodal histologicamente positiva, não houve significância estatística pela análise univariada e múltipla, permanecendo o estadiamento TNM como a principal variável prognóstica.

Nesta série, 84 pacientes (61,9%) foram estadiados como estágio clínico (EC) I, 13 pacientes (9,4%) como EC II, 22 pacientes (15,8%) EC III e 18 pacientes (12,9%) como EC IV.

Patard et al. (2004) demonstraram redução, embora não significativa, no diagnóstico de tumores avançados ao longo dos anos, entre os anos de 1984 a 1992 correspondia a 46% dos tumores renais diagnosticados, ao passo que, entre os anos 1998 e 2003 correspondeu a 43% dos casos. Zequi (2009) contando com casuística semelhante porém considerando casos operados desde 1980 até 2005, encontrou aproximadamente 60% de casos EC I e II e 40% de casos EC III e IV.

No presente estudo, analisando somente casos operados a partir de 1997, aproximadamente 70% dos casos corresponderam a tumores localizados (EC I e II), demonstrando a evolução no diagnóstico no CCR e diferindo do passado em que

predominavam tumores mais avançados (EC III e IV) (Pantuck et al., 2001; Patard et al., 2004).

Campbell et al. (2007) demonstraram diferentes taxas de sobrevida de acordo com estadiamento TNM através da análise de 20 estudos. As taxas variaram de 80 a 100% para o estágio I, 60 a 80% para o estágio II, 40 a 60% para estágio III e 0 a 10% para o estágio IV.

Nos 137 pacientes analisados, as taxas de SG em 5 anos de acordo com o EC I e II versus III e IV foram, respectivamente, de 92% e 41% ($p < 0,001$). No modelo múltiplo, foi observado um risco de morte para pacientes classificados nos estádios III e IV multiplicado por cerca de oito quando comparado com o risco de morte dos pacientes classificados nos estádios I ou II do TNM 2004.

O EC foi a única variável a influenciar a SLD na análise multivariada, identificando-se maior risco de recidiva para pacientes nos estádios III ou IV em relação aos pacientes estadiados como I ou II.

Sabidamente, o estadiamento clínico ao considerar os seguintes fatores: tamanho tumoral, invasão de seio renal, cápsula perirrenal ou adrenal, veia renal, veia cava inferior, linfonodos histologicamente positivos e metástases à distância, torna-se a principal variável prognóstica e determinante da evolução de pacientes portadores de CCR (Volpe e Patard 2010).

A análise dos principais fatores prognósticos no CCR na presente série permitiu demonstrar a evolução no diagnóstico mais precoce e tratamento conservador do CCR nas últimas décadas, tendo sido reportado por muitos autores na literatura, prevalecendo as neoplasias de baixo grau e em estágio inicial. As taxas de

sobrevida também aumentaram e são comparáveis às de grandes centros com grandes volumes de cirurgia/ano no tratamento do CCR.

Mesmo com a evolução no diagnóstico e tratamento do CCR ao longo dos anos, recorrências têm sido observadas em neoplasias pequenas, de baixo grau histológico e subtipo histológico não células claras. Rathmell et al. (2005) e Volpe e Jewwet (2005) demonstraram que cerca de 10% das neoplasias renais localizadas e consideradas de bom prognóstico no pré-operatório, apresentam alto grau histológico e potencial biológico agressivo, sugerindo a utilização de marcadores moleculares e imunoistoquímicos na avaliação do perfil molecular e melhor definição do tratamento.

Acreditamos que, futuramente, o diagnóstico pré-operatório através de biópsia renal, o tratamento conservador ou não do parênquima e o prognóstico do CCR possa ser estabelecido a partir da análise dos mecanismos moleculares e dos principais genes e proteínas envolvidos na carcinogênese renal. Técnicas mais recentes de DNA ou RNA microarray têm possibilitado analisar simultaneamente milhares de genes e proteínas e estimar o prognóstico no CCR.

Apesar do uso de novas técnicas baseadas em arrays, o maior problema está em transferir todos estes avanços alcançados em laboratórios de patologia molecular para a prática clínica diária, uma vez que, diferentes vias de carcinogênese são responsáveis pela progressão tumoral renal e que milhares de proteínas podem ser expressas por um único gene, limitando o desenvolvimento de tratamentos direcionados às alterações moleculares principais que resultem em respostas clínicas completas nas neoplasias metastáticas ou que reduzam o risco de recorrência nas neoplasias de pior prognóstico.

No CCR, o PTEN é visto como um dos principais genes, uma vez que, sua hipoeexpressão IIQ está associada a neoplasias de alto grau histológico e menores taxas de SLD e sua inativação, mediante mutação, deleção ou hipermetilação, resulta em maior atividade de moléculas pró-mitóticas como o gene PI3K e a proteína Akt, que atualmente têm sido alvos de tratamentos do CCR metastático (Samuels e Ericson 2006; Gericke et al., 2006). A frequência de metilação do PTEN e o impacto na sobrevida de pacientes portadores de CCR são desconhecidos.

Nesta série, a hipermetilação do PTEN foi identificada com frequência de 3,6% entre as 137 amostras analisadas. A frequência de hipermetilação do PTEN varia entre os diferentes tipos tumorais. No câncer gástrico e de glândulas salivares não foram identificados casos de metilação do gene (Sato et al., 2002; Kishi et al., 2004), ao passo que, nos glioblastomas multiformes (GBM), cérvix uterina, sarcoma partes moles, melanoma, ovário e mama havia metilação do PTEN em 35%, 26%, 13%, 62%, 58% e 14,3%, respectivamente (Baeza et al., 2003; Cheung et al., 2003; Kawaguchi et al., 2006; Mirmohammadsade et al., 2006; Tam et al., 2007; Muggerud et al., 2010). A Tabela 8 demonstra os principais estudos sobre metilação do PTEN.

Tabela 8. Principais estudos na avaliação do perfil de hipermetilação do PTEN em diferentes tipos neoplásicos.

Autor	Tipo neoplásico	Metodologia	N	Metilação PTEN (%)
Sato et al., (2002)	Estômago	MS-PCR	68	0
Baeza et al., 2003,	GBM	MS-PCR	77	35
Cheung et al., 2003	Cérvix uterina	MS-PCR	62	58
Kishi et al., 2004	Glândulas salivares	MS-PCR	36	0
Kawaguchi et al. (2006)	Sarcoma partes moles	MS-PCR	48	13
Mirmohammadsade et al., 2006	Melanoma	Pirosequenciamento	37	62
Tam et al., 2007	Ovário	MS-PCR	89	28,8
Kim DS et al. (2010)	Pulmão	MS-PCR	137	2,9
Muggerud AA et al., 2010	Mama	Pirosequenciamento	28	14,3
Sadeq et al. (2010)	Mama	MS-PCR	53	70

As frequências de metilação do PTEN diferem entre os tipos neoplásicos, variando de 0 a 70%. Para Kishi et al. (2004), as neoplasias dividem-se em dois grupos: aquelas que apresentam o genoma extensamente metilado e aquelas em que a metilação é um evento raro na carcinogênese. Considerando a importância do PTEN na carcinogênese renal e a baixa frequência de metilação do gene detectada no presente estudo, o CCR corresponderia a um conjunto de neoplasias em que a metilação do DNA seria um evento raro na carcinogênese.

As diferentes frequências podem ser justificadas por vias de carcinogênese próprias para cada tipo neoplásico, método e metodologia empregados para a análise

e interpretação dos resultados, exposição a carcinógenos e metilação de genes específicos, como também ao primer PTEN utilizado em cada estudo.

Segundo Cantley e Neel (1999) e Yim et al. (2009), a via do PTEN/PI3K e Akt está mais frequentemente alterada em neoplasias de endométrio, próstata, mama, pulmão, melanoma e rim, podendo justificar uma maior frequência de alterações epigenéticas e/ou genéticas destes genes nestas neoplasias.

Para Baylin e Ohm (2006) a metilação pode ocorrer em qualquer fase da progressão tumoral, porém, mais frequentemente em lesões pré-neoplásicas e neoplasias em estágio inicial. O evento epigenético ocorrendo precocemente na carcinogênese ocasiona alterações celulares, que predisõem a ocorrência de mutações e deleções em uma fase mais tardia da progressão tumoral (Baylin e Ohm 2006; Muggerud et al., 2010).

Assim, teoricamente, a análise de neoplasias em estágio inicial poderia demonstrar maior frequência de metilação em relação à neoplasias em estágio avançado e metastático, contribuindo também para as diferentes frequências observadas entre os estudos.

O pirosequenciamento e a técnica de MS-PCR são os principais métodos de avaliação de metilação utilizados na literatura. Estudos que empregam MS-PCR podem apresentar maiores frequências de metilação em relação ao pirosequenciamento, em virtude de resultados falso-positivos. Estes resultados seriam decorrentes da análise não quantitativa realizada pela MS-PCR, em que material fluorescente vai sendo liberado pela ação da enzima *Taq*-polimerase a medida que probes específicos vão sendo incorporados às sequências nucleotídicas

específicas metiladas ou não, impactando assim as condições da PCR nos resultados obtidos (Shames et al., 2007).

Tão importante quanto à metodologia empregada ou as condições da PCR, é a escolha do primer PTEN, para que não ocorram resultados falsos positivos mediante a correta diferenciação do verdadeiro PTEN com o pseudogene localizado no cromossomo 9p21 e que apresenta 98% de mesma sequência nucleotídica, conforme demonstrado por Zysman et al. (2002). Primers que amplificam as sequências nucleotídicas de 399 a 250 são comuns entre o verdadeiro PTEN e o pseudogene e podem apresentar resultados falso-positivos (Zysman et al., 2002).

Apesar da baixa frequência detectada, cuidados como a análise de 27 sítios CpG entre os nucleotídeos 795 a 606 e a utilização de controles positivos e negativos demonstraram que não houve interferência do pseudogene nos resultados, assim como, casos hipermetilados realmente apresentavam metilação e os hipometilados não a apresentavam, analisando os resultados com base nas frequências de metilação identificadas no tecido renal normal.

Para evitar limitações do pirosequenciamento quanto à extensão de pares de bases a serem analisadas (Tost e Gut 2007), foram utilizados dois primers que avaliaram separadamente as ilhas de 1 a 11 e 12 a 27, permitindo a obtenção das frequências de metilação e a inclusão de sítios não avaliáveis por outros métodos, como MS-PCR.

A baixa frequência de metilação do DNA nesta série pode ser devido ao fato da metilação não ser o mecanismo molecular principal de inativação do PTEN durante a carcinogênese renal. No câncer de pulmão e sarcomas de partes moles, metilação do PTEN foi detectada com frequências de 2,9% e 13%, respectivamente,

embora a hipoexpressão IIQ do gene seja reportada com frequências de até 70% no carcinoma de pulmão e 29% no sarcoma de partes moles, demonstrando que a metilação da região promotora do PTEN não foi um mecanismo importante de inativação do gene segundo os autores (Kawaguchi et al., 2006; Kim et al., 2010).

Kim et al. (2010) demonstraram que características genéticas da população do estudo também podem influenciar nas frequências de metilação. O gene MGMT (DNA methyltransferase 6 methylguanine) está mais frequentemente metilado na população ocidental em relação à oriental, ao passo que, o gene p16 está mais metilado em pacientes chineses. Alterações do EGFR têm sido mais reportadas em pacientes não tabagistas, do sexo feminino e asiáticas. Assim, a baixa frequência de metilação do PTEN no presente estudo pode ter sido influenciada por características genéticas próprias da população estudada.

Velickovic et al. (2002) demonstraram que alterações do VHL são mais frequentes no subtipo de células claras e estão presentes em até 80% dos casos, trissomia do cromossomo 7 e 17 no subtipo papilífero e alterações dos cromossomos 1, 2, 6, 10, 13 e 17 no cromóforo. Padrões genéticos distintos e decorrentes da heterogeneidade dos subtipos histológicos renais podem justificar diferentes frequências de alterações gênicas ou epigênicas para um determinado gene em relação a outro.

Hipoexpressão da proteína PTEN no CCR tem sido reportada com frequências que variam de 31,3% a 88,5% (Lee et al., 2003; Hyung et al., 2004; Campos 2007; He et al., 2007). Os resultados destes estudos diferem entre si e justificam a interpretação cuidadosa dos resultados, vista aos diferentes anticorpos e metodologias de análise IIQ empregados. A ausência ou baixa expressão da proteína

PTEN nestes estudos pode ser justificada pela ocorrência de mutação, deleção, hipermetilação ou alterações pós-transcricionais e que resultam na degradação da proteína PTEN.

Sakurada et al. (1997) não detectaram mutações do PTEN em 24 casos de CCR. Em 50 amostras de CCR, Sukosd et al. (2001) também não encontraram mutações do gene PTEN. Kondo et al. (2001) avaliaram 68 amostras de CCR e identificaram cinco casos (7,5%) de mutação do PTEN e 25% de perda de heterozigose. Morita et al. (1991), Teng et al. (1997), Velickovic et al. (2002) demonstraram perda de heterozigose em 41%, 40% e 37,5% dos CCR analisados, respectivamente.

As frequências de perda de heterozigose observadas nos estudos demonstram a existência de eventos genéticos que podem contribuir para a ausência ou baixa expressão da proteína PTEN. Mutação do PTEN é um evento raro no CCR, ocorrendo com frequências inferiores a 7,5%.

Apesar do presente estudo não ter realizado a análise da proteína PTEN, mas analisando os resultados em relação aos principais estudos na literatura, hipermetilação do PTEN não seria o mecanismo principal de inativação considerando a baixa frequência de metilação aqui detectada.

Sabendo que perda de heterozigose ocorre com maior frequência e na ordem de 40% no CCR, podemos considerar a hipermetilação do PTEN, assim como, sua mutação, mecanismos alternativos de inativação e complementares a um evento genético principal, considerando-se a necessidade de inativação bialélica para a perda funcional completa do gene supressor tumoral.

Pela baixa frequência de metilação detectada, dificilmente a metilação poderia ser o único mecanismo de inativação do PTEN, sendo justificado pelo modelo da haploinsuficiência gênica em que a perda funcional de um alelo exerce um efeito dominante sobre o alelo selvagem e impede sua atividade transcricional.

Entre os cinco casos metilados não houve a ocorrência de morte ou morte por CCR, tampouco recorrência do CCR. Os estudos que demonstram impacto negativo de alterações do PTEN na sobrevida de pacientes portadores de CCR são baseados em análises imunoistoquímicas, contudo, não demonstram o mecanismo molecular subjacente causador das hipoexpressões observadas (Lee et al., 2003; Hyung et al., 2004). É importante a identificação da alteração molecular, uma vez que, mutação e metilação não demonstraram serem mecanismos importantes de inativação no CCR.

Diferentemente de outras neoplasias em que a reversão do fenótipo metilador tem permitido o desenvolvimento de novas terapias, no CCR o uso desses medicamentos traria pouco benefício em decorrência da baixa frequência encontrada e da ausência de impacto nas taxas de sobrevida.

Em câncer de pulmão, a metilação do PTEN foi detectada com frequência de 2,9%, não havendo associação entre o status de metilação e fatores prognósticos (Kim et al., 2010). Em câncer de cervix e mama houve associação entre metilação do PTEN e fatores prognósticos, porém, foram detectadas frequências maiores de metilação de 58% e 70%, respectivamente (Cheung et al., 2003; Sadeq et al., 2010).

No presente estudo, optamos por não realizar a associação entre o perfil de metilação do PTEN e os principais fatores prognósticos no CCR em decorrência da baixa frequência de metilação detectada. A mutação do PTEN não demonstrou associação com tumores de alto grau ou com recorrência tumoral no CCR (Morita et

al., 1991), sugerindo que mutação e metilação não seriam mecanismos importantes de desregulação do gene no CCR.

Novos estudos são necessários para confirmar a baixa frequência de metilação detectada nesta série e a ausência de potencial prognóstico na sobrevida ou sua associação com os principais fatores determinantes da evolução de pacientes portadores de CCR.

Apesar da via de carcinogênese do PTEN ser comum no CCR, nesta série a metilação foi infrequente e não demonstrou impacto sobre as taxas de sobrevida global e livre de doença, sugerindo o envolvimento de outros genes ou mecanismos de inativação gênica ou epigenética diferentes da metilação, como deleção ou a regulação gênica pós transcricional através de micro-RNAs, na carcinogênese renal.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Considerando o estadiamento clínico, foram fatores independentes para a sobrevida global: idade, ASA, margens cirúrgicas, grau de Fuhrman, estágio clínico e subtipo histológico. No modelo múltiplo, a sobrevida livre de doença foi influenciada unicamente pelo estágio clínico.
2. Hipermetilação do PTEN foi detectada com baixa frequência (3,6%). Para os cinco casos hipermetilados, não houve a ocorrência de nenhum evento, ou seja, morte, morte por CCR ou recorrência da doença.
3. Não foi possível detectar associação entre o perfil de metilação do PTEN e os principais fatores prognósticos no CCR.

ANEXOS

Anexo A – Estadiamento

TNM (UICC/AJCC) -2002 (CID-O 64)

Tx – Tumor primário não pode ser avaliado

T0 – Não há evidência de tumor primário

T1 – Tumor menor que 7 cm no seu maior eixo, limitado ao rim

T1A – tumor de até 4cm

T1B – tumor de tamanho entre 4 e 7cm em sua maior dimensão

T2 – Tumor maior que 7 cm no seu maior eixo, mas limitado ao rim

T3 – Tumor estende-se as veias maiores ou invade adrenal ou gordura perirenal sem ultrapassar a fáscia de Gerota

T3a – adrenal, seio renal e tecidos peri-nefréticos

T3b – trombo na v. renal ou v. cava inferior abaixo do diafragma

T3c – trombo na v. cava inferior acima do diafragma

T4 – Tumor ultrapassa a fáscia de Gerota

N0 – ausência de acometimento linfonodal regional

N1 – Acometimento de um linfonodo regional

N2 – Acometimento de mais de um linfonodo regional

Nx- Linfonos regionais não avaliáveis

M1 – Metástase à distância

Grupamento por estádios:

Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0,N1	M0
	T3a	N0,N1	M0
	T3b	N0,N1	M0

T3c N0,N1 M0

Estádio IV T4 N0,N1 M0

Qualquer T N2 M0

Qualquer T Qualquer N M1.

Estadiamento de Robson

- I: tumor restrito ao rim, sem ultrapassar a cápsula renal.
- II: tumor acometendo a gordura perirrenal sem ultrapassar a cápsula de gerota.
- III: presença de trombo venoso tumoral envolvendo macroscopicamente a veia renal ou a veia cava inferior ou linfonodos regionais
 - IIIa: acometimento da veia renal ou veia cava infradiafragmática
 - IIIb: acometimento de linfonodos regionais
 - IIIc: acometimento de veia renal ou veia cava inferior e de linfonodos regionais concomitante
- IV: invasão de órgãos adjacentes, exceto adrenal ipsilateral ou metástases à distância.

Anexo B – Graduação histológica segundo Fuhrman et al. (1982).

Grau 1: núcleo arredondado e uniforme, com cerca de 10µm de diâmetro e nucléolo ausente ou pequeno.

Grau 2: núcleo levemente irregular, com diâmetro de 15µm e nucléolo visível, mas pequeno.

Grau 3: núcleo moderadamente irregular, com diâmetro de 20 µm e nucléolo grande.

Grau 4: núcleo acentuadamente irregular/pleomórfico e formas multilobulares, com cromatina agrupada e diâmetro maior que 20 µm

Anexo C – Performance status

KARNOFSKI

- 100 – Normal, sem queixas
- 90 – Normal, queixas menores
- 80 – Normal, alguns sintomas
- 70 – Cuida-se sozinho, incapacitado
- 60 – Requer assistência
- 50 – Assistência considerável, frequentes cuidados médicos
- 40 – Incapacitado requer assistência especial
- 30 – Incapacitado, hospitalização
- 20 – Muito doente, requer assistência permanente
- 10 – Moribundo
- 0 – Morto

ECOG

- 0 – Ativo, Karnofski 90-100
- 1 – Restrições, cuida-se sozinho, Karnofski 70-80
- 2 – Incapacitado, deambula, cuida-se sozinho, Karnofski 50-60
- 3 – Somente cuidados pessoais, sentado, deitado >50%, Karnofski 30-40
- 4 – Inativo, dependente, acamado, Karnofski 10-20.

Anexo D – ASA (American Society Anesthesiology)

I – Paciente saudável

II – Doença sistêmica moderada, sem limitação das funções vitais

III – Doença sistêmica severa, com funções vitais comprometidas

IV – Doença sistêmica severa com ameaça à vida

V – Paciente moribundo, morte esperada nas próximas 24 horas com ou sem intervenção cirúrgica

E – Em cirurgias de urgência acrescentar o E ao número.

Anexo E – Protocolo de Extração do DNA tumoral e de tecido normal

O protocolo para extração do DNA consiste em:

- 1) Transferir o tecido de interesse para um tubo de 0,5 ml,
- 2) Adicionar 65µL de tampão de extração,
- 3) Adicionar 20µL de proteinase K,
- 4) Deixar overnight em estufa à 42°C,
- 5) Retirar os tubos contendo o mix de células lisadas da estufa,
- 6) Centrifugar por 10 minutos à 10.000 rpm (LCM),
- 7) Retirar os *caps* e descartá-los (LCM),
- 8) Transferir o mix de células lisadas para um tubo Fase Lock,
- 9) Adicionar 150µl de fenol-corofórmio-isoamílico (25:24:1),
- 10) Adicionar 150µl de água milliQ ,
- 11) Homogeneizar,
- 12) Centrifugar por 20 minutos à 14.000rpm,
- 13) Adicionar 150µl de clorofórmio *PA*,
- 14) Homogeneizar,
- 15) Centrifugar 20 minutos à 14.000 rpm,
- 16) Transferir o sobrenadante para tubo de 1,5ml,
- 17) Acrescentar 50µl de *acetato de amônia*,
- 18) Acrescentar 1000µl de etanol absoluto à -20°,
- 19) Homogeneizar,
- 20) Deixar overnight no -20° ou 1 hora à -80°,
- 21) Centrifugar 30 minutos à 14.000 rpm,
- 22) Descartar o etanol absoluto (deixar só o *pellet*),
- 23) Acrescentar 800µl de etanol 70%,
- 24) Homogeneizar,
- 25) Centrifugar por 5 minutos à 14.000 rpm,
- 26) Repetir a lavagem com etanol 70% mais 2 vezes,
- 27) Retirar o etanol 70%,

- 28) Deixar secar em temperatura ambiente (por aproximadamente 30 minutos) ou à 42°C (cuidado, retirar imediatamente que secar),
- 29) Ressuspender com 12 μ de água milliQ estéril,
- 30) Manter overnight em geladeira à 4°C,
- 31) Quantificar (Nanodrop),
- 32) Anotar para avaliação a quantificação, razão 260/280 e 260/230.

Anexo F - Protocolo de Tratamento de Bissulfito

O tratamento de bissulfito consiste nas seguintes etapas principais:

- 1) A partir de uma quantidade mínima de 1µg de DNA (que equivale a 1000ng). Ou seja, feita a quantificação no NanoDrop deve-se usar uma quantidade de amostra suficiente para atingir 1µg de DNA, de forma que não ultrapasse 45µL, pois o volume da amostra mais o acréscimo de 5µL de *M-Dilution Buffer* (fornecido pelo kit) deve ser igual a 50 µL e, caso não chegue nesta quantidade, completar com água ultrapura.
- 2) Incubação a 37°C por 15 minutos;
- 3) Adição de 100µL de *CT conversion* (fornecido pelo kit) homogeneizando no vórtex;
- 4) Incubação no escuro a 50°C por 12 a 16 horas;
- 5) Incubação no gelo por 10 minutos;
- 6) Adição de 400µL de *M-Binding Buffer* (fornecido pelo kit), homogeneizar vertendo e em seguida centrifugar por 30 segundos a 11500 rpm;
- 7) Transferência do material para a coluna e nova centrifugação por 30 segundos a 11500 rpm;
- 8) Trocar o tubo de conexão e adição de 100µL de *M-Wash buffer*, seguida de nova centrifugação por 30 segundos a 11500 rpm;
- 9) Adição de 200µL *M-Desulphonation* (fornecido pelo kit) e incubação em temperatura ambiente por 15 a 20 minutos;
- 10) Adição de 200µL de *M-Wash buffer*, seguida de nova centrifugação por 30 segundos a 11500 rpm;
- 11) Troca do *connection tube* e adição de 200µL de *M-Wash buffer*, seguida de nova centrifugação por 30 segundos a 11500 rpm;
- 12) Transferência do material para tubos de 1,5ml e adição de 20µL de *M-Elution buffer* (fornecido pelo kit), seguida de nova centrifugação por 30 segundos a 11500 rpm;
- 13) Separação de 2 µL para a PCR do gene constitutivo e posterior estocagem a -80°C.

Anexo G - Extração e Metilação de Linfócitos para Controle das Reações

Duas alíquotas de 20mL de sangue periférico foram submetidas à centrifugação (em tubo de Falcon de 15mL) para separação do soro da porção celular, o primeiro foi retirado e estocado a -80°C. À porção celular foi adicionada solução de Tris-EDTA pH8,0 1X (TE 1X) – 10mM Tris-EDTA pH8,0 e 1 mM EDTA pH8,0 – em volume suficiente para 15mL, para lise das hemácias, seguida de centrifugação por 5 minutos a 1.500rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuscitado em 1mL de TE 1X e transferido para tudo de 1,5mL. A amostra foi submetida a nova centrifugação por 1 minuto à 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado.

Para obtenção do DNA foi utilizado o protocolo de digestão com Proteinase K e extração do DNA com fenol-clorofórmio. Em seguida foi realizada a quantificação de DNA por espectrofotometria (Nanodrop) e a integridade do DNA foi verificada com PCR para o fragmento de 133 pb do gene β -actina.

A metilação *in vitro* do DNA de linfócitos foi realizada com o kit CpG *Methylase-SssI* (New England Biolabs), segundo instruções do fabricante. Resumidamente, o volume final da reação foi de 250 μ L contendo 20 μ g de DNA, 0,032mM de S-adenosilmetionina (SAM – doador de radicais metil) e 25 unidades de enzima metilase. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C, período após o qual foi adicionado 0,064mM de SAM e 12,5 unidades da enzima metilase. Após nova incubação de 4 horas a 37°C, as amostras foram submetidas a extração com fenolclorofórmio e precipitação com etanol. Os pellets formados foram secos à temperatura ambiente e ressuscitados em 15 μ L de água e o DNA metilado foi estocado a -20°C.

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

Abel EJ, Culp SH, Meissner M, Matin SF, Tamboli P, Wood CG. Identifying the risk of disease progression after surgery for localized renal cell carcinoma. *BJU Int.* 2010;106:1277-83.

Abou El Fettouh HI, Cherullo EE, El-Jack M, Al Maslamani Y, Novick AC. Sporadic renal cell carcinoma in young adults: presentation, treatment, and outcome. *Urology.* 2002;60:806-10.

Abreu SC, Gill IS. Renal cell carcinoma: modern surgical approach. *Curr Opin Urol.* 2003;13:439-44.

Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta.* 2006;363:83-94.

Al-Aynati M, Chen V, Salama S, Shuhaibar H, Treleaven D, Vincic L. Interobserver and intraobserver variability using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:593-6.

Amin MB, Amin MB, Tamboli P, Javidan J, Stricker H, de-Peralta Venturina M, Deshpande A, Menon M. Prognostic impact of histologic subtyping of adult renal epithelial neoplasms: an experience of 405 cases. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:281-91.

Arsanious A, Bjarnason GA, Yousef GM. From bench to bedside: current and future applications of molecular profiling in renal cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2009;17;8:20.

Baeza N, Weller M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. PTEN methylation and expression in glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2003;106:479-85.

Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*. 2006;6:107-16.

Becker F, Siemer S, Hack M, Humke U, Ziegler M, Stöckle M. Excellent long-term cancer control with elective nephron-sparing surgery for selected renal cell carcinomas measuring more than 4 cm. *Eur Urol*. 2006;49:1058-63.

Bellmunt J, Flodgren P, Roigas J, Oudard S. Optimal management of metastatic renal cell carcinoma: an algorithm for treatment. *BJU Int*. 2009;104:10-8.

Bernhard JC, Pantuck AJ, Wallerand H, Crepel M, Ferrière JM, Bellec L, Maurice-Tison S, Robert G, Albouy B, Pasticier G, Soulie M, Lopes D, Lacroix B, Bensalah K, Pfister C, Thuret R, Tostain J, De La Taille A, Salomon L, Abbou C, Colombel M, Belldegrun AS, Patard JJ. Predictive factors for ipsilateral recurrence after nephron-sparing surgery in renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2010;57:1080-6.

Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JF, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*. 2007;28:1379-86.

Bonsib SM. T2 clear cell renal cell carcinoma is a rare entity: a study of 120 clear cell renal cell carcinomas. *J Urol*. 2005;174:1199-202.

Bretheau D, Lechevallier E, de Fromont M, et al. Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. *Cancer*. 1995;76:2543-2549.

Bruder E, Passera O, Harms D, et al. Morphologic and molecular characterization of renal cell carcinoma in children and young adults. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:1117-32.

Campbell SC, Novick AC, Bukowski RM. Renal tumors. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA, editors. *Campbell-Walsh urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.p.1557-637.

Campos ECR. *Análise da expressão do gene PTEN e da proteína Akt associada a fatores clínicos e anatomopatológicos como prognósticos no carcinoma de células renais* [dissertação]. São Paulo: Fundação Antonio Prudente; 2007.

Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:4240-5.

Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, Cheung AY, Chung TK, Wong YF. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol*. 2004;93:621-7.

Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:612-24.

Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, Cheung AY, Chung TK, Wong YF. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol*. 2004;93:621-7.

Cheville JC, Lohse CM, Zincke H, Weaver AL, Blute ML. Comparisons of outcome and prognostic features among histologic subtypes of renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:612-24.

Clark SJ, Melki J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene*. 2002;21:5380-7.

Colosimo EA, Giolo SR. *Análise de sobrevivência aplicada*. São Paulo: Edgard Blücher; 2006.

Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001;38:285-303.

Crepel M, Leldres C, Perrotte P, Capitanio U, Isbarn H, Shariat SF, Liberman D, Sun M, Lughezzani G, Arjane P, Widmer H, Graefen M, Montorsi F, Patard JJ, Karakiewicz PI. Nephron-sparing surgery is equally effective to radical nephrectomy for T1bN0M0 renal cell carcinoma: a population-based assessment. *Urology*. 2010;75:271-5.

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

Delacroix SE, Wood CG. The role of lymphadenectomy in renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2009;19:465-72.

Denzinger S, Otto W, Burger M, Hammerschmied C, Junker K, Hartmann A, Ieland WF, Walter B. Sporadic renal cell carcinoma in young and elderly patients: are there different clinicopathological features and disease specific survival rates? *World J Surg Oncol*. 2007;5:5:16.

Dimashkieh HH, Lohse CM, Blute ML, Kwon ED, Leibovich BC, Cheville JC. Extranodal extension in regional lymph nodes is associated with outcome in patients with renal cell carcinoma. *J Urol*. 2006;176:1978-82.

Di Lorenzo G, Autorino R, Sternberg CN. Metastatic renal cell carcinoma: recent advances in the targeted therapy era. *Eur Urol*. 2009;56:959-71.

Dupont JM, Tost J, Jammes H, Gut IG. De novo quantitative bisulfite sequencing using the pyrosequencing technology. *Anal Biochem*. 2004;333:119-27.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429:457-63.

Ehrich M, Zoll S, Sur S, van den Boom D. A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:1-8.

Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H. Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *Eur Urol.* 2009;55:851-63.

Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM, Target Study Group. Sorafenib in advanced clear cell renal cell carcinoma. *N Eng J Med.* 2007;356:125-34.

Flanigan RC, Salmon SE, Blumenstein BA, Bearman SI, Roy V, McGrath PC, Calton Jr, Munshi N, Crawford ED. Nephrectomy followed by interferon alfa-eb compared with interferon alfa-2b alone for metastatic renal cell cancer. *N Engl Med.* 2001;345:1655-9.

Ficarra V, Guillè F, Schips L, de la Taille A, Prayer Galetti T, Tostain J, Cindolo L, Novara G, Zigeuner R, Bratti E, Li G, Altieri V, Abbou CC, Zanolla L, Artibani W, Patard JJ. Proposal for revision of the TNM classification system for renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005;104:2116-23.

Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, et al. Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005;103:68-75.

Ficarra V, Martignoni G, Galfano A, Novara G, Gobbo S, Brunelli M, Pea M, Zattoni F, Artibani W. Prognostic role of the histologic subtypes of renal cell carcinoma after slide revision. *Eur Urol.* 2006;50:786-93.

Ficarra V, Novara G, Iafrate M, Cappellaro L, Bratti E, Zattoni F, Artibani W. Proposal for reclassification of the TNM staging system in patients with locally advanced (pT3-4) renal cell carcinoma according to the cancer-related outcome. *Eur Urol.* 2007;51:722-9.

Frank I, Blute ML, Cheville JC, Lohse CM, Weaver AL, Zincke H. An outcome prediction model for patients with clear cell renal cell carcinoma treated with radical nephrectomy based on tumor stage, size, grade and necrosis: the SSIGN score. *J Urol.* 2002;168:2395-400.

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

Furniss D, Harnden P, Ali N, Royston P, Eisen T, Oliver RT, Hancock BW; National Cancer Research Institute Renal Clinical Studies Group. Prognostic factors for renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2008;34:407-26.

Gabr AH, Gdor Y, Strobe SA, Roberts WW, Wolf JS Jr. Patient and pathologic correlates with perioperative and long-term outcomes of laparoscopic radical nephrectomy. *Urology.* 2009;74:635-40.

Garcia JA, Cowey CL, Godley PA. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol.* 2009;21:266-71.

Gericke A, Munson M, Ross AH. Regulation of PTEN phosphatase. *Gene.* 2006;341:1-11.

Gillett MD, Cheville JC, Karnes RJ, Lohse CM, Kwon ED, Leibovich BC, Zincke H, Blute ML. Comparison of presentation and outcome for patients 18 to 40 and 60 to 70 years old with solid renal masses. *J Urol.* 2005;173:1893-6.

Godley PA, Ataga IK. Renal cell carcinoma. *Curr Opin in Oncol.* 2000;12:260-4.

Gofrit ON, Shapiro A, Pizov G, Landau EH, Katz R, Zorn KC, Pode D. Does stage T3a renal cell carcinoma embrace a homogeneous group of patients? *J Urol*. 2007;177:1682-6.

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

Gudbjartsson T, Thoroddsen A, Petursdottir V, Hardarson S, Magnusson J, Einarsson GV. Effect of incidental detection for survival of patients with renal cell carcinoma: results of population-based study of 701 patients. *Urology*. 2005;66:1186-91.

Han KR, Pantuck AJ, Belldegrun AS. Basic biology and clinical behavior of renal cell carcinoma. *Cancer Treat Res*. 2003;116:69-89.

Hara S, Oya M, Mizuno R, Horiguchi A, Marumo K, Murai M. Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor. *Ann Oncol*. 2005;16:928-33.

Harada K, Sakai I, Ishimura T, Inoue TA, Hara I, Miyake H. Clinical symptoms in localized renal cell carcinoma reflect its invasive potential: comparative study between incidentally detected and symptomatic diseases. *Urol Oncol*. 2006;24:201-6.

He L, Fan C, Gillis A, Feng X, Sanatani M, Hotte S, Kapoor A, Tang D. Co-existence of high levels of the PTEN protein with enhanced Akt activation in renal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772:1134-42.

Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, Eigl BJ, Ruether JD, Cheng T, North S, Venner P, Knox JJ, Chi KN, Kollmannsberger C, McDermott DF, Oh WK, Atkins MB, Bukowski RM, Rini BI, Choueiri TK. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with

vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol*. 2009;27:5794-9.

Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Five year survival after surgical treatment for kidney cancer. *Cancer*. 2007;109:1763-8.

Horiguchi A, Oya M, Uchida A, Marumo K, Murai M. Elevated AKT activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma. *J Urol*. 2003;169:710-3.

Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. 2^a ed. New York: John Wiley e Sons; 2000.

Isbarn H, Patard JJ, Lughezzani G, Rioux-Leclercq N, Crépel M, Cindolo L, de la Taille A, Zini L, Villers A, Shariat SF, Bertini R, Karakiewicz PI. Limited prognostic value of tumor necrosis in patients with renal cell carcinoma. *Urology*. 2010;75:1378-84.

Ishimura T, Sakai I, Hara I, Eto H, Miyake H. Microscopic venous invasion in renal cell carcinoma as a predictor of recurrence after radical surgery. *Int J Urol*. 2004;11:264-8.

Jain P, Surdas R, Aga P, Jain M, Kapoor R, Srivastava A, Mandhani A. Renal cell carcinoma: Impact of mode of detection on its pathological characteristics. *Indian J Urol*. 2009;25:479-82.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3:415-28.

Joo JK, Kim SH, Kim HG, Kim DY, Ryu SY, Lee KH, Lee JH. CpG Methylation of Transcription Factor 4 in Gastric Carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2010;17:3344-53.

Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., and Sasaki, H. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature*. 2004;429:900-903.

Karakiewicz PI, Lewinshtein DJ, Chun FK, Briganti A, Guille F, Perrotte P, Lobel B, Ficarra V, Artibani W, Cindolo L, Tostain J, Abbou CC, Chopin D, De La Taille A, Patard JJ. Tumor size improves the accuracy of TNM predictions in patients with renal cancer. *Eur Urol*. 2006;50:521-8.

Karakiewicz PI, Trinh QD, Bhojani N, Bensalah K, Salomon L, de la Taille A, Tostain J, Cindolo L, Altieri V, Ficarra V, Schips L, Zigeuner R, Mulders PF, Valeri A, Descotes JL, Mejean A, Patard JJ. Renal cell carcinoma with nodal metastases in the absence of distant metastatic disease: prognostic indicators of disease-specific survival. *Eur Urol*. 2007;51:1616-24.

Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Takahira T, Kobayashi C, Tamiya S, Tateishi N, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. DNA hypermethylation status of multiple genes in soft tissue sarcomas. *Mod Pathol*. 2006;19:106-14.

Kim DS, Lee SM, Yoon GS, Choi JE, Park JY. Infrequent hypermethylation of the PTEN gene in Korean non-small-cell lung cancers. *Cancer Sci*. 2010;101:568-72.

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

Kim HL, Seligson D, Liu X, Janzen N, Bui MH, Yu H, Shi T, Figlin RA, Horvath S, Belldegrun AS. Using protein expressions to predict survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5464-71.

Kirkali Z, Obek C. Clinical aspects of renal cell carcinoma. *EAU Update Series*. 2003;1:189-96.

Kishi M, Nakamura M, Nishimine M, Ikuta M, Kirita T, Konishi N. Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol.* 2004;41:161-9.

Kisseljova NP, Kisseljov FL. DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2005;70:743-52.

Kontak JA, Campbell SC. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *Urol Clin North Am.* 2003;30:467-80.

Kuczyk M, Wegener G, Merseburger AS, Anastasiadis A, Machtens S, Zumbargel A, Hartmann JT, Bokemeyer C, Jonas U, Stenzl A. Impact of tumor size on the long-term survival of patients with early stage renal cell cancer. *World J Urol.* 2005;23:50-4.

Kümmerlin I, ten Kate F, Smedts F, Horn T, Algaba F, Trias I, de la Rosette J, Laguna MP. Core biopsies of renal tumors: a study on diagnostic accuracy, interobserver, and intraobserver variability. *Eur Urol.* 2008;53:1219-25.

Kutikov A, Uzzo RG, Caraway A, Reese CT, Eggleston BL, Chen DY, Viterbo R, Greenberg RE, Wong YN, Raman JD, Boorjian SA. Use of systemic therapy and factors affecting survival for patients undergoing cytoreductive nephrectomy. *BJU Int.* 2010;106:218-23.

Kuticov A, Eggleston BL, Wong YN, Uzzo RG. Evaluation overall survival and competing risks of death in patients with localized renal cell carcinoma using a comprehensive nomogram. *J. Clin. Oncol.* 2010;28:311-7.

Lam JS, Shvarts O, Leppert JT, Figlin RA, Belldegrun AS. Renal cell carcinoma 2005: new frontiers in staging, prognostication and targeted molecular therapy. *J Urol.* 2005;173:1853-62.

Lam JS, Breda A, Belldegrun AS, Figlin RA. Evolving principles of surgical management and prognostic factors for outcome in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:5565-75.

Lam JS, Klatte T, Patard JJ, Goel RH, Guillè F, Lobel B, Abbou CC, De La Taille A, Tostain J, Cindolo L, Altieri V, Ficarra V, Artibani W, Prayer-Galetti T, Schips L, Zigeuner R, Pantuck AJ, Figlin RA, Belldegrun AS. Prognostic relevance of tumour size in T3a renal cell carcinoma: a multicentre experience. *Eur Urol.* 2007;52:155-62.

Lam JS, Klatte T, Breda A. Staging of renal cell carcinoma: current concepts. *Indian J Urol.* 2009;25:446-54.

Lang H, Lindner V, Letourneux H, Martin M, Saussine C, Jacqmin D. Prognostic value of microscopic venous invasion in renal cell carcinoma: long-term follow-up. *Eur Urol.* 2004;46:331-5.

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

Lee JH, Choi JW, Kim YS. The value of histologic subtyping on outcomes of clear cell and papillary renal cell carcinomas: a meta-analysis. *Urology.* 2010;76:889-94.

Leibovich BC, Lohse CM, Crispen PL, Boorjian SA, Thompson RH, Blute ML, Cheville JC. Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma. *J Urol.* 2010;183:1309-15.

Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. *J Urol.* 2006;176:2353-8.

Ljungberg B. Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol*. 2007;17:303-8.

Luciani LG, Cestari R, Tallarigo C. Incidental renal cell carcinoma-age and stage characterization and clinical implications: study of 1092 patients (1982-1997). *Urology*. 2000;56:58-62.

Magyarlaki T, Buzogány I, Kaiser L, Sukosd F, Dobronte R, Simon B, Fazekas A, Nagy J. Prognostic histological and immune markers of renal cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2001;7:118-124.

Mancini V, Battaglia M, Ditunno P, Palazzo S, Lastilla G, Montironi R, Bettocchi C, Cavalcanti E, Ranieri E, Selvaggi FP. Current insights in renal cell cancer pathology. *Urol Oncol*. 2008;26:225-38.

Marsit CJ, Zheng S, Aldape K, Hinds PW, Nelson HH, Wiencke JK, Kelsey KT. PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Hum Pathol*. 2005;36:768-76.

Matos LA. Avaliação das sintases de óxido nítrico, nitrato e nitrito e suas associações com alterações moleculares de O6-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) no câncer colorretal [dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2010.

Mickisch GH, Garin A, van Poppel H, de Prijck L, Sylvester R; European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Genitourinary Group. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *Lancet*. 2001; 358:966-70.

Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res*. 2006; 66:6546-52.

Morita R, Saito S, Ishikawa J, Ogawa O, Yoshida O, Yamakawa K, Nakamura Y. Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1991;51:5817-20.

Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A, Ferrara J. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 1999;17:2530-40.

Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, Redman BG, Margolin KA, Merchan JR, Wilding G, Ginsberg MS, Bacik J, Kim ST, Baum CM, Michaelson MD. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA.* 2006a; 295:2516-24.

Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P. Phase III randomized trial of sunitinib malate (SIU11248) versus interferon-alfa (IFN- α) as first line systemic therapy for patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006b;24:16-24.

Mouraviev V, Joniau S, Van Poppel H, Polascik TJ. Current status of minimally invasive ablative techniques in the treatment of small renal tumours. *Eur Urol.* 2007;51:328-36.

Muggerud AA, Rønneberg JA, Wærnberg F, Botling J, Busato F, Jovanovic J, Solvang H, Bukholm I, Børresen-Dale AL, Kristensen VN, Sørli T, Tost J. Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12:R3.

Mulders P. Vascular endothelial growth factor and mTOR pathways in renal cell carcinoma: differences and synergies of two targeted mechanisms. *BJU Int.* 2009;104:1585-9.

Murai M, Oya M. Renal cell carcinoma: etiology, incidence and epidemiology. *Curr Opin Urol.* 2004;4:229-33.

Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-AKT pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 2004;9:667-76.

Ortiz RFS, Rosser CJ, Madsen LT, Swanson DA, Wood CG. Young age is an independent prognostic factor for survival of sporadic renal cell carcinoma. *J Urol.* 2004;171:2160-5.

Paner GP, Amin MB, Alvarado-Cabrero I, Young AN, Stricker HJ, Moch H, Lyles RH. A novel tumor grading scheme for chromophobe renal cell carcinoma: prognostic utility and comparison with Fuhrman nuclear grade. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:1233-40.

Pantuck AJ, Belldegrun AS, Figlin RA. Cytoreductive nephrectomy for metastatic renal cell carcinoma: is it still imperative in the era of targeted therapy? *Clin Cancer Res.* 2007;13:693s-696s.

Patard JJ, Dorey FJ, Cindolo L, Ficarra V, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Lobel B, Chopin DK, Figlin RA, Belldegrun AS, Pantuck AJ. Symptoms as well as tumor size provide prognostic information on patients with localized renal tumors. *J Urol.* 2004;172:2167-71.

Porpiglia F, Fiori C, Terrone C, Bollito E, Fontana D, Scarpa RM. Assessment of surgical margins in renal cell carcinoma after nephron sparing: a comparative study: laparoscopy vs open surgery. *J Urol.* 2005;173:1098-101.

Rathmell WK, Godley PA, Rini BI. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol.* 2005;17:261-7.

Rey Rey J, León Ramírez D, López García S, Fernández Vázquez P, Benavente Delgado J, Ojea Calvo A. [Pathological prognostic indicators in renal cell carcinoma]. *Actas Urol Esp*. 2010;34:71-7.

Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet*. 2009; 28:1119-32.

Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000;21:461-7.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005;6:597-610.

Robson JS. Advances in the treatment of renal disease. *Practitioner*. 1969; 203:483-93.

Rodrigues N, Carter D, Dillon D, Parisot N, Choi DH, Haffty BG. Correlation of clinical and pathologic features with outcome in patients with ductal carcinoma in situ of the breast treated with breast-conserving surgery and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002; 54:1331-5.

Sadeq V, Isar N, Manoochehr T. Association os sporadic breast câncer with PTEN/MMCA1/TEP1 promoter hypermethylation. *Med Oncol*. 2010;17:9473-8.

Sakurada A, Suzuki A, Sato M, Yamakawa H, Orikasa K, Uyeno S, Ono T, Ohuchi N, Fujimura S, Horii A. Infrequent genetic alterations of the PTEN/MMAC1 gene in Japanese patients with primary cancers of the breast, lung, pancreas, kidney, and ovary. *Jpn J Cancer Res*. 1997;88:1025-8.

Salama ME, Guru K, Stricker H, Peterson E, Peabody J, Menon M, Amin MB, De Peralta-Venturina M. pT1 substaging in renal cell carcinoma: validation of the 2002 TNM staging modification of malignant renal epithelial tumors. *J Urol*. 2005;173:1492-5.

Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, Gruber P, MacDonald ND, Ryan A, Jacobs IJ, Akslen LA, Das S. Significance of PTEN alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and PTEN protein expression. *Int J Oncol.* 2004;25:1615-23.

Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2006;18:77-82.

Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the pten tumor supressor pathway. *J Clin Oncol.* 2004;22:2954-63.

Sato K, Tamura G, Tsuchiya T, Endoh Y, Sakata K, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Terashima M, Nishizuka S, Zou T, Meltzer SJ. Analysis of genetic and epigenetic alterations of the PTEN gene in gastric cancer. *Virchows Arch.* 2002;440:160-5.

Sengupta S, Zincke H. Lessons learned in the surgical management of renal cell carcinoma. *Urology.* 2005;66:36-42.

Shames DS, Minna JD, Gazdar SF. Methods for detecting DNA methylation in tumors: from bench to bedside. *Cancer Lett.* 2007; 251:187-98.

Siemer S, Lehmann J, Loch A, Becker F, Stein U, Schneider G, Ziegler M, Stöckle M. Current TNM classification of renal cell carcinoma evaluated: revising stage T3a. *J Urol.* 2005;173:33-7.

Sobin LH, Wittekind C. *TNM classificação de tumores malignos*. Trad. de A L A Eisenberg. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Rim; p.200-3.

Stiles B, Groszer M, Wang S, Jiao J, Wu H. PTEN less means more. *Dev Biol.* 2004;273:175-84.

Sükösd F, Digon B, Fischer J, Pietsch T, Kovacs G. Allelic loss at 10q23.3 but lack of mutation of PTEN/MMAC1 in chromophobe renal cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;128:161-3.

Sunela KL, Kataja MJ, Kellokumpu-Lehtinen PL. Changes in symptoms of renal cell carcinoma over four decades. *BJU Int.* 2010;106(5):649-53.

Tam KF, Liu VW, Liu SS, Tsang PC, Cheung AN, Yip AM, Ngan HY. Methylation profile in benign, borderline and malignant ovarian tumors. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007;133:331-41.

Teloken PE, Thompson RH, Tickoo SK, Cronin A, Savage C, Reuter VE, Russo P. Prognostic impact of histological subtype on surgically treated localized renal cell carcinoma. *J Urol.* 2009;182:2132-6.

Teng DH, Hu R, Lin H, Davis T, Iliev D, Frye C, Swedlund B, Hansen KL, Vinson VL, Gumpner KL, Ellis L, El-Naggar A, Frazier M, Jasser S, Langford LA, Lee J, Mills GB, Pershouse MA, Pollack RE, Tornos C, Troncoso P, Yung WK, Fujii G, Berson A, Steck PA, et al. MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57:5221-5.

Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc.* 2007;2:2265-75.

Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol Biotechnol.* 2010;44:71-81.

Uno M, Fujimoto Y, Takada T, Ishida K, Kubota Y, Katoh S, Hagiwara N, Minamidate Y, Yokoi S, Deguchi T; Gifu RCC Research Group. Prognostic factors for survival of patients after curative surgery for renal cell carcinoma: multivariate analysis of 482 cases. *Int J Clin Oncol.* 2004;9:510-4.

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

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

Van Poppel H, Da Pozzo L, Albrecht W, Matveev V, Bono A, Borkowski A, Marechal JM, Klotz L, Skinner E, Keane T, Claessens I, Sylvester R; European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC); National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG); Southwest Oncology Group (SWOG); Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG). A prospective randomized EORTC intergroup phase 3 study comparing the complications of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2007;51:1606-15.

Velickovic M, Delahunt B, McIver B, Grebe SK. Intragenic PTEN/MMAC1 loss of heterozygosity in conventional (clear-cell) renal cell carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Mod Pathol*. 2002;15:479-85.

Verhoest G, Veillard D, Guillé F, De La Taille A, Salomon L, Abbou CC, Valéri A, Lechevallier E, Descotes JL, Lang H, Jacqmin D, Tostain J, Cindolo L, Ficarra V, Artibani W, Schips L, Zigeuner R, Mulders PF, Mejean A, Patard JJ. Relationship between age at diagnosis and clinicopathologic features of renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2007;51:1298-304.

Volpe A, Jewett MA. The natural history of small renal masses. *Nat Clin Pract Urol*. 2005;2:384-90.

Volpe A, Patard JJ. Prognostic factors in renal cell carcinoma. *World J Urol*. 2010;28:319-27.

Wajed SA, Laird PW, DeMeester TR. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann Surg*. 2001;234:10-20.

Warren M, Venner PM, North S, Cheng T, Venner C, Ghosh S, Venner AA, Finch D. A population-based study examining the effect of tyrosine kinase inhibitors on survival in metastatic renal cell carcinoma in Alberta and the role of nephrectomy prior to treatment. *Can Urol Assoc J*. 2009;3:281-9.

Worm J, Guldberg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med*. 2002;31:443-9.

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

Yim EK, Peng G, Dai H, Hu R, Li K, Lu Y, Mills GB, Meric-Bernstam F, Hnnessy BT, Craven RJ, Lin SY. Rax functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and functions. *Cancer Cell*. 2009;15:304-14.

Zequi SC. *Correlação entre os fatores clínicos e anatomopatológicos associados aos índices de proliferação celular como prognósticos em portadores de câncer do rim tratados por cirurgia* [dissertação]. São Paulo: Fundação Antonio Prudente; 2000.

Zequi SC. *Estudo da expressão imunoistoquímica e do valor prognóstico de sintases do óxido nítrico (NOS), metaloproteinases da matriz extracelular (MMP), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), caderina e, densidade de microvasos (DMV) e da densidade de vasos linfáticos (DVL) em pacientes portadores de carcinoma de células renais* [tese]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2008.

Zequi SC, de Campos EC, Guimarães GC, Bachega W Jr, da Fonseca FP, Lopes A. The use of the American Society of Anesthesiology Classification as a prognostic factor in patients with renal cell carcinoma. *Urol Int.* 2010;84:67-72.

Zubac DP, Bostad L, Kihl B, Eide J, Wentzel-Larsen T, Haukaas SA. Organ-confined clear cell renal cell carcinoma: the prognostic impact of microvascular invasion, nuclear grade and tumour size. *APMIS.* 2008;116:1027-33.

Zucchi A, Mearini L, Mearini E, Constantini E, Vivacqua C, Porena M. Renal cell carcinoma: histological findings on surgical margins after nephron sparing surgery. *J Urol.* 2003;169:905-8.

Zysman MA, Chapman W, Bapat B. Considerations when analyzing the methylation status of PTEN tumor suppressor gene. *Am J Pathol.* 2002;160:795-800.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

[illegible]

Apêndice 1 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

CASO	CORRIDA FS1																							Classificação
	síto 1	mC1	síto 2	mC2	síto 3	mC3	síto 4	mC4	síto 5	mC5	síto 6	mC6	síto 7	mC8	síto 8	mC8	síto 9	mC9	síto 10	mC10	síto 11	mC11	Media C	
57	4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0,00095	HIPO
58	0	0	0	0	4	0,04	0	0	5	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00826	HIPO
59	0	0	7	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00643	HIPO
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0,27	0	0	0	0	13	0,13	0,03673	HIPO
61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0,09	0	0	7	0,07	0,01469	HIPO
62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0,14	0	0	11	0,11	0,02295	HIPO
63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0,01	HIPO
64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
66	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00184	HIPO
67	0	0	0	0	9	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00826	HIPO
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,05	0	0	0	0	0,00459	HIPO
70	4	0,04	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00371	HIPO
71	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00459	HIPO
72	3	0,03	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00278	HIPO
73	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00184	HIPO
74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,05	0,00459	HIPO
76	100	1	63	0,63	100	1	64	0,64	71	0,71	48	0,48	45	0,45	97	0,97	44	0,44	100	1	53	0,53	0,62986	HIPER
77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
80	100	1	43	0,43	68	0,68	41	0,41	54	0,54	32	0,32	31	0,31	57	0,57	28	0,28	61	0,61	35	0,35	0,41409	HIPER
81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
83	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00184	HIPO
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0,00367	HIPO
85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
86	0	0	2	0,02	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00367	HIPO
87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0,00184	HIPO
89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0,07	0,00643	HIPO
90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
92	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
94	0	0	10	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00918	HIPER
95	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
98	0	0	8	0,08	0	0	0	0	0	0	0	9	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,01561	HIPO
99	7	0,07	0	0	8	0,08	0	0	9	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,01567	HIPO
100	0	0	0	0	2	0,02	0	3	0,03	3	0,03	0	0	0	0	0	9	0,09	0	0	0	0	0,01561	HIPO
101	6	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00545	HIPO
102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
103	4	0,04	0	0	5	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00463	HIPO
105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0,00367	HIPO
106	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0,00645	HIPO
107	0	0	0	0	5	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,06	0	0	0	0	0,0101	HIPO
108	9	0,09	0	0	0	0	0	0	0	9	0,09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00835	HIPO
109	0	0	0	0	0	0	0	5	0,05	4	0,04	0	0	0	0	0	4	0,04	4	0,04	0	0	0,01561	HIPO

Apêndice 1 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

CASO	CORRIDA FS1																							Classificação
	sitio 1	mC1	sitio 2	mC2	sitio 3	mC3	sitio 4	mC4	sitio 5	mC5	sitio 6	mC6	sitio 7	mC8	sitio 8	mC8	sitio 9	mC9	sitio 10	mC10	sitio 11	mC11	Media C	
114	0	0	3	0,03	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	5	0,05	0,01469	HIPO
115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00275	HIPO
116	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
117	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
121	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00459	HIPO
122	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
123	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0,12	0	0	4	0,04	0,01745	HIPO
124	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0,00643	HIPO
125	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0,00459	HIPO
126	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
127	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00184	HIPO
128	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
130	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0,00459	HIPO
131	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0,00551	HIPO
132	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
133	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00275	HIPO
134	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0,12	0	0	0	0	0,01102	HIPO
135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
136	0	0	0	0	3	0,03	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00643	HIPER
137	0	0	0	0	2	0,02	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00459	HIPO
138	0	0	0	0	3	0,03	0	0	3	0,03	5	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0101	HIPO
139	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
141	0	0	0	0	3	0,03	0	0	3	0,03	4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00918	HIPO
142	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0,00735	HIPO
144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
145	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00275	HIPO
146	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00275	HIPO
147	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
148	0	0	0	0	2	0,02	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00459	HIPO
149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	HIPO
150	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	7	0,07	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0,0101	HIPO
norma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
norma	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
norma	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01			
norma	4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0		
norma	4	0,04	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0		
norma	4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
norma	3	0,03	3	0,03	2	0,02	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0		

Cont/Apêndice 1 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

CASO	sitio 12	mC12	sitio 13	mC13	sitio 14	mC14	sitio 15	mC15	sitio 16	mC16	sitio 17	mC17	sitio 18	mC18	sitio 19	mC19
1T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3T	0	0	0	0	2	0,02	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
4T	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0
6T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	1	0,01	1	0,01	0	0	0	0
8T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0
10T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14T	9	0,09	0	0	0	0	12	0,12	0	0	0	0	0	0	0	0
15T	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0
16T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0
18T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	0	0	0	0
20T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21T	0	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	1	0,01	1	0,01	0	0	0	0
29T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0
31T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
34T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35T	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,06	0	0	0	0	0	0
36T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
41T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	3	0,03	2	0,02	0	0	0	0
44T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	0	0	0	0
46T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0
48T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
50T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54T	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56T	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,06	0	0	0	0	0	0
57T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
59T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61T	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0	0
62T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64T	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0
65T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	0	0	0	0

Cont/ Apêndice 1 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

	sítio 12	mC12	sítio 13	mC13	sítio 14	mC14	sítio 15	mC15	sítio 16	mC16	sítio 17	mC17	sítio 18	mC18	sítio 19	mC19
69T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0
71T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	0	0	0	0
73T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0
75T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76T	22	0,22	13	0,13	23	0,23	66	0,66	64	0,64	45	0,45	22	0,22	32	0,32
77T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0,2	0	0
79T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80T	14	0,14	0	0	11	0,11	23	0,23	36	0,36	32	0,32	15	0,15	29	0,29
81T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0,17
84T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0
87T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
89T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
91T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
92T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93T	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0
94T	0	0	0	0	14	0,14	0	0	0	0	0	0	14	0,14	15	0,15
95T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0,07	11	0,11
99T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0,2	0	0
102T	0	0	0	0	5	0,05	0	0	0	0	0	0	7	0,07	8	0,08
103T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
106T	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	4	0,04
107T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
114T	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0	0	6	0,06	6	0,06	4	0,04
115T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
116T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
118T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121T	2	0,02	2	0,02	0	0	0	0	0	0	2	0,02	2	0,02	2	0,02
122T	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0	0
123T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
124T	0	0	2	0,02	0	0	0	0	2	0,02	3	0,03	0	0	3	0,03
125T	1	0,01	2	0,02	0	0	0	0	2	0,02	3	0,03	2	0,02	2	0,02
126T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
127T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128T	2	0,02	0	0	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	0	0
130T	2	0,02	0	0	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	0	0
131T	0	0	2	0,02	2	0,02	0	0	2	0,02	3	0,03	2	0,02	2	0,02
132T	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0	0	0	0
133T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
134T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	0	0
135T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
136T	0	0	27	0,27	0	0	0	0	41	0,41	0	0	0	0	31	0,31
137T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
138T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
139T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
140T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cont/Apêndice 1 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

	síto 12	mC12	síto 13	mC13	síto 14	mC14	síto 15	mC15	síto 16	mC16	síto 17	mC17	síto 18	mC18	síto 19	mC19
141T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142T	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,06	0	0	0	0	0	0
144T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
145T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
146T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
147T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
148T	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
149T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
normal 1	4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	3	0,03	0	0
normal 2	3	0,03	0	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0
normal 3	3	0,03	2	0,02	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0
normal 4	4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0
normal 5	3	0,03	0	0	0	0	2	0,02	2	0,02	3	0,03	2	0,02	0	0
normal 6	2	0,02	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
normal 7	3	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cont/Apêndice 1 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

CORRIDA FS2																	
	sítio 20	mC20	sítio 21	mC21	sítio 22	mC22	sítio 23	mC23	sítio 24	mC24	sítio 25	mC25	sítio 26	mC26	sítio 27	mC27	Media C
1T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0012625
3T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	2	0,02	0	0	2	0,02	0,00568125
4T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0006375
5T	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	2	0,02	0	0	1	0,01	2	0,02	0,00505625
6T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00000625
7T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	1	0,01	2	0,02	1	0,01	0	0	0,00505625
8T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0,0031625
10T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00763125
15T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00189375
16T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17T	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	0,00379375
18T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19T	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	2	0,02	2	0,02	0	0	0,00505625
20T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0,00189375
22T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0,0006375
28T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	1	0,01	2	0,02	0	0	0	0	0,004425
29T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	0	0	0,0031625
31T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0012625
33T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	2	0,02	0	0	1	0,01	0,0037875
34T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00000625
35T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0037875
36T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39T	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0,0012625
40T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	2	0,02	0	0	2	0,02	0,00441875
41T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00000625
42T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43T	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	0	0	1	0,01	0	0	0,00505625
44T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45T	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	2	0,02	2	0,02	0	0	0,00505625
46T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0,00189375
48T	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0012625
49T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	2	0,02	0	0	2	0,02	0,00441875
50T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00000625
51T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0012625
55T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0037875
57T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0,00315625
59T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0,002525
60T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0,18	0,0138875
62T	0	0	0	0	6	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0037875
63T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00126875
65T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0,002525
66T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	0,0031625

Cont/Apêndice 1 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

	síto 20	mC20	síto 21	mC21	síto 22	mC22	síto 23	mC23	síto 24	mC24	síto 25	mC25	síto 26	mC26	síto 27	mC27	Media C
69T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,00379375
71T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	1	0,01	0	0	0,0031625
73T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	1	0,01	2	0,02	0,00379375
75T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76T	38	0,38	50	0,5	48	0,48	43	0,43	75	0,75	96	0,96	79	0,79	100	1	0,50135
77T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
78T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,012625
79T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80T	33	0,33	47	0,47	43	0,43	43	0,43	72	0,72	100	1	91	0,91	100	1	0,42618125
81T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83T	0	0	0	0	0	0	16	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02083125
84T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0,0012625
85T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	2	0,02	0,00253125
87T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0	18	0,18	0,01199375
88T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0,00126875
89T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,05	0	0	0,00315625
91T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0,21	0,01325625
92T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00189375
94T	14	0,14	14	0,14	0	0	0	0	17	0,17	0	0	12	0,12	18	0,18	0,0744875
95T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
96T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
97T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98T	7	0,07	0	0	0	0	0	0	12	0,12	0	0	0	0	0	0	0,02335625
99T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
101T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,012625
102T	8	0,08	0	0	0	0	5	0,05	8	0,08	0	0	0	0	0	0	0,02588125
103T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
105T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
106T	0	0	0	0	0	0	4	0,04	5	0,05	7	0,07	4	0,04	0	0	0,017675
107T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
108T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0,0012625
109T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
114T	4	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,06	0	0	0,0189375
115T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	0	0	0	0	18	0,18	0,01199375
116T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0,00126875
117T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
118T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,05	0	0	0,00315625
120T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
121T	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	3	0,03	2	0,02	3	0,03	0,01200625
122T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00189375
123T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
124T	3	0,03	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	3	0,03	0	0	0,012625
125T	0	0	0	0	0	0	3	0,03	3	0,03	3	0,03	3	0,03	3	0,03	0,01641875
126T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	0	0	0,0012625
127T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
128T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	2	0,02	0	0	0,0038
130T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,02	2	0,02	0	0	0,0038
131T	2	0,02	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0	0	3	0,03	3	0,03	0,01515
132T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0,08	0,007575
133T	0	0	6	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0037875
134T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00126875
135T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
136T	29	0,29	0	0	0	0	0	0	50	0,5	45	0,45	35	0,35	0	0	0,1628625
137T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	2	0,02	0	0	2	0,02	0,00441875
138T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00000625
139T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
140T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cont/Apêndice 1 - Percentual de metilação de cada ilha CpG avaliada

	sítio 20	mC20	sítio 21	mC21	sítio 22	mC22	sítio 23	mC23	sítio 24	mC24	sítio 25	mC25	sítio 26	mC26	sítio 27	mC27	Media C
141T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
142T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0037875
144T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
145T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,03	0,00315625
146T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0,04	0	0	0,002525
147T	0	0	0	0	0	0	1	0,01	0	0	2	0,02	0	0	2	0,02	0,00441875
148T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00000625
149T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
150T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
normal 1	0	0	0	0	0	0	3	0,03	3	0,03	0	0	3	0,03	4	0,04	
normal 2	0	0	0	0	2	0,02	2	0,02	2	0,02	0	0	2	0,02	3	0,03	
normal 3	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	3	0,03	3	0,03	3	0,03	
normal 4	0	0	0	0	0	0	2	0,02	0	0	3	0,03	3	0,03	0	0	
normal 5	0	0	0	0	3	0,03	4	0,04	2	0,02	3	0,03	4	0,04	3	0,03	
normal 6	0	0	0	0	0	0	3	0,03	2	0,02	0	0	0	0	0	0	
normal 7	0	0	0	0	0	0	2	0,02	3	0,03	0	0	2	0,02	3	0,03	