

**ENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES
NOS MECANISMOS DE DISSEMINAÇÃO DE
CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS**

AMANDA IKEGAMI

**Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Oncologia da Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Vilma Regina Martins

Co-orientador: Dr. Tiago Goss dos Santos

São Paulo

2024

Ikegami, Amanda.

**ENVOLVIMENTO DAS VESÍCULAS EXTRACELULARES NOS
MECANISMOS DE DISSEMINAÇÃO DE CARCINOMA DE CÉLULAS
RENAIS. / Amanda Ikegami. São Paulo, 2024.**

81f.

**Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-
Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.**

Orientador: Vilma Regina Martins.

**1. Câncer Renal, 2. Mecanismos de Disseminação, 3. NETs e Vesículas
Extracelulares**

CDU 616

Nome: Amanda Ikegami

Título: Envolvimento das vesículas extracelulares nos mecanismos de disseminação de carcinoma de células renais

Aprovado em: 30/07/2024

Banca Examinadora

Orientadora: Vilma Regina Martins

Co-orientador: Tiago Goss dos Santos

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Stênio de Cássio Zequi

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Luciana Nogueira de Sousa Andrade

Instituição: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

Membro da banca: Marília Cerqueira Leite Seelaender

Instituição: Universidade de São Paulo

Membro da banca: Ana Claudia Torrecillas

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu suporte financeiro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Oncogenômica e Inovação Terapêutica através das agências de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha mãe que sempre me incentivou e me apoiou e que sem sua presença não seria possível a realização deste projeto. Sua dedicação à família, ao trabalho e aos estudos sempre foram inspiradoras para mim.

À minha orientadora Vilma Regina Martins por todo apoio durante esses anos, pela paciência e vontade de fazer o melhor deste trabalho, mesmo com a distância física. Foi um processo fundamental para meu amadurecimento profissional e levarei muito aprendizado comigo.

Ao meu co-orientador Tiago Goss dos Santos que sempre esteve de prontidão em todas as questões ao longo do projeto. Muito obrigada por compartilhar o conhecimento de forma leve e assertiva.

Ao Dr Stênio de Cassio Zequi pelas contribuições científicas e olhar clínico para nossos resultados.

Ao grupo do prof. Fernando de Queiroz Cunha, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela parceria e apoio.

Ao Dr Tiago Medina por sempre prestar apoio e manter seu laboratório aberto para troca de informações, aprendizados e experiências.

A todos os professores e profissionais do AC Camargo Cancer Center que, com toda certeza, têm sua participação neste trabalho.

Aos colegas Felipe Moreira, Danilo Santos e Júlia Cassim pelo apoio técnico e aos meus colegas de grupo Ethiene Estevam e Adriano Beserra por compartilhar seus conhecimentos e pelos esforços voltados a este projeto.

Aos meus amigos Dayane Schmidt, Ingrid Nakamuta, Dimas Pontes e Bruno Dalbelo, com vocês esta jornada ficou muito mais prazerosa.

Por fim, agradeço às agências de apoio financeiro FAPESP, INCT, CAPES e CNPq.

RESUMO

Ikegami. **Envolvimento das vesículas extracelulares nos mecanismos de disseminação de carcinoma de células renais.** São Paulo, 2024 [Tese de Doutorado-Programa de Pós Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente]

O carcinoma de células renais (CCR) apresenta evolução clínica altamente variável: tumores localizados, metástases e invasão do sistema venoso por trombos tumorais. A ressecção cirúrgica é a principal forma de tratamento e a nefrectomia com trombectomia são procedimentos desafiadores, com altas taxas de morbidade.¹⁴ Nosso grupo gerou xenoenxertos derivados de pacientes (PDX) a partir de tumor de paciente com CCR e trombo tumoral¹⁰⁰. Camundongos imunodeficientes (NSG) implantados ortotopicamente com o tumor desenvolveram a doença e 50 a 60% também apresentaram formação de trombo. A linhagem celular imortalizada CCR26 foi gerada a partir de um desses PDX e foi confirmada sua capacidade tumorigênica e formação de trombos. Foram feitos ensaios de caracterização das células por imunofluorescência, proliferação e migração. As armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) são redes de DNA e proteínas expelidas pelos neutrófilos e estão relacionadas à trombose associada ao câncer. Nossos resultados mostraram que camundongos portadores de CCR que forma trombos apresentam cerca de dez vezes mais níveis plasmáticos de IL-8 (um importante quimioatraente de neutrófilos) do que camundongos com CCR sem trombos tumorais. Estes resultados são apoiados por outros em que o meio condicionado das células CCR26 induziu *in vitro* 2,4 vezes mais migração de neutrófilos humanos do que meios de linhagens celulares que não formam trombos. Após a separação por ultracentrifugação da fração solúvel do meio de cultura daquela formada por vesículas extracelulares (VE), verificou-se que a atividade de quimioatração está concentrada em VEs secretadas pelas células CCR26. Em conjunto estes dados apontam para um mecanismo de formação de trombos no CCR envolvendo fatores quimioatraentes presentes em VEs e NETs. Os resultados positivos destas abordagens podem trazer um benefício muito importante no tratamento de pacientes portadores de CCR que apresentam trombos tumorais em veias renais e veia cava inferior.

Palavras-chave: câncer renal, trombos tumorais, PDX, neutrófilos, NETS, vesículas extracelulares

ABSTRACT

Ikegami. **Involvement of extracellular vesicles in the dissemination mechanisms of renal cell carcinoma.** São Paulo, 2024 [Tese de Doutorado-Programa de Pós Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente]

Renal cell carcinoma (RCC) presents a highly variable clinical evolution: localized tumors, metastases and invasion of the venous system by tumor thrombi. Surgical resection is the main form of treatment and nephrectomy with thrombectomy are challenging procedures with high morbidity rates¹⁴. Our group generated patient-derived xenografts (PDX) from CRC patient tumor and tumor thrombus¹⁰⁰. Immunodeficient mice (NSG) orthotopically implanted with the tumor developed the disease and 50 to 60% also showed thrombus formation. The immortalized cell line CCR26 was generated from one of these PDX and its tumorigenic capacity and thrombus formation were confirmed. Cell characterization assays were performed using immunofluorescence, proliferation and migration. Neutrophil extracellular traps (NETs) are networks of DNA and proteins expelled by neutrophils and are related to cancer-associated thrombosis. Our results showed that mice with CRC that forms thrombi have approximately ten times higher plasma levels of IL-8 (an important neutrophil chemoattractant) than mice with CRC without tumor thrombi. These results are supported by others in which conditioned medium from CCR26 cells induced 2.4 times more human neutrophil migration in vitro than media from cell lines that do not form thrombi. After separating the soluble fraction of the culture medium from that formed by extracellular vesicles (EV) by ultracentrifugation, it was found that the chemoattraction activity is concentrated in EVs secreted by CCR26 cells. Taken together, these data point to a mechanism of thrombus formation in RCC involving chemoattractant factors present in EVs and NETs. The positive results of these approaches can bring a very important benefit in the treatment of patients with CRC who present tumor thrombi in the renal veins and inferior vena cava.

Key words: renal cancer, tumor thrombus, PDX, neutrophils, NETs, extracellular vesicles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Subtipos histológicos do CCR.....	15
Figura 2 – Classificação por níveis dos trombos tumorais de acordo com sua extensão.....	21
Figura 3 – Mecanismos relacionados à formação de NETs.....	24
Figura 4 - Mecanismos de liberação (esquerda) e captação (direita) das vesículas extracelulares.....	27
Figura 5 – Delineamento experimental.....	34
Figura 6 – Avaliação por imuno-histoquímica de marcadores de CCR do tumor primário do paciente doador e do tumor derivado do xenoenxerto proveniente da implantação do caso.....	45
Figura 7 – Linhagem celular CCR26 estabelecida a partir do PDX gerado pela inoculação do fragmento do tumor primário de paciente com CCR e trombo tumoral no rim de um camundongo NSG.....	46
Figura 8 – Demonstração da capacidade proliferativa da célula CCR26.....	48
Figura 9 – As células CCR26 possuem capacidade de formação de esferoides em cultura.....	49
Figura 10 – Migração das células CCR26 e Caki-1 avaliada em placas Transwell.....	50
Figura 11 – Imunofluorescência de tumores de PDX com anticorpos contra mieloperoxidase e histona H3, marcadores de NETs.....	52
Figura 12 – Níveis de IL-8 humana em plasma de camundongos PDX com CCR.....	53
Figura 13 – Indução da formação de NETs em neutrófilos tratados com PMA.....	55

Figura 14 – Neutrófilos humanos isolados de sangue periférico foram incubados por 4 hrs a 37°C com MC de células CCR26 e Caki.....	56
Figura 15 – O meio condicionado (CM) total da célula CCR26 promove a migração celular de neutrófilos humanos.....	57
Figura 16 –Potencial de migração de neutrófilos <i>in vitro</i>.....	58
Figura 17 – Vesículas extracelulares presentes no MC de células CCR26 são os componentes ativos responsáveis pela indução da migração de neutrófilos <i>in vitro</i>.....	60
Figura 18 –Concentração de vesículas extracelulares extraídas de meio condicionado das células CCR26 e Caki-1.....	61
Figura 19 –Quantidade de neutrófilos e linfócitos circulantes em pacientes com CCR.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento do câncer renal de acordo com o sistema TNM.....	17
---	-----------

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAP1	Proteína 1 associada ao BRCA1
CAT	Trombose Associada ao Câncer
CCR	Carcinoma de Células Renais
CCRcc	Carcinoma de Células Renais de células claras
CCRcr	Carcinoma de Células Renais cromóforo
CCRp	Carcinoma de Células Renais papilífero
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
FT	Fator Tecidual
HIF	Fator Induzível por Hipóxia
IFNα	Interferon alpha
IL2	Interleucina 2
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
ISEV	<i>International Society of Extracellular Vesicles</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
MMP9	Metaloproteinase de Matriz-9
MPO	Mieloperoxidase
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
NET	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
NK	Natural Killer
NSG	Nod scid gamma
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-I	Inibidor I do Ativador do Plasminogênio
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PBRM1	Proteína Polibromo-1

PBS	Tampão Fosfato Salino
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PDX	<i>Patient Derived Xenograft</i>
PRKDC	Proteína Quinase Dependente de DNA
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
rRNA	RNA ribossômico
SETD2	Domínio SET contendo 2, Histona Lisina Metiltransferase
SFB	Soro Fetal Bovino
TAN	Neutrófilos Associados ao Tumor
TC	Tomografia Computadorizada
TEV	Tromboembolismo Venoso
TKI	Inibidor de Tirosina Kinase
VCI	Veia Cava Inferior
VE	Vesículas Extracelulares
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial e Vascular
VHL	Von Hippel Lindau
VWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Carcinoma de células renais.....	13
1.2 CCR e trombo tumoral	19
1.3 Neutrófilos e <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> (NETs) ou armadilhas extracelulares do neutrófilo no processo tumoral	23
1.4 Vesículas extracelulares.....	26
1.5 Xenotransplantes derivados de tumores de pacientes – Patient derived xenografts (PDX) CRC de células claras.....	29
 2 OBJETIVOS.....	 31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
 3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	 32
3.1 Considerações éticas.....	32
3.2 Descrição do caso clínico.....	32
3.3 Modelo PDX.....	33
3.4 Implante ortotópico em camundongos.....	33
3.5 Reações de Imunohistoquímica	35
3.6 Cultura primária e estabelecimento da linhagem CCR26.....	35
3.7 Cultura de células CCR26, Caki e ACHN.....	36
3.8 Curva de proliferação celular	37
3.9 Crescimento em suspensão	37
3.10 Geração de organoides da célula CCR26.....	37
3.11 Migração das células tumorais CCR26 e Caki-1	38
3.12 Imunofluorescência para NETs em tecido tumoral.....	39
3.13 Ensaio Imunoenzimático ELISA para dosagem de citocinas.....	39
3.14 Isolamento de neutrófilos humanos de sangue periférico.....	40
3.15 Preparo de meio de cultura com soro fetal bovino depletado de VEs	40
3.16 Isolamento de vesículas extracelulares das linhagens celulares por ultracentrifugação e análise por NTA	40
3.17 Migração de neutrófilos <i>in vitro</i> através de câmaras transwell.....	41

3.18 Padronização da visualização de NETs por imunofluorescência.....	42
3.19 Imunofluorescência de neutrófilos – NETs in vitro.....	43
3.20 Análise da relação neutrófilo/linfócito do sangue de pacientes.....	43
3.21 Análise estatística.....	42
4 RESULTADOS	44
4.1 Estabelecimento e caracterização do modelo PDX	44
4.2 Caracterização da linhagem celular primária CCR26	45
4.3 Avaliação da tumorigenicidade da linhagem celular CCR26	47
4.4 A linhagem CCR26 possui alta capacidade de proliferação	47
4.5 A célula CCR26 possui capacidade de crescimento em 3D	49
4.6 Avaliação da capacidade de migração da CCR26	49
4.7 Tumores originados de PDX que formam trombos tumorais em veia cava apresentam aumento de “Neutrophil Extracellular Traps” NETs.....	51
4.8 Camundongos implantados com PDX de tumor que forma trombos, com células CCR26 ou com trombo tumoral possuem níveis elevados de IL-8 humana no plasma	53
4.9 Indução de NETs por acetato de tetradecanoilforbol (PMA)	55
4.10 Fatores secretados pelas células CCR26 no meio condicionado de crescimento induzem a formação de NETs em neutrófilos humanos	54
4.11 Fatores secretados pelas células CCR26 no meio condicionado de crescimento induzem a migração de neutrófilos humanos.....	56
4.12 Vesículas extracelulares e fatores solúveis do MC de células CCR26 induzem a migração de neutrófilos.....	59
4.13 Relação linfócito/neutrófilo em pacientes com trombos tumorais.....	62
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES.....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado pela proliferação descontrolada de células e reconhecimento deficiente do sistema imunológico. Todos os anos ocorrem novos casos de câncer e para 2023, nos Estados Unidos, foram estimados quase 2 milhões de novos casos com aproximadamente 600.000 mortes. As estimativas em 17 anos é que ocorra um aumento de 47% de incidência do câncer em relação a 2020^{1,2}. De acordo com estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA), ocorrerão 704 mil novos casos de câncer no Brasil para cada ano entre 2023 e 2025 com predominância nas regiões Sul e Sudeste, que acumulam cerca de 70% da incidência³.

Por tratar-se de uma doença complexa, a incidência e mortalidade crescem rapidamente em todo o mundo, refletindo os mais variados aspectos, desde envelhecimento e crescimento populacional até aspectos socioeconômicos relacionados à distribuição dos fatores de risco para o câncer e disponibilidade de assistência e saúde para a população em geral.

1.1 Carcinoma de células renais

Epidemiologia

O Carcinoma de Células Renais (CCR) é uma doença heterogênea que corresponde a 13^a neoplasia maligna mais comum globalmente, afetando mais de 400.000 indivíduos por ano. Em 2020, cerca de 179.000 pessoas morreram de câncer renal em todo o mundo. A incidência geográfica varia, com taxas mais altas na Europa e América do Norte. Para 2023, estima-se que 81.800 adultos serão diagnosticados com câncer renal nos Estados Unidos, onde é o sexto câncer mais comum nos homens e o nono nas mulheres. A média de idade ao diagnóstico é de 60 a 70 anos, não sendo comum em pessoas com menos de 45 anos e a proporção de incidência entre homens e mulheres é de 2:1^{2,4}.

Estima-se que apenas 30% dos pacientes são diagnosticados com base nos sintomas. A tríade clássica de dor no flanco, hematúria e massa abdominal são

observadas em 4 a 17% dos casos. Além disso, os pacientes podem apresentar febre, perda de peso, fadiga e anemia⁵.

Fatores de risco

Os fatores de risco mais relevantes ao desenvolvimento do câncer renal são idade e sexo. Outros fatores de risco potenciais são localização, etnia, excesso de peso corporal, hipertensão, doenças renais crônicas, falta de exercícios físicos, diabetes, exposição a agentes carcinogêneos e tabagismo. Em revisão sistemática e meta-análise, autores relatam que o risco de câncer renal e tabagismo é dose dependente e a propensão à doença é de 26% maior em relação a indivíduos que nunca fumaram^{5,6,7,8,9,10,11}.

Existem determinados fatores que conferem um alto-risco e são relacionados com um menor tempo de sobrevida para pacientes em estágio avançado da doença, como: nível de lactato desidrogenase (LDH) e cálcio sanguíneo alto, anemia, doença disseminada para dois ou mais órgãos, intervalo menor que um ano desde o diagnóstico até a necessidade de tratamento sistêmico e baixo estado geral de saúde. Pacientes que não possuem nenhum desses fatores são considerados de bom prognóstico, enquanto os que apresentam 1 ou 2 fatores são considerados com prognóstico intermediário e os que têm 3 ou mais com prognóstico reservado e pouca probabilidade de responder bem aos tratamentos oferecidos¹².

Mutações germinativas e somáticas também são fatores de predisposição ao câncer renal. Através de dados do Atlas do Genoma do Câncer, estima-se que 6 a 9% dos casos apresentavam alteração da linhagem germinativa de genes relacionados à predisposição ao câncer¹³.

Origem e subtipos histológicos

O CCR surge das células epiteliais tubulares renais e abrange mais de 90% dos cânceres renais, sendo o câncer urogenital mais letal com uma taxa de mortalidade de 30 a 40%^{14,15}. É dividido em subtipos histológicos que apresentam características

morfológicas, genéticas e progressão clínica diferentes, com impacto direto no prognóstico e escolha de tratamento. Com base nas características histológicas os subtipos mais comuns são: Células claras (CCRcc), com 70% de incidência; Papilíferos (CCRp), com incidência entre 13-20% e Cromóforo (CCRch) com incidência entre 5-7% (Figura 1). Tanto o CCRcc como o CCRp originam-se de células do túbulo proximal, enquanto o CCRch é originado a partir dos túbulos de conexão distais e do sistema de ductos coletores¹⁶. O CCR Oncocítico, o carcinoma dos ductos de Bellini e outros subtipos raros representam 1% do total de casos¹⁷.

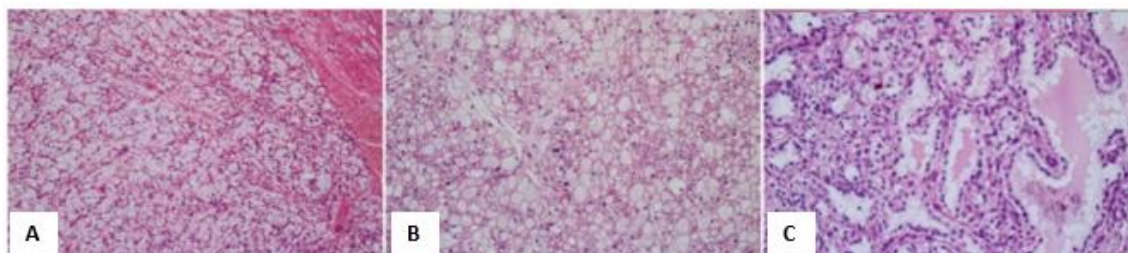


Figura 1. Subtipos histológicos do CCR. A) Células claras, B) Cromóforo, C) Papilífero. Fonte: Athanazio, D.A. (2021)

As classificações do CCR evoluem ao longo dos anos de acordo com a Organização Mundial da Saúde, incluindo novos subgrupos ou reagrupando classificações pré-existentes a fim de aliar características morfológicas e moleculares específicas com respostas terapêuticas¹⁹.

O CCR de células claras (CCRcc) leva esse nome devido à aparência histológica das células, com membranas finas e abundantes em lipídios e glicogênio e citoplasma claro²⁰. Avanços consideráveis nas áreas da biologia celular e molecular do CCRcc permitiram o entendimento de alguns mecanismos moleculares envolvidos na doença. A perda da região cromossômica 3p é uma característica que ocorre em mais de 90% dos pacientes diagnosticados com este subtipo histológico. Este evento é considerado o condutor inicial do CCRcc esporádico, que ocorre em 95% dos casos quando comparado ao CCRcc hereditário. Em 1993, a descoberta do gene supressor tumoral von Hippel Lindau (*VHL*) forneceu a base para a compreensão do CCRcc tanto no contexto esporádico quanto hereditário. A perda do gene *VHL* está presente em 70% nos casos de CCRcc. Na ausência da proteína *VHL*, o fator induzido por hipóxia HIF é estabilizado e promove a transcrição de fatores relacionados à angiogênese, como fator

de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF). O gene VHL juntamente com os genes modificadores de cromatina *PBRM1*, *BAP1* e *SETD2*, estão próximos e na região do cromossomo 3p, portanto a perda desta região cromossômica leva à depleção das proteínas codificadas por eles e ausência de função desses genes^{21,22,23}.

São identificadas também alterações no número de cópias cromossômicas no CCRcc que estão associadas à progressão e letalidade do tumor. Um exemplo disso, é a perda em grande parte ou total do cromossomo 3p e o gene polibromo (*PBRM1*), o domínio SET 2 (*SETD2*) e a proteína 1 associada ao BRCA (*BAP1*) Perfis de expressão gênica e alterações genômicas juntamente com estudos quanto a sua heterogeneidade forneceram mais informações a respeito da evolução clonal do CCRcc²⁴.

O Carcinoma de Células Renais do tipo Papilífero é o segundo tipo mais frequente e embora defendido um melhor prognóstico em relação ao CCRcc na doença metastática é acompanhado de uma evolução ruim. O CCRp caracteriza-se pela presença de células tumorais que formam estruturas semelhantes a papilas, projeções de células que se estendem a partir da superfície do tumor. Este subtipo do CCR se subdivide em tipo 1 e tipo 2 de acordo com sua morfologia, sendo o tipo 1 com papilas delgadas e uma única camada de células e o tipo 2 com papilas mais largas e diversas camadas de células eosinofílicas²⁴.

O CCR do tipo Cromóforo é um tipo raro de câncer renal que se forma nas células que revestem os pequenos túbulos renais. A morfologia clássica do CCRcr são as células tumorais com citoplasma claro e granular, clareamento perinuclear e contornos nucleares irregulares. Estes tumores possuem baixa taxa de mutação somática quando comparados ao CCRcc. Algumas vias metabólicas mais ativas são relacionadas à produção de energia pelas mitocôndrias e dois genes são frequentemente encontrados mutados neste tipo de CCR, TP53 e PTEN^{25,26}.

Diagnóstico e estadiamento

O diagnóstico histológico do câncer renal além de definir o subtipo tumoral inclui o estadiamento, que prevê a avaliação do grau nuclear, características

sarcomatóides, invasão vascular e o sistema de coleta, necrose tumoral e gordura perirrenal²⁷. Em 2021 a American Joint Committee on Cancer (AJCC) publicou a 9ª edição do Manual de Estadiamento do Câncer com os objetivos de atualizar as nomenclaturas com base na terminologia da patologia contemporânea, esclarecer as classificações histológicas e apresentar fatores preditivos de forma criteriosa. Para o CCR do tipo células claras e papilíferos, as atualizações incluem a adoção do sistema de classificação histológica e nuclear OMS/ISUP de quatro níveis, em que se considera o grau de proeminência nuclear e atribui-se nota de 1 a 3 e a presença de células pleomórficas altamente atípicas e morfologia sarcomatoide e rabdoide para o grau 4^{28,29}.

As técnicas de imagem como a tomografia computadorizada (TC) associada à análise histopatológica do material proveniente de biópsia compõem o diagnóstico clínico. De acordo com a AJCC, o estadiamento do câncer renal é realizado através do sistema TNM em que: T indica o tamanho do tumor e se existe disseminação para outras áreas; N descreve disseminação para os linfonodos regionais e M indica se há metástase, como apresentado na Tabela 1^{30,31}.

Conhecer o estadio do tumor auxilia na escolha do tratamento e no conhecimento do prognóstico do paciente. O câncer de rim tende a ser assintomático em suas fases iniciais, o que dificulta o diagnóstico precoce. Com isso, estima-se que 20 a 30% dos pacientes são diagnosticados em estadios avançados ou já com metástases. As taxas de sobrevida dos pacientes caem para 50% quando diagnosticados no estadio III e são menores que 10% quando o tumor se encontra no estadio IV^{32,33,34}.

Tabela 1. Estadiamento do câncer renal de acordo com o sistema TNM. Fonte: Oto, J. (2020)

Estadio	Grupo	Descrição
I	T1, N0, M0	Tumor de até 7 cm de diâmetro restrito ao rim.
II	T2, N0, M0	Tumor maior que 7 cm de diâmetro ainda restrito ao rim.
III	T3, N0, M0 ou T1 a T3, N1, M0	Tumor crescendo na veia renal ou cava, mas ainda não invade a glândula adrenal ou além da fáscia de Gerota. O tumor principal pode ser de qualquer tamanho e pode estar fora do rim, mas não além da fáscia de Gerota. Há invasão para os linfonodos regionais.
IV	T4, qualquer N, M0 ou Qualquer T ou N, M1	O tumor principal está crescendo além da fáscia de Gerota. Pode ou não ter se espalhado para os linfonodos próximos. Tumor principal de qualquer tamanho com metástase para outros órgãos.

Tratamento

O uso da vigilância ativa nos casos de CCR é fundamental aos pacientes que apresentam pequenas massas renais de crescimento lento, idosos ou pacientes com comorbidades e expectativa de vida curta e para evitar complicações decorrentes das cirurgias em curto e longo prazo. Nesses casos a vigilância ativa torna-se mais benéfica que intervenções cirúrgicas^{35,36}. Técnicas minimamente invasivas como crioterapia e ablações por radiofrequência em pequenos tumores ou em pacientes com apenas um rim representam boas chances de cura com pouco manejo cirúrgico. Quando é necessário o método cirúrgico pode-se utilizar a cirurgia poupadora de néfrons ou a nefrectomia radical, a depender do caso. Entretanto um terço dos pacientes desenvolvem a doença metastática com pior prognóstico e distinções cruciais na progressão e desenvolvimento do curso clínico da doença bem como da sua biologia celular e molecular^{24,37,38,39}.

Estima-se que 20 a 30% dos pacientes com CCR apresentam metástases à distância e 2 a 5% recorrência da doença local. Neste contexto, as abordagens adjuvantes incluem terapia hormonal, radioterapia, imunoterapia e agentes alvo⁴⁰. O CCR metastático tende a invadir fígado, pulmões, ossos e gânglios linfáticos, requer terapia sistêmica neoadjuvante que utilize combinações de tratamento a serem feitas de acordo com a escolha do médico baseada em recomendações e *guidelines* derivados de ensaios clínicos. Historicamente, o CCR metastático era tratado com terapia sistêmica baseada em imunossuppressores como IL2 e INF α , porém este com um grupo seletivo de pacientes respondedores e com altas taxas de toxicidade associada (24% de mortalidade)⁴¹. Com a evolução no entendimento do câncer renal, a abordagem do tratamento é definida pelas alterações moleculares presentes no tumor.

A melhor compreensão dos mecanismos moleculares da progressão do CCR é importante para a descoberta de novos marcadores prognósticos e terapias direcionadas, além de possibilitar o acompanhamento dos pacientes em estádios iniciais submetidos à cirurgia, considerando o risco de recidiva local ou sistêmica.

A Associação Europeia de Urologia recomenda inibição do ponto de controle imunológico (nivolumabe mais ipilimumabe – anticorpos monoclonais que regulam negativamente a ativação das células T como tratamento de primeira linha para pacientes metastáticos. Pacientes que não toleram inibidores do ponto de controle imunológico fazem uso de terapia-alvo com inibidores de tirosina kinase (TKI) direcionados ao fator de crescimento endotelial e vascular (VEGF) (sunitinibe e pazopanibe)⁴².

1.2 CCR e trombo tumoral

Um dos aspectos clínicos do CCR é que ele pode se estender para a veia renal, invadindo a veia cava inferior e até progredir para o átrio direito em casos mais avançados. O mecanismo subjacente à formação de trombos tumorais é desconhecido. Os trombos são estruturas que se formam dentro dos vasos sanguíneos, interrompendo o fluxo de sangue. Estudos sobre a composição de trombos oriundos de lesão ou disfunção endotelial em doenças cardiovasculares, geralmente trombos arteriais, mostram que estes são constituídos de glóbulos vermelhos, plaquetas, fibrinas com fator de von Willebrand (VWF), glóbulos brancos, neutrophil extracellular traps (NETs) e DNA extracelular. Esta heterogeneidade na composição dos trombos muda de acordo com a doença: no AVC isquêmico agudo, há regiões ricas em glóbulos vermelhos e plaquetas; no tromboembolismo venoso, glóbulos vermelhos, fibrinas, algumas plaquetas e leucócitos; no infarto agudo do miocárdio a composição é influenciada pelo tempo de isquemia⁴³.

Os estudos de trombos originados de tumor, chamados de trombos tumorais, são escassos, pois os modelos animais de trombose e estrutura de trombos são limitados a lesões em artérias e vasos e não são provenientes de tumor prévio. Esta condição também é denominada como trombose associada ao câncer (TAC). Estima-se que a incidência anual de tromboembolismo venoso (TEV) em pacientes com câncer seja de 0,5% contra 0,1% para a população em geral. O câncer ativo é responsável por 20% da incidência de TEV geral sendo que para o câncer renal o risco relativo de diagnóstico em 5 anos de trombo em pacientes hospitalizados é de 5,8%. É importante destacar que

nos pacientes com câncer o TEV é a segunda principal causa de morte depois da própria progressão da doença⁴⁴.

Como já apresentado na Tabela 1, a presença de trombo tumoral, identificado como a extensão do tumor para um vaso, altera o estadiamento, prognóstico e abordagem clínica. A partir do estadiamento T3a o trombo tumoral está presente na veia renal ou seus segmentos ou invade a gordura perirrenal, mas não se estende além da Fáscia de Gerota. No estadiamento T3b o trombo tumoral estende-se para a veia cava inferior (VCI) mais abaixo do diafragma. O trombo está acima do diafragma ou invade a parede da VCI, em T3c e finalmente apresenta invasão além da Fáscia de Gerota e glândula adrenal em T4. Por sua vez, a classificação de trombo da Clínica Mayo é amplamente utilizada para descrever os estágios de avanço dos trombos tumorais, sendo estes em 4 níveis: veia renal, infra-hepático, intra-hepático e no último estágio estendendo-se até o átrio⁴⁵.

Na literatura, existem discrepâncias quanto às descrições minuciosas de cada um desses níveis e estas diferenças possuem relevâncias no contexto da nefrectomia radical assistida por robótica com trombectomia da VCI. Quando os tumores estão acima das veias hepáticas pode ser necessária a mobilização do fígado e manobras que conferem maior complexidade cirúrgica. Leibovich, Bradley e colaboradores (2020) ilustraram uma reclassificação de trombo com níveis sucessivos que, apesar de não alterar a capacidade preditiva das classificações de trombo existentes ilustra o desenvolvimento e a extensão dos trombos (Figura 2)⁴⁶.

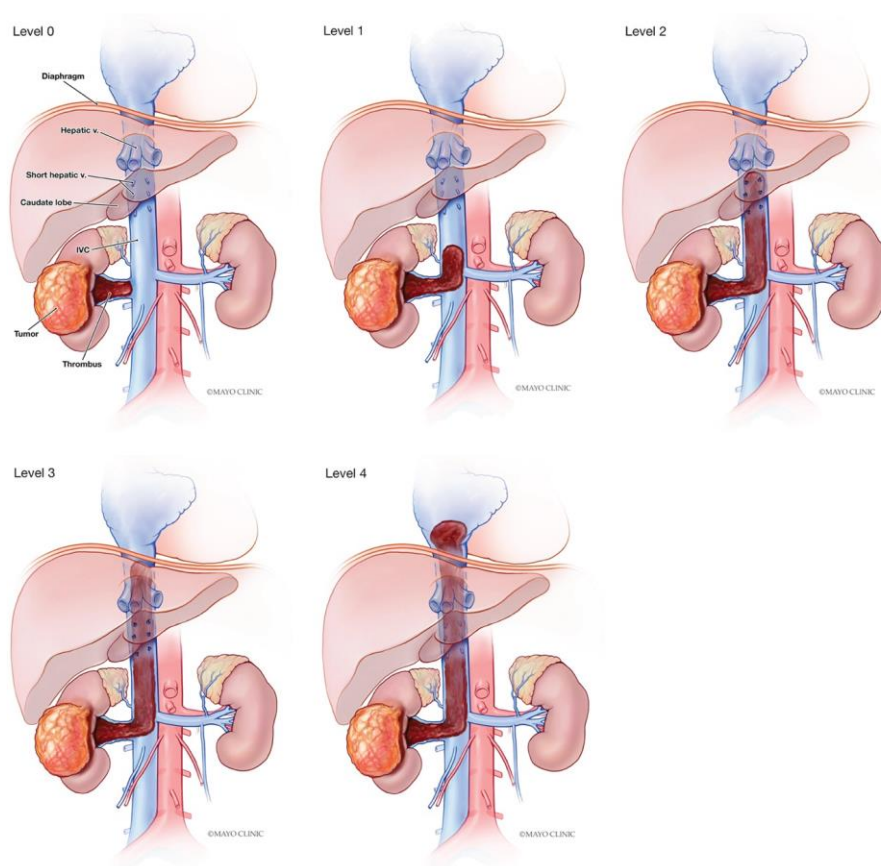


Figura 2. Classificação por níveis dos trombos tumorais de acordo com sua extensão. 0) Restrito à veia renal. 1) Trombo na veia cava inferior; abaixo da margem inferior do lobo caudado. 2) Trombo acima da margem inferior do lobo caudado e abaixo das grandes veias hepáticas. 3) Trombo nas veias hepáticas principais. 4) Trombo acima do diafragma. Fonte: Leibovich, B. C (2020)

O trombo tumoral intravascular é encontrado em, aproximadamente, 10% dos pacientes com CCR na veia renal e em aproximadamente 4 a 19% destes pacientes ocorre extensão dos trombos para VCI. Nestes casos, essa extensão é um indicativo de mau prognóstico, com sobrevida média de 6 meses em casos sem tratamento. A extensão do trombo tumoral também pode acometer os átrios, como relatado por Bhat e colaboradores (2019), em que o caso clínico apresentava CCRcc com extensão do trombo tumoral para o átrio direito^{47,48}.

Estudos indicam que o grau do trombo tumoral, a invasão de linfonodos e metástases à distância como fatores prognósticos independentes. A sobrevida geral em 5 anos pode variar de 32 a 69% dependendo de fatores como metástase no momento do

diagnóstico. Os pacientes com CCR e trombos tumorais apresentam pior sobrevida^{49,50,51}.

Um estudo que avaliou os dados clínicos e patológicos de 128 casos de pacientes com CCR entre 2000 e 2015 indicou fatores prognósticos independentes como trombos friáveis, síndrome paraneoplásica, modificação da graduação histológica de Fuhrman de 3 para 4 (de nucléolos proeminentes de 20 µm, formato redondo/oval, cromatina granular grosseira para nucléolos maiores que 20 µm, de formato pleomórfico multilobulado e cromatina aberta hipercromática) e invasão da gordura perirrenal. A sobrevida em 5 anos para estes pacientes após a nefrectomia radical foi de 100% para aqueles com baixo risco (sem nenhum dos fatores prognósticos), de 68.6% para os de médio risco (1 ou 2 fatores prognósticos) e de 0% para os de alto risco (3 ou 4 fatores)⁵².

A cirurgia de casos avançados de CCR com trombos tumorais é tecnicamente desafiadora e está associada à morbidade cirúrgica. Aproximadamente 20% dos pacientes que possuem CCR e trombos tumorais concomitantemente são considerados de alto risco operatório. Se a ressecção cirúrgica não for viável, a história natural da doença para pacientes não tratados que apresentam trombo tumoral é bastante reservada. A intervenção cirúrgica de um trombo tumoral avançado (nível III/IV) resulta em cerca de 50% de sobrevida em cinco anos na ausência de metástase⁵³.

Terapias neoadjuvantes são direcionadas estes casos de CCR em estágio avançado e metastático com o intuito de regredir a formação dos trombos, controlar o crescimento tumoral e/ou a expansão da metástase para posterior nefrectomia citorrredutora e trombectomia endovascular. Terapias com de VEGFR ou mTOR além de imunoterapias com inibidores de checagem imunológica como ipilimumab e nivolumab continuam sendo os principais tratamentos para pacientes com CCR e invasão de trombo tumoral⁵⁴, porém a variação de pacientes beneficiados com estes tratamentos está entre 25 e 67%^{55,56}.

A complexidade dos eventos biológicos envolvidos com a formação de trombos nos CCR é pouco caracterizada. Portanto, é necessário melhorar o entendimento dos mecanismos que levam a invasão tumoral em forma de trombos para que o tratamento desses pacientes seja direcionado adequadamente e promova um aumento na sua sobrevida.

1.3 Neutrófilos e *Neutrophil extracellular traps* (NETs) ou armadilhas extracelulares do neutrófilo no processo tumoral

Os neutrófilos são um tipo de leucócitos do grupo granulócitos polimorfonucleares que desempenham papel fundamental em condições inflamatórias, sendo as primeiras células a chegar no local e componentes críticos da imunidade inata e manutenção da homeostase dos tecidos. Eles sobrevivem em torno de 12 h em circulação e sua primeira função reconhecida foi a de atuar contra microorganismos invasores. Com crescentes estudos na área, sabe-se hoje que os neutrófilos têm importância para a progressão do câncer e podem atuar em todos os seus estágios^{57,58}.

Uma característica fundamental dos neutrófilos é a sua capacidade de migração para locais com inflamação. Esse processo é ativado por citocinas, estruturas denominadas PAMPs (Padrões Moleculares Associados ao Patógeno), lipídios além de um conjunto outros fatores celulares⁵⁹. Quando ativados os neutrófilos liberam fatores citotóxicos como compostos antimicrobianos, serina proteases, lisozima e metaloproteases. Estes atuam na sua degranulação, fagocitose e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que são estruturas responsáveis por capturar e degradar patógenos invasores como um mecanismo de defesa⁶⁰.

Para formar NETs, os neutrófilos dependem de espécies reativas de oxigênio (do inglês, ROS), atividade de mieloperoxidase (MPO), elastase de neutrófilos e citrulinização de histonas mediada por PAD4. No interior dos neutrófilos, a elastase degrada o citoesqueleto de actina impedindo sua migração e capacidade fagocitária. A membrana nuclear é degradada, fazendo com que o conteúdo nuclear entre em contato com enzimas citotóxicas liberadas pelos grânulos. A elastase ativa ainda caspase 11 que ativa Gasdermina-D, responsável por abrir poros na membrana plasmática dos neutrófilos fazendo com que estes percam a integridade e liberam o conteúdo intracelular para o meio externo. Este conteúdo intracelular, denominado NETs, é formado por filamentos de DNA descondensado e histonas citrulinadas associados a proteínas e componentes citoplasmáticos do neutrófilo. Os NETs podem ser facilmente identificados por reações de imunomarcção pelo uso de anticorpos que reconhecem histonas citrulinadas, mieloperoxidase e elastase^{61,62,63,64}.

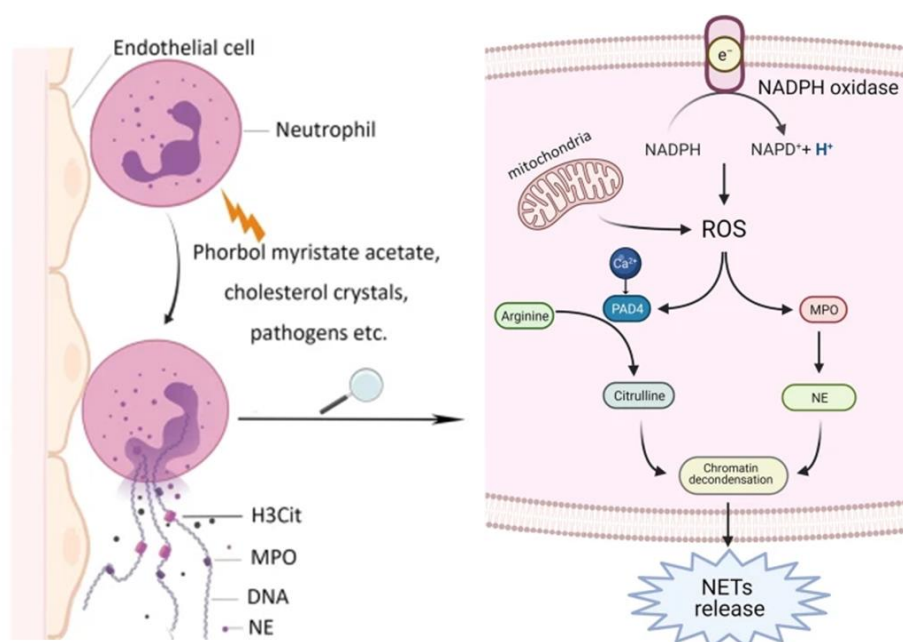


Figura 3. Mecanismos relacionados à formação de NETs. Neutrophil extracellular traps – NETs são formados pela liberação de cromatina descondensada e proteínas granulares com elementos do núcleo (H3cit, MPO, DNA e NE). A indução da formação pode ser causada por compostos como acetato de forbol miristato ou cristal de colesterol. A PAD4 pode ser ativada por espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas por nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), mitocôndrias ou ionóforo de cálcio que levam à citrulinização de resíduos de arginina de histonas. A gasdermina D também é necessária para a formação de ROS e esta medeia a translocação de MPO e NE do núcleo. Este processo leva a rápida desmontagem do citoesqueleto do neutrófilo, descondensação da cromatina, permeabilização da membrana plasmática e envoltório nuclear e finalmente os NETs são liberados através da ruptura total da membrana plasmática. Fonte: XU et al. 2022.

O papel dos neutrófilos no câncer é dicotômico e controverso. Eles podem tanto exercer efeito antitumoral como ajudar na progressão tumoral. A identificação de neutrófilos ativados no microambiente tumoral e sua atividade imunossupressora e pró-tumorigênica sugere uma contribuição para o desenvolvimento do tumor. Estudos relatam propriedades amplas dos neutrófilos que vão da progressão do ciclo celular com promoção do crescimento do tumor primário e das metástases. São responsáveis ainda pela manutenção das células tronco tumorais, e interrupção de sua dormência, imunovigilância prejudicada e resistência a terapia antineoplásica^{66,67}.

A ativação do receptor da quimiocina CXCR2 é crucial para a mobilização dos neutrófilos da medula óssea para a circulação. No câncer humano, o ligante de CXCR2 - CXCL 8 (IL8) - que é secretado por diversos tipos tumorais é suficiente para regular positivamente o recrutamento dos neutrófilos⁶⁸.

Os neutrófilos estão envolvidos em cada etapa da cascata metastática, desde a formação do nicho pré-metastático, extravasamento das células tumorais do sítio primário, invasão do sistema venoso e linfático, ativação das células tumorais dormentes e desenvolvimento da metástase⁶⁹. Quando se encontram em quantidades mais elevadas, os neutrófilos liberam altos níveis de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que inibe a proliferação das células T citotóxicas contribuindo para a progressão tumoral⁷⁰. A ativação das células tumorais dormentes se dá através da elastase de neutrófilos e metaloproteinase de matriz (MMP9) presentes nos NETs, estas enzimas são capazes de remodelar a matriz extracelular, induzir a proliferação das células tumorais e seu extravasamento para a corrente sanguínea⁷¹.

A trombose venosa profunda (TVP) associada ao câncer é um evento trombótico que acontece em decorrência do câncer ou de seu tratamento. A história clínica do paciente, o sítio e o tipo tumoral contribuem para o risco da sua ocorrência, o que indica que a trombose venosa em pacientes com câncer usa mecanismos moleculares diferentes para cada tipo tumoral. A formação de NETs é um dos mecanismos associados ao TVP, e um estudo mostrou que 7% dos pacientes com TEV possuíam câncer e metade dos casos de câncer foram diagnosticados em 10 dias após o diagnóstico de TEV. Estes pacientes apresentaram níveis plasmáticos mais elevados de H3cit-DNA e “cell free DNA” cfDNA⁷².

Apesar da trombose por trombos tumorais e a TVP envolverem, em alguns casos, mecanismos associados a NETs, suas diferenças moleculares são claras. O uso de anticoagulantes clássicos é ineficaz e não promove um aumento na sobrevida dos pacientes com trombos tumorais, e, portanto, não é conduta terapêutica em grandes centros oncológicos⁷³.

Uma revisão sobre a associação de trombose e câncer de 2012 mostra como este campo da pesquisa clínica evoluiu nos últimos 40 anos. Neste cenário, um cruzamento contínuo dos dados clínicos e experimentais é necessário para que estas respostas sejam formuladas e os tratamentos se tornem cada vez mais adequados e assertivos⁷⁴.

1.4 Vesículas extracelulares

De acordo com a diretriz de 2018 da International Society for Extracellular Vesicles (ISEV), as vesículas extracelulares podem ser definidas como: “O termo genérico para partículas liberadas naturalmente da célula que são delimitadas por uma bicamada lipídica e não podem se replicar”. O termo “vesículas extracelulares” (VEs) compreende um grupo heterogêneo de vesículas que se diferenciam entre si por sua célula de origem, processos pelos quais são formadas, composição molecular, tamanho e propriedades físicas^{75,76}.

As VEs podem ser classificadas quanto suas células de origem, como prostassomos e oncosomos de acordo com sua biogênese (exossomos, microvesículas – também chamadas de ectossomos ou micropartículas - e corpos apoptóticos). Os exossomos, que compreendem o tipo de VEs de menor tamanho (30-100 nm), são formados através da fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática, levando à liberação dos componentes vesiculares no espaço extracelular. Já as microvesículas (100-1000 nm) são formadas diretamente da membrana plasmática. Tanto os exossomos quanto as microvesículas apresentam um cargo de proteínas, lipídeos, mRNA, miRNA e componentes do citoplasma celular e fazem o transporte destes componentes de uma célula à outra, desempenhando importante papel na comunicação intercelular, entregando sinais específicos. A interação das VEs com as células alvo inicia com uma ligação mediada por ligante-receptor, adesão ou acoplamento das VEs às células, no entanto na maioria dos casos as VEs exercem seu papel biológico através da transferência de moléculas sinalizadoras^{77,78,79,80} (Figura 4).

Os principais mecanismos usados pelas células-alvo para captar VEs são endocitose e fusão de membrana e essa absorção depende em grande parte da célula receptora. Por células tumorais, por exemplo, dominam a macropinocitose e endocitose independente de clatrina, o primeiro envolve rearranjo dos filamentos de actina e

projeções da membrana plasmática e o segundo dispensa o papel desta proteína que atua no processo de formação de vesículas membranares. Já as células do sistema imune apresentam predileção por processos de internalização por fagocitose, como as células dendríticas, macrófagos e células T⁸¹.

A interação de VEs e células também desempenha papel terapêutico. Um estudo demonstrou que vesículas derivadas células-tronco humanas mesenquimais da medula óssea estimularam a proliferação de células epiteliais tubulares e protegeram células de apoptose através da entrega de RNA⁸².

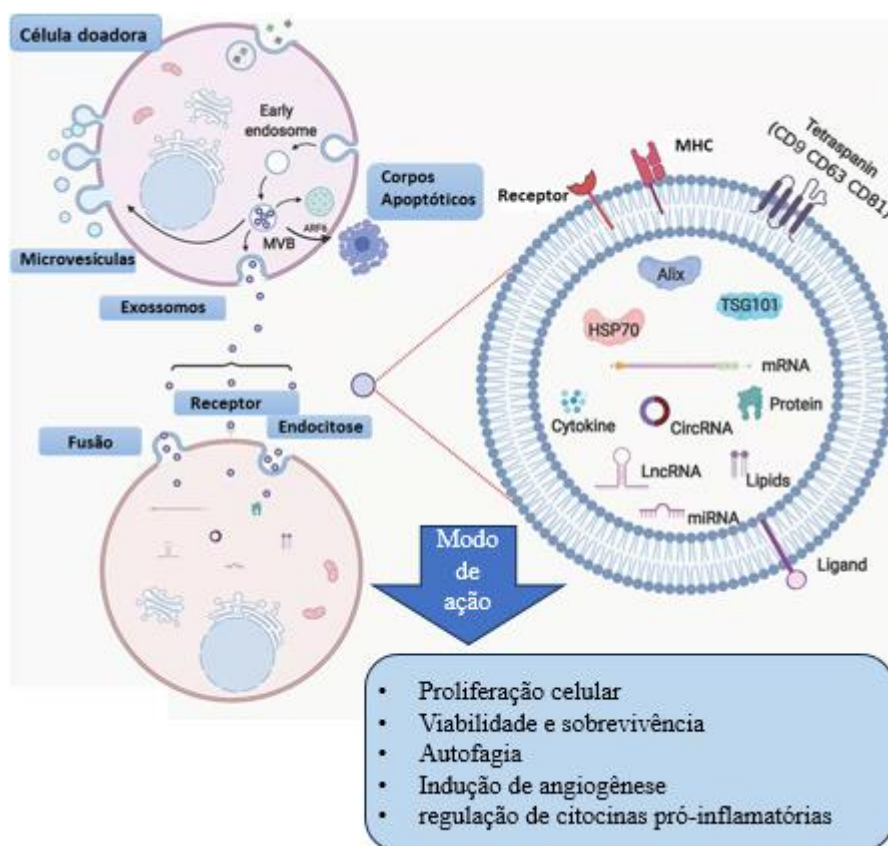


Figura 4. Mecanismos de liberação (esquerda) e captação (direita) das vesículas extracelulares. As VEs são liberadas em várias formas, entre as mais conhecidas, exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Elas são captadas pelas células receptoras por endocitose, fagocitose, pinocitose ou fusão de membrana. Os ligantes das membranas das VEs também podem se ligar aos receptores das membranas celulares (ou célula alvo) para então induzir um sinal intracelular. Fonte: Modificado de Barreca, M. M. et al, (2020), Chen, K. et al, (2022).

As VEs estão envolvidas na comunicação célula a célula e podem transferir receptores, ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, desencadeando respostas fisiológicas

e patológicas nas células alvo. Como as VEs são liberadas por domínios ricos em proteínas da membrana celular, sua camada externa tem altas concentrações de receptores e proteínas da membrana da célula de origem⁸⁵. Elas podem ser detectadas no sangue e urina, e em outros fluídos corporais, como secreções da próstata, fluído seminal, fluído cérebro-espinhal, fluído sinovial, saliva, bile, dentre outros. Suas funções fisiológicas incluem modulação imunológica, reparo vascular e promoção de angiogênese, adesão, proliferação e regeneração tecidual⁸⁶. As VEs derivadas de células tumorais apresentam moléculas específicas do tumor que contribuem para o desenvolvimento tumoral, como fatores de crescimento, oncoproteínas e moléculas imuno-modulatórias, auxiliando na formação de nicho pré-metastático, modulação do estroma e interferindo na resposta imunológica anti-tumor^{87,88}.

Estudos têm apontado uma correlação entre o risco de desenvolvimento de trombose venosa em pacientes com câncer e a liberação de VE pelo tumor^{89,90}. As VEs podem explicar a formação de trombos à distância do sítio tumoral por carregarem informações das células tumorais que alteram fenotipicamente as células normais. Em comparação com células normais, as células tumorais podem produzir níveis significativamente maiores de VEs⁹¹.

Estudos demonstraram uma correlação entre o aumento nos níveis plasmáticos de VEs positivas para o fator tecidual (TF) - importante mediador da cascata de coagulação – com um estado pró-trombótico em modelos animais e em pacientes. Esta correlação pode não existir em alguns tipos de câncer como: gástrico, colorretal e mama. A partir daí sugeriu-se que os exossomos podem ter papel subestimado nos estudos de trombose⁹².

A associação entre VEs e NETs tem sido objeto de estudos científicos e evidências sugerem que VEs liberadas carregam proteínas e ácidos nucleicos que podem modular a atividade de neutrófilos e influenciar a liberação de NET transportando fatores pró-inflamatórios e contribuindo para a inflamação e lesão tecidual. Células endoteliais e plaquetas podem induzir a formação de NETs pelo aumento da resposta inflamatória em situações como sepse e doenças autoimunes. Há ainda uma associação entre VEs liberadas de células tumorais e sua associação com NETs e consequente ativação do estado pró-trombótico no câncer⁹³.

Camundongos BALB/c que foram injetados ortotopicamente com células de tumores de mama exibiram níveis aumentados de marcadores de NETs e neutrófilos circulantes. Quando submetidos ao modelo de trombose induzida, os animais apresentaram formação acelerada de trombos. Adicionalmente, exossomos derivados do tumor induzem a formação de NETs em neutrófilos de camundongos tratados com G-CSF⁹⁴.

Tomados em conjunto, os dados sugerem que existe correlação entre NETs e VEs e é importante compreender os mecanismos subjacentes à formação de trombos nos diferentes tipos de câncer para formular novas estratégias terapêuticas.

1.5 Xenotransplantes derivados de tumores de pacientes - Patient-derived xenografts (PDX) CRC de células claras

Os modelos PDX – patient derived xenografts – são estabelecidos a partir do transplante de tecido tumoral fresco de pacientes humanos em camundongos e se destacam por refletirem as características e simular a progressão do câncer humano nesses animais. Este modelo é promissor e robusto, sendo capaz de auxiliar na predição de biomarcadores, exploração do efeito da heterogeneidade intratumoral, entender os processos tumorais e a relação com o microambiente tumoral, e para o “screening” de novos medicamentos⁹⁵. O primeiro modelo de estudo descrito utilizando a técnica PDX foi feito por Rygaard e Povlsen em 1969 que removeram adenocarcinoma de cólon de um paciente e implantaram o fragmento em camundongos nude. Os resultados mostraram que quando os camundongos respondiam ao tratamento de forma semelhante aos pacientes correspondentes. Desta forma, reproduzindo a patologia clínica original e recapitulando as características celulares e moleculares dos tumores humanos^{96,97}.

A semelhança molecular entre os xenoenxertos e os tumores humanos possibilita que os testes de efeito terapêutico e predição de resistência aos medicamentos também sejam ferramentas promissoras para identificar e validar novos medicamentos e obter dados pré-clínicos robustos para pesquisa translacional⁹⁵.

Os camundongos utilizados para PDX são imuno comprometidos para evitar a rejeição do implante. Diferentes cepas de camundongos possuem graus variados de

imunossupressão e, conseqüentemente, apresentam diferentes taxas de enxertia⁹⁸. Um dos camundongos com maior imunodeficiência é o NSG (NOD-scid gamma) que carrega mutações na base genética NOD/ShiLtJ combinada à imunodeficiência grave (scid) e um alelo nulo completo da cadeia gamma comum do receptor de IL-2. A mutação scid na proteína PRKDC (proteína quinase dependente de DNA) do complexo de reparo do DNA torna os camundongos deficientes em células B e T. A mutação de IL-2 impede a sinalização de citocinas através de múltiplos receptores, levando à ausência de células NK funcionais. Em resumo, neutrófilos e monócitos constituem a maioria do restante das células imunes detectáveis no sangue periférico dos camundongos NSG, sendo que as células dendríticas e macrófagos também estão presentes, embora sejam defeituosos devido aos alelos NOD/ShiLtJ^{98,99}.

Um trabalho conduzido por Adriano Besserra do nosso grupo mostrou o estabelecimento de um modelo ortotópico de tumores primários ou metastáticos de PDX de pacientes com CCR¹⁰⁰. Diferentes tipos de tumor diferem no tempo de crescimento do PDX podendo variar de alguns dias a vários meses. Assim como com cultura de células, pode-se realizar passagens dos tumores de um camundongo para outro, garantindo a manutenção do modelo^{101,102}. Um dos modelos gerados de ccCCR é capaz de formar trombos tumorais na veia cava inferior, mimetizando o quadro do paciente doador da amostra. Este é o primeiro modelo de PDX, pelo menos que temos informação, que é capaz de formar trombos tumorais à semelhança do paciente.

O conhecimento restrito sobre os mecanismos envolvidos com a formação de trombos tumorais em pacientes com CCR, a necessidade clínica não atendida de tratar estes pacientes e a oportunidade de possuir um modelo animal que mimetiza esta doença nos incentivou a desenvolver este estudo. A identificação de possíveis alvos terapêuticos trará muitos benefícios, certamente com aumento significativo na sobrevida destes pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo tem por objetivo entender os mecanismos associados à formação de trombos tumorais em veia cava nos carcinomas renais de célula claras.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer linhagem celular imortalizada a partir de PDX de paciente com CCR e trombo tumoral.
- Comparar a proliferação e migração celulares nas linhagens de CCR formadoras ou não de trombos tumorais em veia cava.
- Entender o papel dos neutrófilos na formação de trombos tumorais e a ativação NETs *in vitro* pelas linhagens tumorais estabelecidas.
- Validar os achados *in vitro* com identificação de neutrófilos e NETs em PDX de camundongos inoculados com células de CCR formadores ou não de trombos tumorais em veia cava.
- Avaliar se vesículas extracelulares liberadas pelas células tumorais formadoras ou não de trombos em veia cava são capazes de ativar neutrófilos e levar a formação de NETs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Nosso grupo padronizou um modelo PDX a partir de um caso clínico de CCR com formação de trombos e metástase pulmonar realizado pelo aluno do grupo Adriano de Oliveira Beserra (100), o que permitiu o estabelecimento de linhagem celular derivada do PDX (CCR26) pela pós-doutoranda Ethiene Castellucci Estevam (dados não publicados). Alguns detalhes do caso e metodologia são descritos nas sessões 3.1 a 3.3.

3.1 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética (CEP) da Fundação Antônio Prudente, processo 2201/16E e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da mesma Fundação, processo 075/16.

3.2 Descrição do caso clínico

Paciente atendida no AC Camargo Cancer Center que aceitou participar do estudo, do sexo feminino, 64 anos, diagnosticada com carcinoma de células renais de células claras localizado no rim esquerdo. Após nefrectomia radical, a amostra tumoral foi analisada e verificou-se estágio avançado ISUP 4, estadiamento patológico pT3a. As medidas da neoplasia eram de 9.5 x 9.0 x 9.0 cm e a análise histopatológica determinou características importantes como presença de componente sarcomatoide e rabdoide (mais de 50%) – que conferem alta indiferenciação celular e estão associados a tumores mais agressivos, presença de extensa área necrótica, infiltração de cápsula renal, gordura perirrenal, seio, artéria e veias renais, com formação de trombos na veia cava. A partir deste caso, obtivemos o fragmento tumoral proveniente de carcinoma renal com invasão do sistema venoso por trombos tumorais.

3.3 Modelo PDX

Foram implantados ortotopicamente 5 fragmentos por rim em camundongos NSG machos (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA), dando origem ao modelo estabelecido PDX do caso clínico de carcinoma renais de células claras com formação de trombos. Os fragmentos biológicos provenientes diretamente dos trombos também foram implantados em camundongos para os diversos estudos.

Os animais foram produzidos e fornecidos pelo biotério do AC Camargo Cancer Center localizado no Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE).

Durante os experimentos, os animais foram monitorados para a observação do crescimento tumoral e quando apresentaram tumores com tamanho aproximado de 1 cm³ foram eutanasiados por aprofundamento anestésico e os fragmentos tumorais transplantados para novos camundongos. Para garantir a variabilidade dos tumores, os fragmentos de diferentes animais eram misturados de acordo com o experimento a ser realizado. Foram agrupados fragmentos de mais de um animal com trombo a fim de propagar o número de animais que apresentassem crescimento tumoral e trombos. Animais que apresentavam tumores renais, mas não apresentavam trombos foram agrupados para que se mantivesse o cenário fenotípico.

3.4 Implante ortotópico em camundongos

Os animais foram inicialmente pesados e anestesiados através de injeção peritoneal de Cetamina (Ketamin-S, Crisália) e Xilasina (Ronpun, Bayer) na concentração de 10 µl/g/peso. Posteriormente, realizou-se tricotomia da região lombar esquerda e assepsia local com digluconato de clorexidina (RIOHEX) em concentração de 0.2%.

Foi realizada lombotomia longitudinal esquerda de aproximadamente 1 cm de comprimento e um campo cirúrgico estéril foi posicionado sobre a incisão. Com auxílio de pinças específicas do tipo relojoeiro e de dissecação as vísceras foram afastadas e o rim foi isolado e externalizado. Foi realizada incisão transversal na cápsula renal de aproximadamente 2 mm com auxílio de bisturi. Durante o procedimento o rim foi umedecido com PBS estéril para evitar ressecamento da cápsula renal.

Em seguida a cápsula renal foi separada do córtex renal com o auxílio de uma pinça de relojoeiro curva e sem ponta para evitar abrasão e eventuais danos ao córtex renal. Posteriormente, os fragmentos tumorais foram posicionados separadamente na região subcapsular renal (2 a 4 fragmentos por animal).

O rim então foi devolvido à cavidade abdominal, e foi realizado o fechamento da parede abdominal em dois planos: o primeiro com a sutura da camada muscular, e o segundo com a sutura da pele. Para ambas as suturas foi utilizado fio Nylon 4.0 (Microsuture®, São Paulo, Brasil) através da confecção de pontos separados de sutura simples equidistantes entre si.

Por fim, foi realizada novamente uma assepsia local, e os animais passaram a ser acompanhados periodicamente para análise de achados clínicos e/ou evidência de crescimento tumoral.

A Figura 5 mostra o esquema experimental do modelo de implante de fragmento tumoral nos camundongos e posterior processamento do tumor para isolamento das células tumorais.

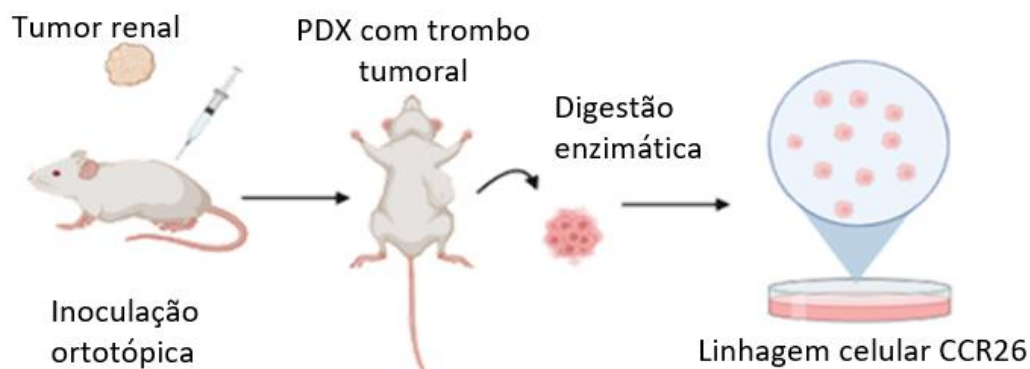


Figura 5. Delineamento experimental identificando a sequência dos eventos em que o fragmento de tumor renal obtido de paciente é inoculado no rim de camundongo imunodeficiente e, após o crescimento do tumor no animal é feita a digestão enzimática do tumor e as células tumorais componentes deste fragmento são isoladas em cultura. As células crescidas a partir destes fragmentos foram repicadas por várias passagens até que atingissem uma linhagem caracterizada como imortalizada. Fonte: Autoria própria.

3.5 Reações de Imunohistoquímica

Para as reações de imunohistoquímica os tecidos tumorais foram avaliados para a expressão de PAX8 – Paired Box Gene 8 (#Cat. 363M-14-RUO Cell Marque, diluição 1:100), que marca tecido renal; Citoqueratina-7 (CK7) (#Cat. 307M-94 Cell Marque, diluição 1:50) – geralmente negativa no CCR de células claras - e Anidrase Carbônica IX (CA IX) (#Cat. 379R-14 Cell Marque, diluição 1:20), cuja marcação é positiva para ccCCR (9). As reações foram realizadas no *Core Facility* de Histologia-IHQ-TMA do AC Camargo Cancer Center e as análises de expressão foram analisadas com o uso do software Scanscope (Aperio).

3.6 Cultura primária e estabelecimento da linhagem CCR26

Para o processamento dos fragmentos tumorais dos PDX e/ou diretamente de paciente, primeiramente o fragmento foi lavado com 5 a 10 ml de Hank's Balanced Salt Solution 1 X (HBSS) (# Cat 14175-095, Gibco, Nova York, EUA) gelado, posteriormente foram desmembrados em pequenos pedaços com auxílio de tesoura e pinça autoclavados e bisturi descartável em placa de Petri 100 mm (# Cat 664160, Greiner Bio-One, Kremsmunster, Áustria) com 5 ml de Colagenase IV (# Cat 17104-019, Gibco, Nova York, EUA) em concentração de 270 U/mg. Os fragmentos foram coletados em tubo falcon de 15 ml e incubados a 37°C por 2h em termoshaker (Eppendorf Thermomixer Confort) com agitação de 600 rpm para a digestão enzimática. Após esse período, espera-se que o conteúdo esteja turvo, indicando dissociação das células, e então o tubo foi centrifugado em centrífuga Rotofix 32 (Andreas Hettich, Tuttlingen, Alemanha) por 10 min a 1500 rpm e descartado o sobrenadante.

Ao final desse tempo, o pellet formado foi ressuspensionado em solução de lise de hemácias ACK e deixado por 10 min, vertendo o tubo a cada 2 min e centrifugado por 1500 rpm, 5 min. Após a lise das hemácias, o pellet foi ressuspensionado em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (DMEM High) (# Cat 12800-058, Gibco, Nova York, EUA) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (# Cat 12676-029, Gibco, Nova York, EUA) e filtrado em Cell Strainer com poros de 40 µm (# Cat 352340, Corning, Nova York, EUA). A solução final foi centrifugada, ressuspensionada em meio DMEM High 20% SFB e plaqueada em garrafa de 25 cm² (# Cat 3055,

Corning, Nova York, EUA) ou placas de Petri. O meio com 20% de soro foi mantido nas primeiras passagens e após verificar viabilidade e crescimento celular, manteve-se as células em meio com 10% SFB. As células foram imortalizadas por 70 passagens consecutivas, gerando a linhagem celular denominada CCR26.

3.7 Cultura de células CCR26, Caki e ACHN

Foram utilizadas as linhagens celulares CCR26 (obtida conforme descrito em 3.6), Caki-1 (ATCC® HTB-46™), célula proveniente de carcinoma de células claras derivada de metástase de pele humana e ACHN, célula isolada de adenocarcinoma renal humano adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). As células foram cultivadas em meio DMEM High com 0,11 g/L de Piruvato de sódio (# Cat P2256, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha), 0,1% do antibiótico Gentamicina (Novafarma, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de SFB e tamponado com 3,7 g/L de Bicarbonato de sódio (# Cat S5761, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha). As células foram mantidas em estufa a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ em placas ou garrafas apropriadas e o meio de cultura renovado sempre quando havia consumo identificado pela coloração do mesmo e/ou número de células na garrafa, normalmente a cada 2 dias.

Para a realização das passagens, foi utilizado Phosphate-buffered saline 1 X (PBS) para lavar as células 2x, garantindo toda a remoção de SFB (PBS 1X = NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, e H₂O MilliQ) e tripsina 0,2% por 5 minutos para desprender as células das garrafas de cultura. Em seguida, foi adicionado meio DMEM high 10% SFB para inativar a ação da tripsina, as garrafas foram lavadas com PBS para a coleta de todas as células que então foram centrifugadas por 3 minutos a 1500 rpm e ressuspensas para manutenção da cultura. Posteriormente, as células eram manipuladas de acordo com o experimento a ser realizado ou eram congeladas para manter estoque.

O congelamento celular foi feito em criotubos com 50% SFB, 40% meio DMEM High e 10% DMSO (# Cat D5879, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) em volume final de 1 ml estocados em nitrogênio líquido.

3.8 Curva de Proliferação Celular

Para avaliar o crescimento da linhagem celular estabelecida CCR26, foi feito ensaio de proliferação utilizando as células Caki-1 para comparação. As células em cultura foram privadas de SFB por 24 horas para sincronização na fase G0 do ciclo celular. Em seguida, foram plaqueadas 25.000 células em placas de 6 poços (# Cat 3516, Corning, Nova York, EUA) em duplicata em meio DMEM high 10% SFB (que foi trocado a cada 3 dias) e após 48 horas seguiram-se as contagens com intervalo de 48 horas entre elas durante 10 dias. Para as contagens, as células foram lavadas com 1 ml de PBS, tripsinizadas com 500 µl de tripsina e deixadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 5 minutos. Foram adicionados 500 µl de meio DMEM high 10% SFB e as células foram contadas a partir da exclusão das células mortas coradas com solução de Trypan blue (# Cat T8154, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) em câmara de Neubauer.

3.9 Crescimento em Suspensão

As células CCR26 foram cultivadas em suspensão para verificar sua viabilidade nessa condição de crescimento. Foi preparada solução de agarose 1% (# Cat 15510-027, Invitrogen, Carlsbad, EUA) em meio DMEM High com 10% SFB. Foram adicionados 200 µl da solução por poço em placa de 6 poços para formar uma fina camada e, após solidificar, foram adicionados 4 ml de meio DMEM High 10% SFB com 3×10^4 células. A cada 3 dias as células foram coletadas, coradas com Trypan blue e contadas em câmara de Neubauer a cada 3 dias durante 9 dias.

3.10 Geração de organoides da célula CCR26

Para este experimento, foram utilizados dois tipos de Matrigel[®]: Standard (# Cat 356255, Corning) e Growth Factor Reduced (# Cat 354230, Corning), mantidas congeladas a -80°C, e previamente descongelados a 4°C por 12 horas. Em placa de 96 poços foram colocados 15 µl de Matrigel[®] por poço de forma a cobrir toda a superfície do poço. Em seguida, a placa foi incubada a 37°C por 15 a 30 min até a completa solidificação da Matrigel[®]. Em um tubo, foi separada a quantidade necessária de Matrigel[®] para a suspensão das células e plaqueamento. Para isso, foram adicionados 20

ng/ml de fator de crescimento de fibroblastos (FGF) em 120 μ l de Matrigel[®] (cada poço). As células CCR26 em 75% de confluência foram tripsinizadas e separadas $1,0 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$ células por poço, centrifugadas e ressuspensas em 75 μ l de Matrigel[®]. Durante todo o processo, o Matrigel[®] foi mantido em gelo para evitar sua solidificação. A placa foi incubada a 37°C por 30 min e em seguida foram adicionados 120 μ l de meio DMEM F12 10% SFB. O meio foi trocado a cada 2 dias.

3.11 Migração das células tumorais CCR26 e Caki-1

Células CCR26 e Caki-1 em cultura foram lavadas 2x com PBS e foi adicionado meio DMEM high sem soro por 24 horas. Para o experimento foram utilizadas placas do tipo Transwell (# Cat 3422, Corning, Nova York, EUA) de 6.5 mm de diâmetro e poros de 8 μ m. Para rehidratar a membrana dos insertos, foram adicionados 100 μ l de meio DMEM High antes do plaqueamento das células. Então, as células foram desagregadas com tripsina e 2×10^5 foram plaqueadas em cada poço em duplicata com 200 μ l de DMEM High sem SFB. Nos poços da placa foram adicionados 400 μ l de meio sem e com 10% de SFB como quimioatrativo. As células foram deixadas por 18 horas em estufa úmida para migrarem e, após esse período, retirou-se o meio dos poços e da parte de cima dos insertos com auxílio de micropipeta.

As células que migraram para a face inferior da membrana foram fixadas com 400 μ l de paraformaldeído (PFA) (# Cat 6148, Sigma Aldrich, Missouri, EUA) 4% sem metanol por 20 min e lavadas 3x com 400 μ l de PBS. Após a fixação, as células que não migraram e ficaram na parte superior do inserto foram removidas com auxílio de uma haste de algodão. Para visualização e contagem em microscópio de fluorescência, as células foram coradas com 300 μ l de DAPI (4',6-diamino-2-fenil-indol) (# Cat D9542, Sigma Aldrich, Missouri, EUA) 1:1000 em solução de PBS 1X + 0,3% de Triton-X (# Cat 9410, EMD Millipore, Massachusetts, EUA) por 30 min e lavadas 3x com PBS. Quatro fotos documentaram campos aleatórios das células que migraram através dos poros utilizando o microscópio Nikon Eclipse TE2000-U (Nikon, Japão). Foi usado o laser em excitação de 358 nm e emissão de 461 nm para visualização da coloração com DAPI na objetiva de 20x. A quantificação das células foi feita através do software ImageJ.

3.12 Imunofluorescência para NETs em tecido tumoral

Foram realizados ensaios de imunofluorescência em lâminas parafinadas com tecido tumoral de camundongos com tumor renal com ou sem trombo, utilizando anticorpos conhecidos como marcadores de NETs. Para isso, as lâminas foram desparafinadas: estufa a 60°C, 1h30 min, 3 banhos de xilol por 10 min cada, 4 séries de álcool absoluto 1 min cada, 5 lavagens com água milliq por 1 min e 2 lavagens com PBS 1X por 5 min cada. Em seguida, foi realizada a recuperação antigênica aplicando Trizma-EDTA pH9 incubado a 60°C por 30 min e lavagem 3 x com PBS. A seguir, foi feito bloqueio de reações inespecíficas com Protin Block 1 h e incubação com anticorpos primários anti-MPO (mouse) e anti-Histona H3 (rabbit), ambos 1:100 diluídos em Tris HCL 50 mM pH 7.5 + 1% BSA overnight a 4°C. Após este período, os anticorpos primários foram retirados e a seguir procedeu-se a incubação com anticorpos secundários anti-IgG mouse e anti-IgG rabbit por 1 h. As lâminas foram lavadas 3 x com PBS e visualizadas em microscópio de fluorescência confocal LSM 780 (Carl Zeiss).

3.13 Ensaio Imunoenzimático ELISA para dosagem de citocinas

A concentração da citocina IL-8 humana foi determinada a partir do plasma de camundongos implantados com PDX de tumor renal com ou sem formação de trombo usando-se um kit de ELISA segundo as recomendações do fabricante (R&D Systems Corporation, Minneapolis, MN). Resumidamente, placa de 96 poços foi sensibilizada com anticorpo anti-IL8 diluído em PBS e incubada por 18 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi bloqueada com BSA 4% diluído em PBS por 1h e lavada 3 x com PBS + 0,05% Tween 20 e então adicionadas as amostras de soro e as diluições seriadas da curva padrão. A placa foi incubada por 1 h e adicionado anticorpo conjugado à biotina e deixado por mais 1 h. Após 3 lavagens com PBS, foi adicionada estreptoavidina peroxidase (componente do kit) e incubada por 20 min, temperatura ambiente, lavada novamente e adicionado o substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1M e a leitura foi realizada em leitor de microplacas a 450 nm.

3.14 Isolamento de neutrófilos humanos do sangue periférico

O sangue foi coletado de doadores saudáveis que aceitaram participar do estudo e que assinaram um TCLE. O sangue foi coletado por punção venosa em tubos Vacutainer K2EDTA (Becton Dickinson, 360057), centrifugados a 450xg por 5 min e o plasma descartado. Em seguida, foi montado o gradiente de Percoll (Cytiva, cat 17-0891-02, 1.130g/ml) nas concentrações de 72, 63, 54 e 45%, 2 ml de cada, previamente preparados com PBS. O sangue foi adicionado (3 ml) acima da última fase de percoll e centrifugado por 650xg, 30 min a 25°C em aceleração e desaceleração = 1. Foi coletada a porção do gradiente contendo granulócitos, lavada com PBS e centrifugada 1500 rpm, 5 min. Então, realizou-se a lise dos eritrócitos pela adição de tampão ACK por 10 min, mexendo o tubo a cada 2 min. Ao final desta etapa, o tubo foi centrifugado para remoção do ACK e realizada mais uma lavagem com PBS. Por fim, adicionou-se meio DMEM high 0,5% BSA aos neutrófilos para contagem em câmara de Neubauer e verificação da viabilidade por coloração com azul de Trypan.

3.15 Preparo de meio de cultura com soro fetal bovino depletado de VEs

O meio de cultura com SFB depletado de VEs foi utilizado nos experimentos para que as VEs do soro não interferissem nos resultados. Para isso, foi preparada uma solução com 100 ml de meio DMEM High e 100 ml de soro fetal bovino. Foram colocados 30 ml em cada tubo da ultracentrífuga e os pesos foram igualados com PBS filtrado 3x. Após o balanceamento, o meio foi ultracentrifugado 4°C, 100.000xg por 18h coletado o sobrenadante. O meio foi filtrado no fluxo laminar, aliquotado e armazenado a -20°C até a sua utilização. Para os experimentos, este meio era descongelado e diluído com meio DMEM High puro quando era necessário o preparo de meio 10% SFB.

3.16 Isolamento de vesículas extracelulares das linhagens celulares por ultracentrifugação e análise por NTA

As linhagens celulares CCR26, Caki-1 e ACHN foram plaqueadas em garrafas de 25 ml T180 em meio DMEM High 10% SFB. Após aderirem, as células foram

lavadas 2x com PBS e o meio foi trocado para DMEM High com 10% SFB depletado de VEs e as células foram mantidas em cultura até atingirem 80% de confluência. O meio condicionado de cada linhagem celular foi coletado em tubos de 50 ml, mantidos em gelo e as células foram contadas. Em seguida, os meios foram centrifugados em 3 condições consecutivas a 4°C: 300xg – 10 min; 2000xg – 10 min e, por fim, 10.000xg – 30 min. A cada centrifugação o sobrenadante foi transferido para um novo tubo para eliminar células e *debris*. Para a obtenção das VEs o sobrenadante da última centrifugação foi submetido a uma ultracentrifugação por 2h, 4°C a 100.000xg, em centrífuga Beckman-Coulter com rotor SW28. Após a primeira rodada, os meios foram separados, e o pellet foi lavado com PBS estéril e centrifugado novamente a 100.000xg. Após a segunda rodada, o PBS foi desprezado e o pellet contendo as VEs purificadas foi ressuspendido novamente em PBS. As VEs foram armazenadas em -80°C até a utilização para experimentos. As frações dos meios das células – total (após as centrifugações iniciais e antes da ultracentrifugação) e condicionado (após a primeira rodada de ultracentrifugação) foram armazenadas a -20°C até a utilização nos experimentos.

Para avaliar a concentração e tamanho das VEs foi utilizado o Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) em equipamento Nanosight LM10 (# Cat LM14C, Nanosight Ltda, Wiltshire, Inglaterra). Este equipamento conta com uma câmera acoplada e emite um laser em raio de 60 mW de comprimento de onda de 405 nm. As amostras foram inseridas manualmente no *plate* com auxílio de seringa de 1 ml, utilizando 5 vídeos de 30 segundos de diferentes campos da amostra. Entre cada amostra, o *plate* foi lavado com água milliQ e confirmada ausência de partículas antes da próxima aquisição. Para a análise, foi utilizado um mínimo de 2000 tracks válidos e 20 a 100 partículas por *frame*.

3.17 Migração de neutrófilos *in vitro* através de câmara *transwell*

Para avaliar a capacidade dos fatores solúveis dos meios condicionados de células de tumor renal de estimular a migração de neutrófilos, foi feito ensaio de migração utilizando câmara *transwell* (#Cat 3422, Corning, Nova York, EUA) com 6.5 mm de diâmetro e poros de 8 µm. Primeiramente, as células CCR26, Caki-1 e ACHN foram plaqueadas em garrafa T25 de modo que após 72h estivessem em densidades aproximadas de 1×10^6 células. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram

lavadas 2x com PBS e o meio foi trocado para meio DMEM High 1% SFB depletado de VEs. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C por 72h e após esse período o meio de cada célula foi coletado, centrifugado a 1500 rpm por 5 min e filtrado em filtro de seringa 0,22 µm. Este meio de cultura foi chamado de meio condicionado total (MC total), pois não foi submetido a nenhum processo de separação de VEs. Os meios foram aliquotados e armazenados a -20°C até a realização dos experimentos.

Para o ensaio com câmara *transwell*, 4×10^4 neutrófilos foram colocados na porção superior da câmara em 100 µl de meio DMEM High sem soro. Na porção inferior foram adicionados 600 µl dos meios condicionados das células CCR26, Caki, ACHN e como controle meio DMEM High 1% SFB. Foi realizada incubação por 2 e 4 horas para que os neutrófilos migrassem para a parte inferior dos insertos. Após cada tempo, as células que não migraram foram removidas da parte superior cuidadosamente e o meio da parte inferior foi coletado, as células foram contadas em câmara de Neubauer. As células no compartimento inferior do *transwell* foram fixadas com 400 µl de paraformaldeído 4% por 20 min, lavadas 3 x com 400 µl de PBS e coradas com DAPI 0,1 µg/ml em 400 µl de PBS + 0,3% Triton X-100.

3.18 Padronização da visualização de NETs por Imunofluorescência

Para verificar a formação de NETs por imunofluorescência foi realizada padronização por meio da estimulação de neutrófilos com éster de forbol (PMA), composto conhecido por ativar a netose. Para isso, neutrófilos foram isolados como descrito na seção X e plaqueados em lamínulas para o ensaio de imunofluorescência. Após 15 min para adesão dos neutrófilos, foi adicionado meio DMEM High com PMA diluído nas concentrações de 25, 50, 100 e 200 nM e incubado por 1 e 4 horas. Em seguida, procedeu-se à marcação do anticorpo anti-elastase de neutrófilos 1:200 (marca) overnight a 4°C e, após esse período as lamínulas foram lavadas com PBS e marcadas com draq 1:700 + anticorpo secundário alexa flúor 546. As lamínulas foram colocadas em lâminas de histologia com meio de montagem e deixadas secando até a visualização.

3.19 Imunofluorescência de neutrófilos – NETs *in vitro*

Para verificar se as células CCR26 são capazes de ativar os neutrófilos e induzir a formação de NETs *in vitro*, foi realizado ensaio de imunofluorescência de neutrófilos. O meio de cultura das células CCR26 e Caki-1 foi condicionado de modo que as células pudessem liberar fatores solúveis que pudessem participar do processo. As células foram mantidas em cultura por 72 horas, de modo que ao final desse período estivessem em confluência de 80% em garrafa de cultura de T25. Para isso, eram plaqueadas 4×10^5 células CCR26 e 2×10^5 células Caki-1. O meio foi coletado, filtrado em 22 um para remoção de qualquer remanescente celular e deixado em contato com neutrófilos previamente isolados e plaqueados em placas de 4 poços sob lamínulas.

Para adesão dos neutrófilos, as lamínulas foram preparadas da seguinte forma: lavagem com HCL 1M durante 1 h sob leve agitação, enxágue com água milliQ autoclavada 5 a 10 vezes, incubação 30 min com poli-L-lisina em temperatura ambiente, lavagens novamente e deixadas secar overnight dentro do fluxo laminar.

No momento do protocolo de imunofluorescência, após adesão dos neutrófilos, foram fixados com 200 ul de PFA 4% 20 min em temperatura ambiente, 2 lavagens com 300 ul de PBS por 10 min cada, incubados com 300 ul de PBS + 0,5% Triton X por 1 h, retirado e colocado 300 ul de PBS + 5% BSA também 1 h e em seguida procedeu-se com a incubação com os anticorpos: anti-MPO (2C7) (Abcam, ab25989) 1:200 em PBS + 1% BSA deixado a 4°C overnight em câmara úmida e após 3 lavagens com PBS de 5 min cada foi colocado anticorpo secundário anti-mouse AF488 (Invitrogen, A21202) 1:1000 + drq 1:700 em PBS + 1% BSA por 1 h no escuro. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas e coladas em lâminas com meio de montagem para visualização no microscópio confocal.

3.20 Análise da relação linfócito/neutrófilo do sangue dos pacientes

Para verificar os níveis de neutrófilos e linfócitos na circulação sanguínea dos pacientes diagnosticados com câncer renal do AC Camargo Cancer Center, foram levantados retrospectivamente os hemogramas de 14 pacientes que não evoluíram com

formação de trombo renal e 7 com o câncer e trombo tumoral, todos antes de serem submetidos à intervenção cirúrgica.

3.21 Análise estatística

A diferença da capacidade migratória das células CCR26 e Caki-1 avaliada pelo ensaio de migração em Transwell foi analisada pelo teste T não pareado através do software GraphPad Prism 8.2.1. Valores de $P < 0.05$ são considerados significativos e a representação é dada da seguinte maneira: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Estabelecimento e caracterização do modelo PDX

Estudo conduzido pelo nosso grupo com a participação direta do aluno de doutorado Adriano Beserra gerou uma série de PDXs de pacientes com CCR (100). Durante o estudo, um fragmento tumoral extraído do paciente com CCRcc associado a trombos em veia cava foi inoculado ortotopicamente em camundongos NSG. Estes animais apresentaram um rápido crescimento do tumor com cerca de 30 dias após o implante. Após a eutanásia, foi observada infiltração da veia renal e veia cava inferior, fenótipo semelhante ao observado no paciente doador da amostra. Essa característica foi mantida em passagens subsequentes dos tumores para outros camundongos NSG tornando-se o primeiro modelo, do nosso conhecimento, para o estudo deste evento (ref adriano). A imunohistoquímica do fragmento tumoral do paciente e do PDX revelou a fidelidade do modelo, apresentando positividade para anidrase carbônica IX (CAIX) e PAX8 e negatividade para CK7 (Figura 6).

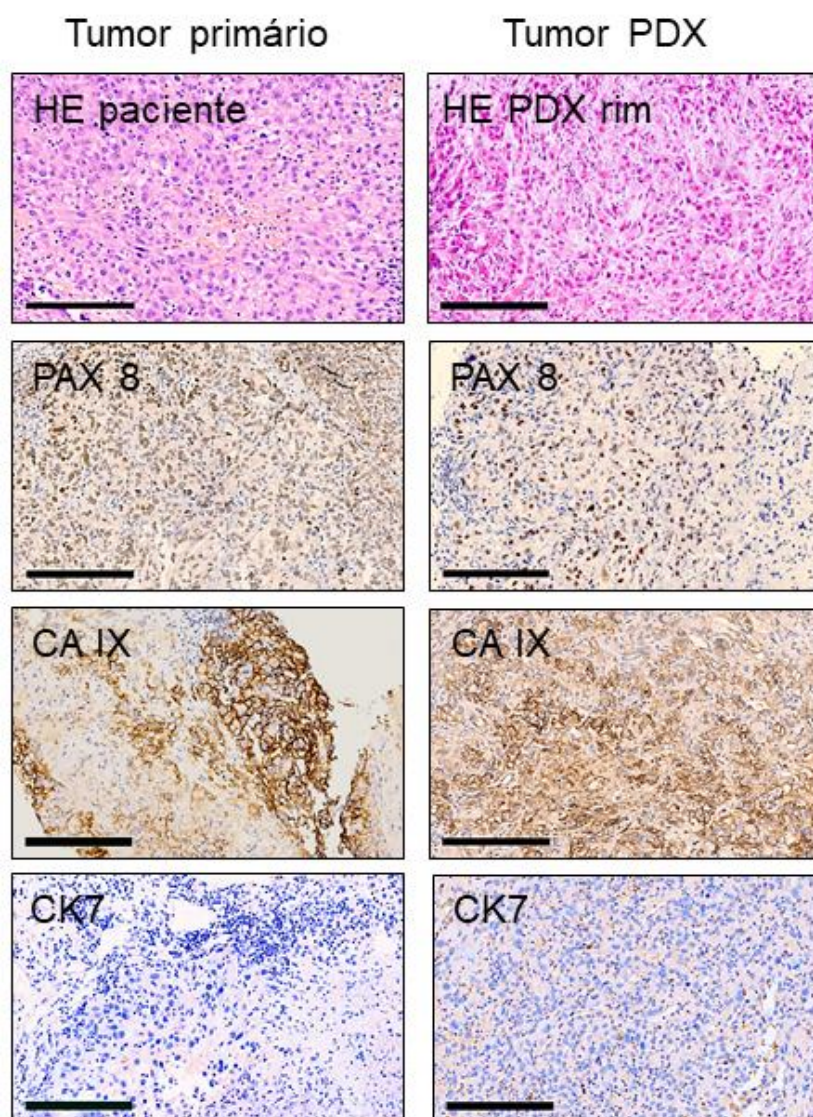


Figura 6. Avaliação por imunohistoquímica de marcadores de CCR do tumor primário do paciente doador e do tumor derivado do xenoinxerto proveniente da implantação do caso. Foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina e imuno-histoquímica e as amostras apresentaram positividade para PAX 8 e CA IX e não houve marcação com CK7, confirmando que ambas são do mesmo subtipo de CCR. Barra de calibração: 100 μ m. Fonte: Beserra, A.O. (2022).

4.2 Caracterização da linhagem celular imortalizada CCR26

A partir de um fragmento do primeiro PDX desse caso (P0), as células foram dissociadas e cultivadas por múltiplas passagens (além de 50) sendo, portanto, consideradas imortalizadas (Figura 7). A essa linhagem celular foi dado o nome de CCR26 e sua geração foi coordenada pela Dra. Ethiene Castellucci Estevam, pós-

doutoranda na ocasião. Cabe ressaltar que foram realizadas outras tentativas de cultivo primário de tumores de outros pacientes que tiveram ou não trombos tumorais em veia cava, porém sem sucesso. Nesses outros casos as células não se adaptaram bem ao crescimento em monocamada e morreram em até quatro passagens. Outra dificuldade enfrentada foi o crescimento de fibroblastos a partir do tecido tumoral que superavam o crescimento das células tumorais inviabilizando o cultivo. Desta forma, apenas a linhagem CCR26 foi utilizada neste estudo, e outras linhagens comerciais de carcinomas renais que foram utilizadas como controle experimental pelo fato de não formarem trombos.

As células CCR26 foram caracterizadas por imunofluorescência com os marcadores CAIX e CK7. A marcação positiva de CAIX é transmembrana e difusamente positiva em CCRcc e negativa para CK7 confirmando a origem das células CCR26 a partir do tumor de CCRcc (Figura 7).

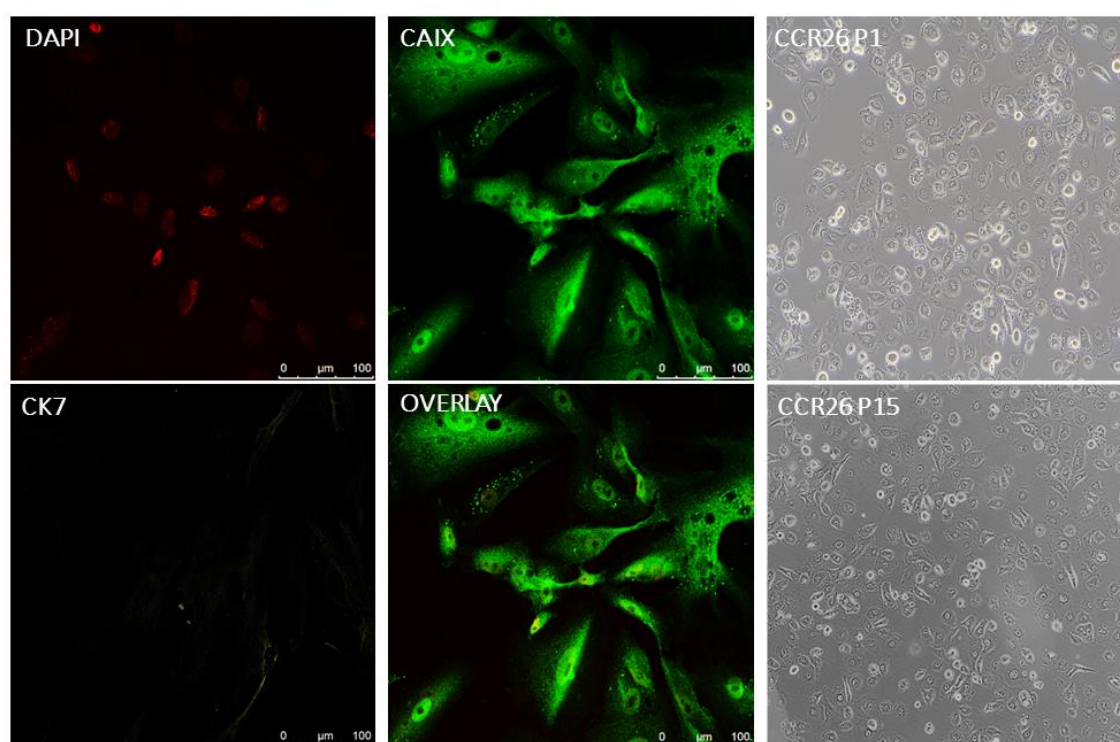


Figura 7. Linhagem celular CCR26 estabelecida a partir do PDX gerado pela inoculação do fragmento do tumor primário de paciente com CCR e trombo tumoral no rim de um camundongo NSG. A imunofluorescência mostra em vermelho corante Dapi marcando o núcleo das células, em verde a marcação para CAIX e a ausência de marcação para CK7. As fotomicrografias mostram que mesmo após o subcultivo e aumento das passagens de P1 para

P15 as células mantêm sua morfologia epitelial típica deste tipo tumoral e crescimento contínuo. Aumento de 40X. Fonte: Autoria própria.

O estabelecimento do modelo de PDX e a obtenção de cultura celular que mimetiza o fenótipo tumoral, oferece uma oportunidade única de estudar os mecanismos que governam a formação de trombos em veia cava nos CCR.

4.3 Avaliação da tumorigenicidade da linhagem celular CCR26

As células CCR26 foram testadas quanto a sua capacidade de gerar tumores em camundongos NSG. Para isso, $2,5 \times 10^6$ células, ressuspensas em 50 μ l de PBS e 10 μ l da suspensão foram inoculados na cápsula renal de 5 animais. Os resultados mostraram crescimento tumoral em todos os animais, indicando que a célula CCR26 possui capacidade de gerar tumores in vivo.

4.4 A linhagem CCR26 possui alta capacidade de proliferação

A proliferação das células CCR26 foi comparada com a linhagem comercialmente disponível Caki-1, originada de carcinomas renais de células claras para melhor compreensão do comportamento biológico das células CCR26. Durante a avaliação das curvas de crescimento das linhagens celulares e, verificou-se que ambas apresentaram padrão de crescimento semelhante durante 8 dias. Entretanto as células CCR26 continuam crescendo após o 8º dia, enquanto a Caki-1 atinge um platô, indicando que a CCR26 não apresenta inibição de crescimento por contato. Interessantemente, quando toda a área de crescimento é tomada as células soltam-se da placa e proliferam em suspensão (Figura 8 A)

Após observada a capacidade de proliferação sem inibição por contato das células CCR26, foi realizado experimento para verificar se elas são capazes de crescer em suspensão. As células foram cultivadas sobre uma camada de agarose, a fim de impedir sua aderência, e cultivadas na presença em meio de cultura. Após nove dias de cultura em suspensão as células permaneceram viáveis crescendo sobre a agarose

(Figura 8 B). Após esse período de cultura em suspensão, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura e aderiram e cresceram normalmente (Figura 8 C).

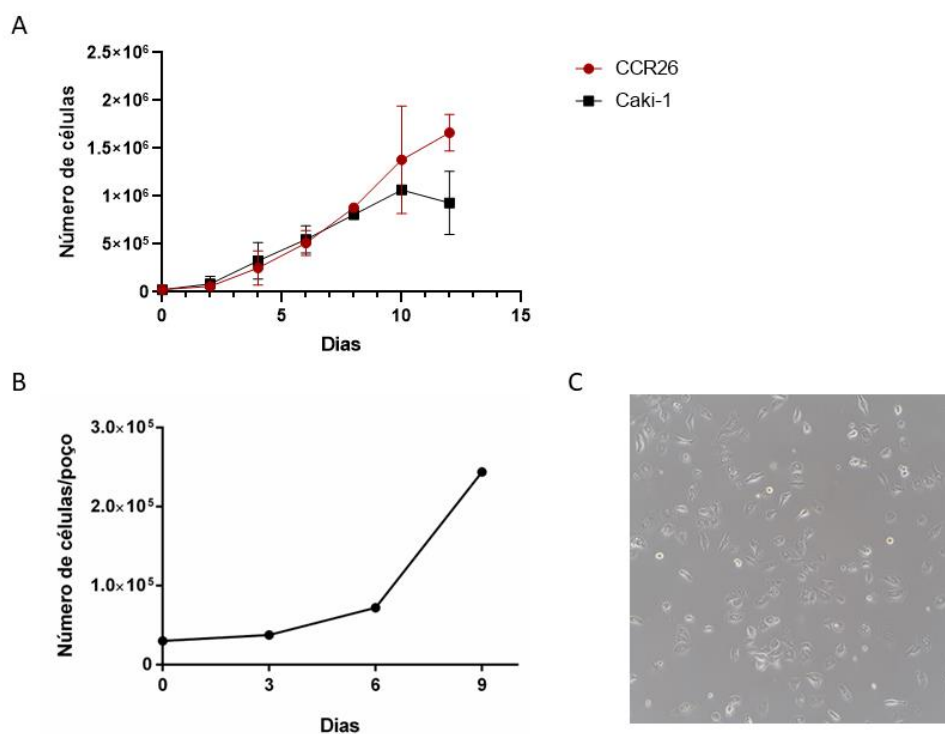


Figura 8. Demonstração da capacidade proliferativa da célula CCR26. A) Células das linhagens CCR26 e Caki-1 foram plaqueadas ($2,5 \times 10^4$ /poço) em placas de 6 poços e contadas a cada 2 dias em duplicata durante 10 dias. As células possuem crescimento semelhante até o 8º dia, quando a CCR26 continua a crescer e a Caki-1 cessa a proliferação. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. B) Gráfico do crescimento em suspensão da célula CCR26. Foram adicionadas 30.000 células em placas de 6 poços sobre gel de agarose 1% e contadas a cada 3 dias. O resultado representa um experimento. C) Foto da célula CCR26 aderida em monocamada após 7 dias de crescimento em suspensão. Aumento de 40x. Fonte: Autoria própria.

Estes resultados indicam que a célula CCR26 apresenta alta adaptabilidade às condições para seu crescimento em cultura. Quando em baixa concentração, as células crescem em monocamada e, à medida que a concentração de células aumenta, parte da população se descola da placa e passa a proliferar em suspensão, gerando uma cultura semi-aderente.

4.5 As células CCR26 possuem capacidade de crescimento em 3D

Através do experimento de geração de esferoides com as células CCR26 foi possível observar após 8 dias a presença de esferoides com os dois tipos de Matrigel® testados (Standard e com fator de crescimento reduzido) assim como com a adição ou não de FGF no meio de cultura (Figura 9). As imagens mostram esferoides semelhantes em morfologia e tamanho, não havendo diferença significativa entre as condições abordadas.

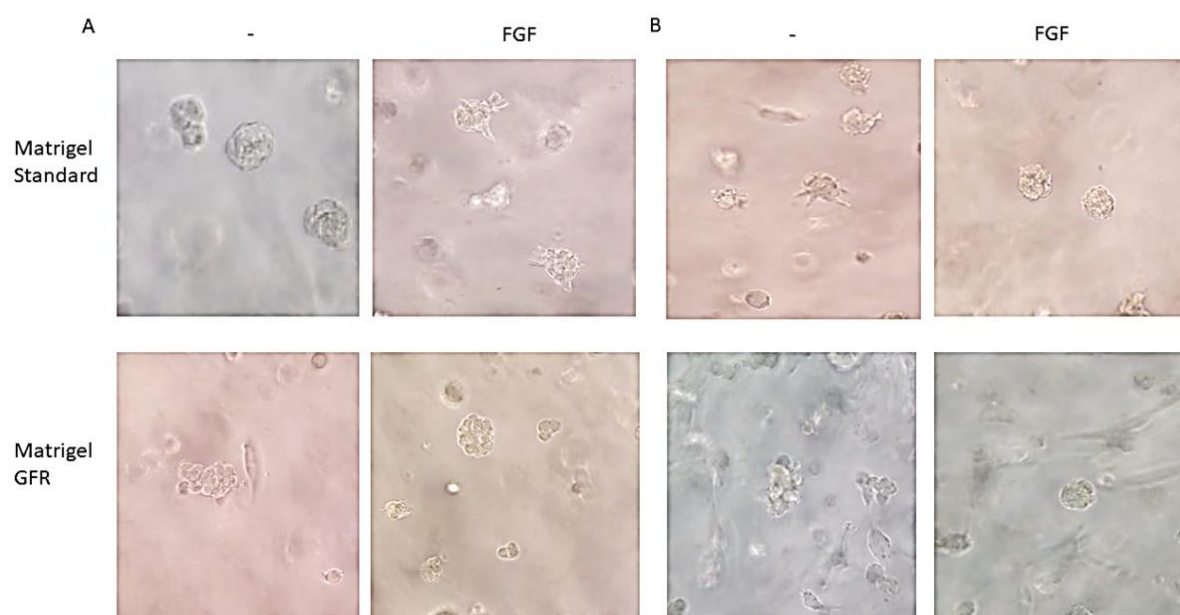


Figura 9. As células CCR26 possuem capacidade de formação de esferoides em cultura. A) 1×10^4 células e B) $2,5 \times 10^4$ células foram plaqueadas em camada de Matrigel® Standard e GFR e ressuspensas em meio sem e com FGF. Imagens (aumento de 20x) representam células após 8 dias do plaqueamento. Fonte: Autoria própria.

4.6 Avaliação da capacidade de migração da CCR26

A próxima etapa foi investigar se a capacidade de invasão vascular (que culmina nos trombos tumorais *in vivo*) também pode ser observada na célula CCR26. Para determinar esta capacidade, foram utilizados ensaios em placas *transwell*. Os resultados mostram que a capacidade migratória da CCR26 *in vitro* é menor quando comparada com a célula Caki-1, conforme mostra a Figura 10.

As duas linhagens apresentam sensibilidade ao SFB como quimioatrativo e migram mais nessa condição quando comparadas à condição sem SFB. As células Caki-1 apresentam migração de $32,0 \pm 2,4$ células/ poço na presença de 10% de SFB, enquanto as CCR26 migram o equivalente a $4,1 \pm 0,4$ células/poço. Portanto, as células CCR26 apresentam uma capacidade migratória significativamente menor que as CAKI (Figura 10; $p=0,001$).

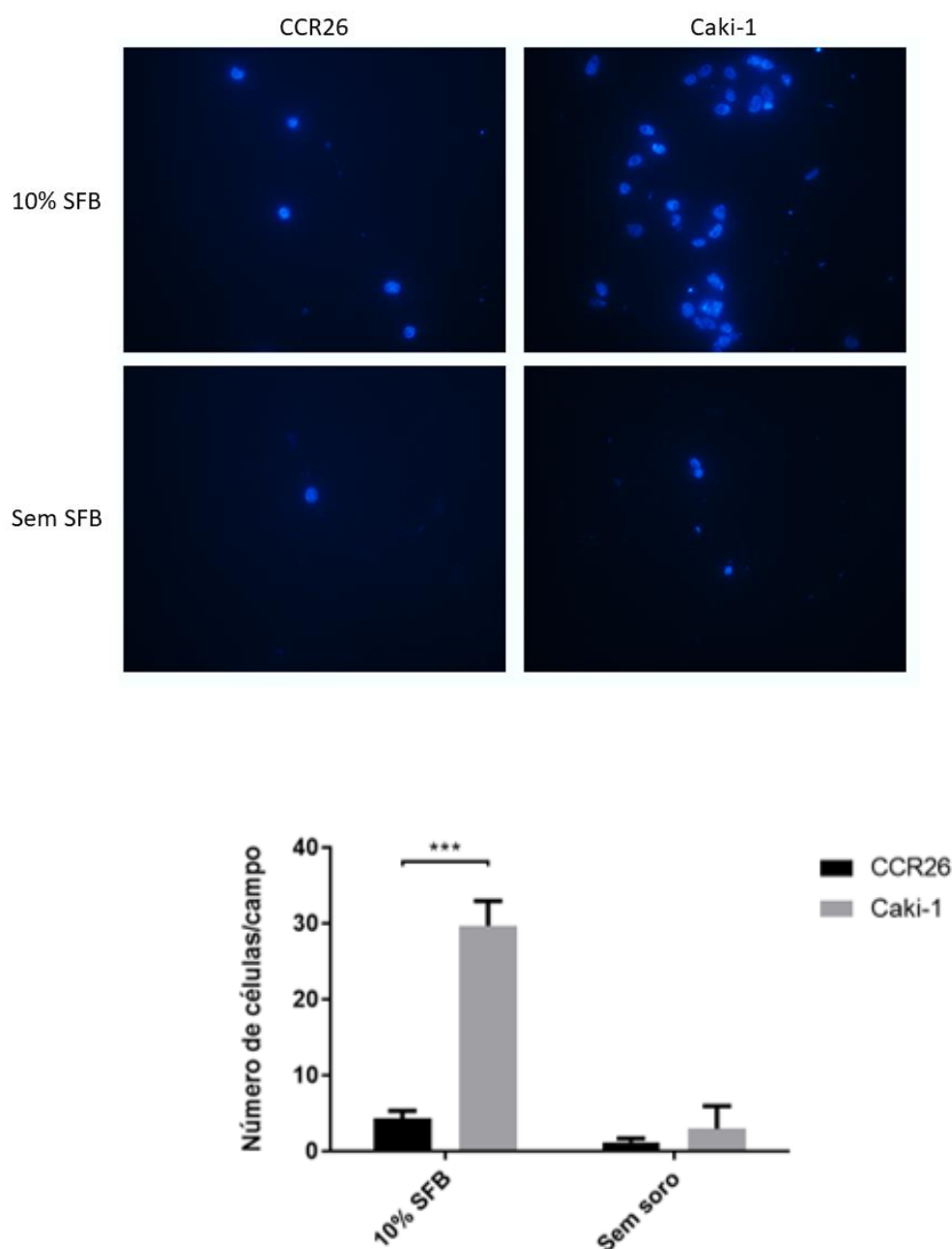


Figura 10. Migração das células CCR26 e Caki-1 avaliada em placas Transwell. As imagens representam um dos campos fotografados para ensaio usando 2×10^5 células CCR26 e Caki-1 avaliadas para migração por quimiotaxia na presença e ausência de por 18 horas. As células

foram coradas com DAPI e analisadas em microscópio de fluorescência (excitação-358 nm e emissão-461 nm) em aumento de 20x. O gráfico apresenta a média $\pm$ desvio padrão do número de células que migram na presença e ausência de SFB. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.. Os dados foram analisados através do Teste t não paramétrico pelo software GraphPad Prism 8.2.1. *** $P < 0,001$. Fonte: Autoria própria.

Esses dados sugerem que o fenômeno de formação de trombos e invasão do sistema venoso não é mediado por maior capacidade de migração das células, mas que pode estar mais relacionado ao microambiente tumoral e interações das células com outros componentes.

4.7 Tumores originados de PDX que formam trombos tumorais em veia cava apresentam aumento de *Neutrophil extracellular traps* (NETs)

Os PDX de tumores renais que formam ou não trombos tumorais em veia cava foram avaliados por imunofluorescência para mieloperoxidase e histona H3 acetilada, marcadores específicos de NETs. A Figura 11 mostra a marcação das duas proteínas em PDX derivados diretamente de um tumor que não forma trombos (Fig. 11 A), do tumor que forma trombos no PDX (Fig. 11 B), do tumor derivado de células CCR26 (Fig. 11 C) e do PDX que foi gerado a partir do próprio trombo tumoral. A quantificação da presença NETs pela medida da fluorescência por campo mostra que há uma maior formação de NETs em todas as condições de formação de trombo (Figura 11E).

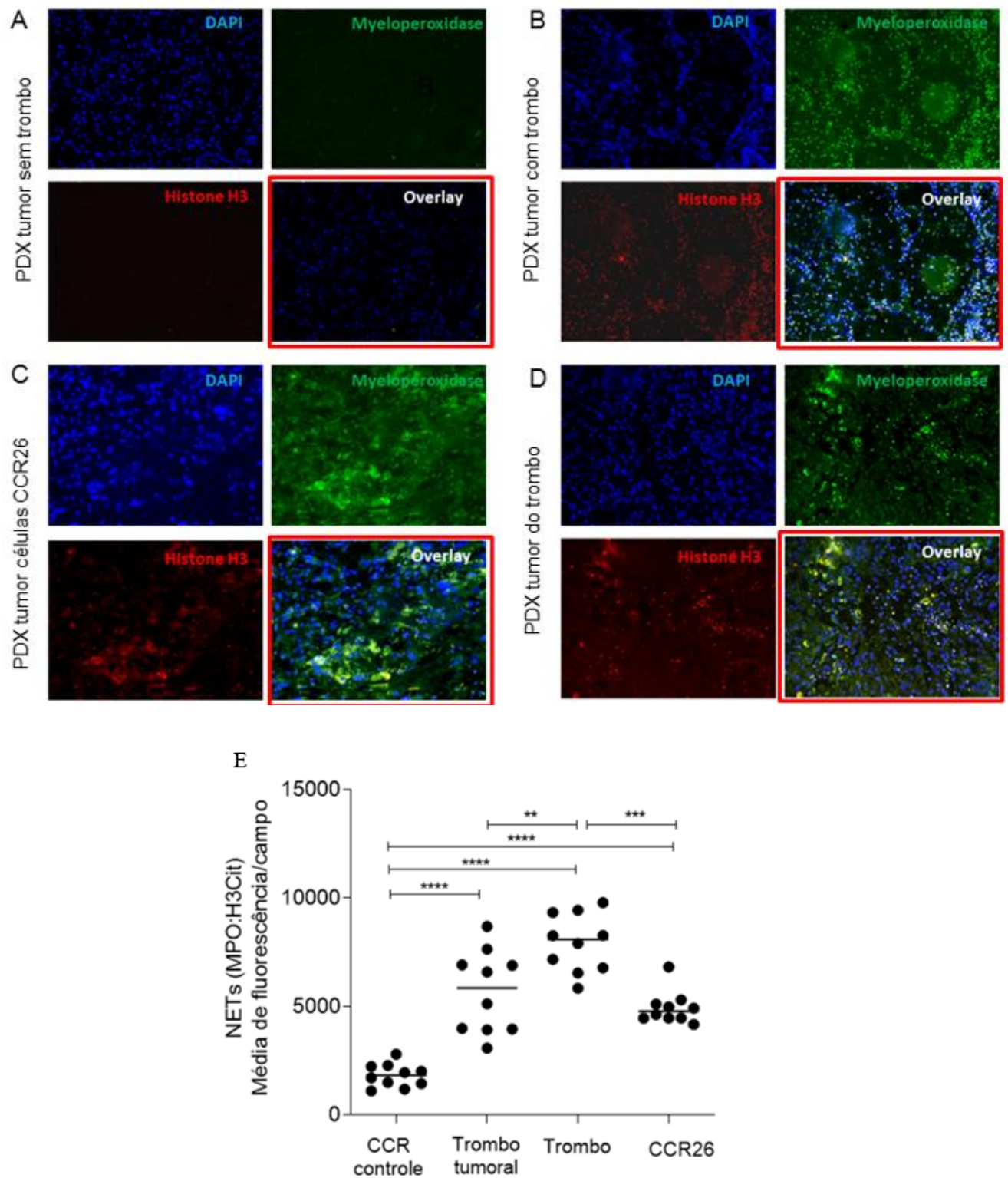


Figura 11. Imunofluorescência de tumores de PDX com anticorpos contra mieloperoxidase e histona H3, marcadores de NETs. A) PDX de tumor renal de células claras que não forma trombos B) PDX de tumor renal que forma trombos. C) PDX derivado de célula CCR26 D) PDX derivado do trombo tumoral. O gráfico mostra diferença significativa entre os grupos analisados através do teste estatístico Ordinary one way-ANOVA seguido de comparação múltipla de Bonferroni. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Fonte: Autoria própria.

4.8 Camundongos implantados com PDX de tumor que forma trombo com células CCR26 ou com trombo tumoral possuem níveis elevados de IL-8 humana no plasma.

Os níveis de IL-8 humana foram avaliados por ELISA no plasma dos camundongos implantados com PDX derivados de tumores formam ou não trombos tumorais em veia cava, com células CCR26 e com trombos tumorais. Em todas as condições em que os camundongos foram implantados com tumor, seja célula CCR26 ou fragmento de PDX, os níveis de IL-8 humana circulante no plasma é de respectivamente 10 a 30 vezes maior do que aqueles de animais implantados com PDX de tumores que não formam trombos (Figura 12).

Interessantemente, os níveis de IL-8 humana em animais implantados com o próprio trombo tumoral são cerca de 3 vezes maiores que aqueles de camundongos implantados com o tumor primário ou células CCR26, sugerindo que o trombo tem uma capacidade maior de geração de NETs do que o tumor primário. Os ensaios de ELISA realizados para CXCL1 e MIP1beta não mostraram níveis mensuráveis dessas citocinas, indicando que a IL-8 é a principal citocina presente no plasma de animais inoculados com tumores, células ou trombos tumorais de tumores renais de células claras que formam trombos em pacientes.

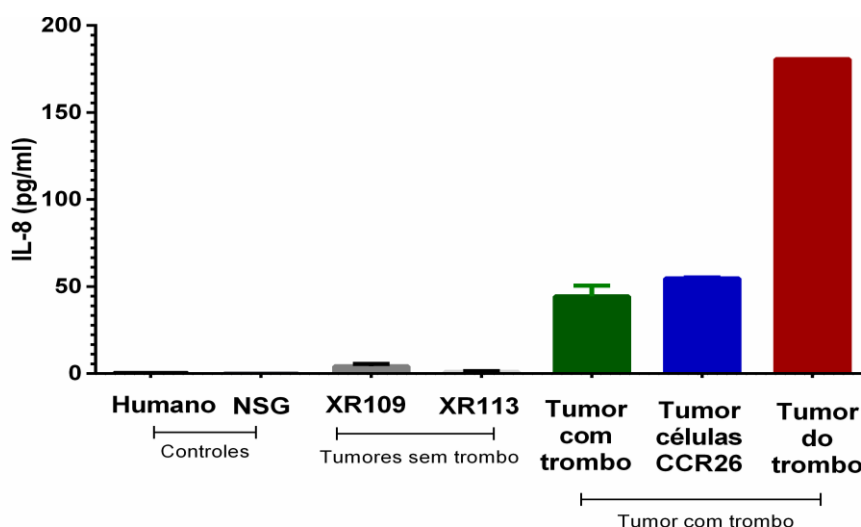


Figura 12. PDX com CCRcc que forma trombos possuem níveis de IL-8 humana significativamente mais altos que PDX com CCRcc que não formam trombos. Níveis de IL-8 no plasma de doador humano saudável, camundongos NSG (saudável), e camundongos implantados com os tumores XR109 e XR113 (não formam trombos). Os níveis de IL-8 são mostrados ainda no plasma de camundongos implantados com o tumor XR60 (barra verde), camundongo implantado com células CCR60 (barras azuis) e camundongos implantados com fragmentos de trombo de veia cava retirado de animais com PDX de XR60. Fonte: Autoria própria.

4.9 Indução de NETs por acetato de tetradecanoilforbol (PMA).

Considerando que foi observada a presença de marcadores clássicos de NETs no plasma e no tecido tumoral, a próxima etapa consistiu em investigar o papel das NETs na formação de trombos de veia cava. Para tanto, estabelecemos um protocolo onde neutrófilos isolados de indivíduos sadios são tratados com o éster de forbol PMA, um agente indutor de NETs¹⁰³ para posterior comparação da atividade do meio condicionado de CCR26 na indução de NETs.

A Figura 12 mostra a curva dose-resposta de PMA em neutrófilos tratados por 1h (Fig. 12A) ou 4h (Fig. 12B). Inicialmente, estabelecemos o protocolo de indução de NETs em neutrófilos com PMA. Após o período de tratamento, as células foram fixadas e a imunofluorescência foi realizada com o marcador de NETs, a elastase. Em 1h de incubação, foi possível identificar a formação de NETs a partir da concentração de 50 nM, enquanto em 4h foi possível observar na menor concentração utilizada (25 nM). Para estabelecer a condição de ativação ideal de NETs, foi escolhida a concentração de 150 nM e 4h de incubação.

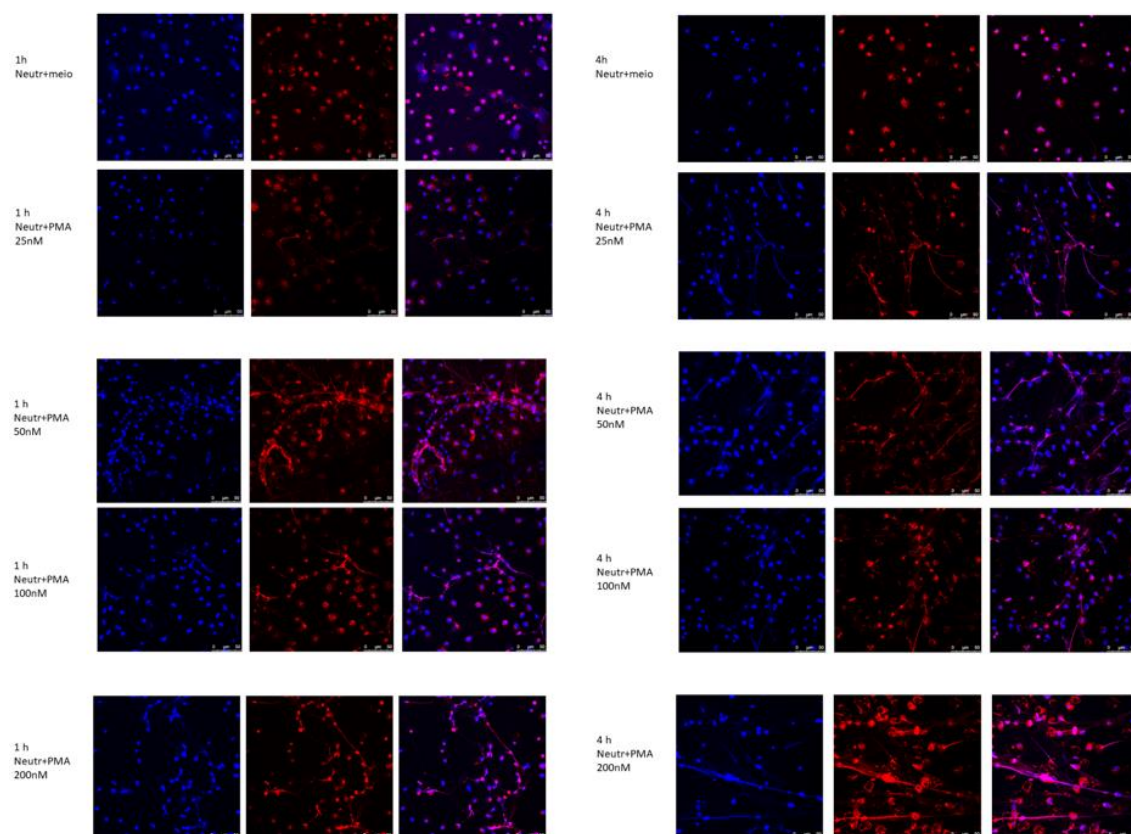


Figura 13. Indução da formação de NETs em neutrófilos tratados por uma hora (A) ou 4 horas (B) com concentrações crescentes (25, 50, 100 e 200nM) de PMA e grupo controle sem tratamento. Os núcleos celulares foram marcados com Draq5 (colunas à esquerda), a imunofluorescência com anticorpos anti-elastase mostra a crescente formação de NETs (colunas centrais) e a sobreposição das imagens dos núcleos e da elastase apresenta a disposição de relação células/NETs (colunas à direita). Fonte: Autoria própria.

4.10 Fatores secretados pelas células CCR26 induzem a formação de NETs em neutrófilos humanos

Neutrófilos humanos isolados do sangue periférico de doadores saudáveis foram incubados com meio condicionado (MC) de células CCR26 e células Caki. Os resultados mostram que o MC de CCR26 é capaz de estimular a morte de neutrófilos e consequente formação de NETs. Esta atividade não foi observada em MC de células CAKi. O Meio de cultura fresco suplementado com 1% SFB não apresentou nenhuma atividade na formação de NETs. PMA 150 nM foi utilizado como controle positivo. (Figura 13). As NETs formadas pelo meio da CCR26 são semelhantes às que se formam quando neutrófilos são incubados com 180 nM de PMA, indicando que fatores específicos secretados pela CCR26 são capazes de induzir a formação de NETs.

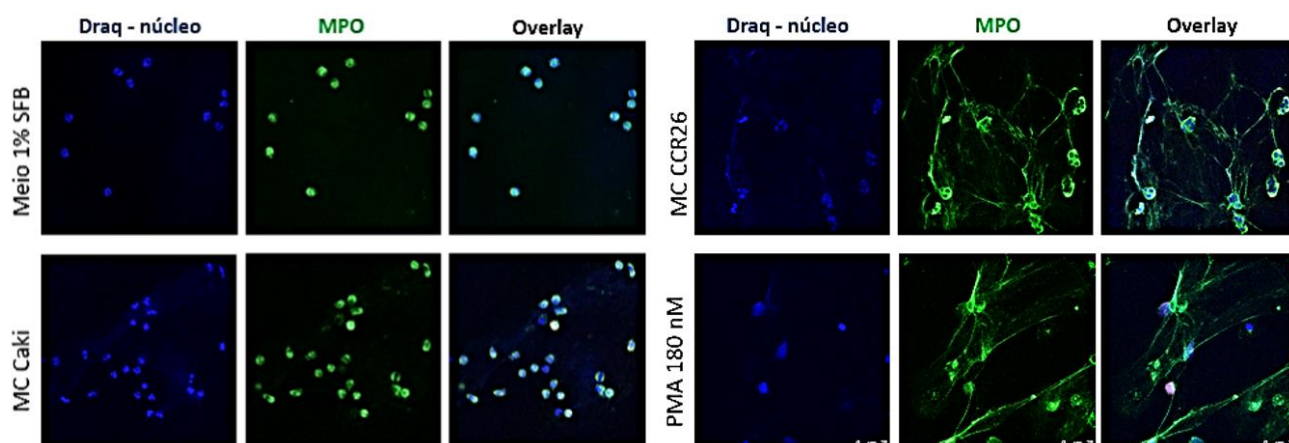


Figura 14. Neutrófilos humanos isolados de sangue periférico foram incubados por 4 hrs a 37°C com MC de células CCR26 e Caki. Os neutrófilos foram marcados com anticorpos para para mieloperoxidase (MPO) por imunofluorescência. As imagens mostram os núcleos das células marcados com Draq (colunas da esquerda das composições), redes de NETs marcadas com MPO (colunas centrais das composições) e overlay das imagens (colunas da direita). Meio com 1% SFB e PMA 180nM foram usados respectivamente como controle negativo e positivo para a formação de NETs. Fonte: Autoria própria.

4.11 Fatores secretados pelas células CCR26 induzem a migração de neutrófilos humanos.

Além da capacidade de indução de NETs, foi avaliado o efeito do MC de células CCR26 na migração de neutrófilos humanos. As células foram cultivadas e o MC foi centrifugado por 5 min a 1500 rpm e filtrado (0,2 μ m) para retirada de células e *debris*. O MC total foi utilizado para avaliação da migração de neutrófilos.

Neutrófilos na concentração de 4×10^4 células foram suspensos em DMEM e colocados na parte superior do inserto da câmara de *transwell*. Na parte inferior da câmara foi adicionado MC de CCR26 ou MC das linhagens de tumores renais de células claras, Caki e ACHN, que não formam trombos tumorais. DMEM High 1% SFB foi usado como controle negativo de migração. Como observado na Figura 14, o MC de CCR26 é um potente quimioatraente de neutrófilos quando comparado MC de células Caki-1 e ACHN. De fato, MCs de CAKi-1 e ACHN não são capazes de induzir migração de neutrófilos uma vez que promovem migração semelhante àquela do controle negativo (DMEM High 1% SFB). As imagens superiores representam a migração em 2 e 4 horas dos neutrófilos (núcleos corados com DAPI) presentes na face

inferior da membrana de *transwell*. O gráfico mostra a quantificação da migração dos neutrófilos nas diferentes condições experimentais (Figura 14).

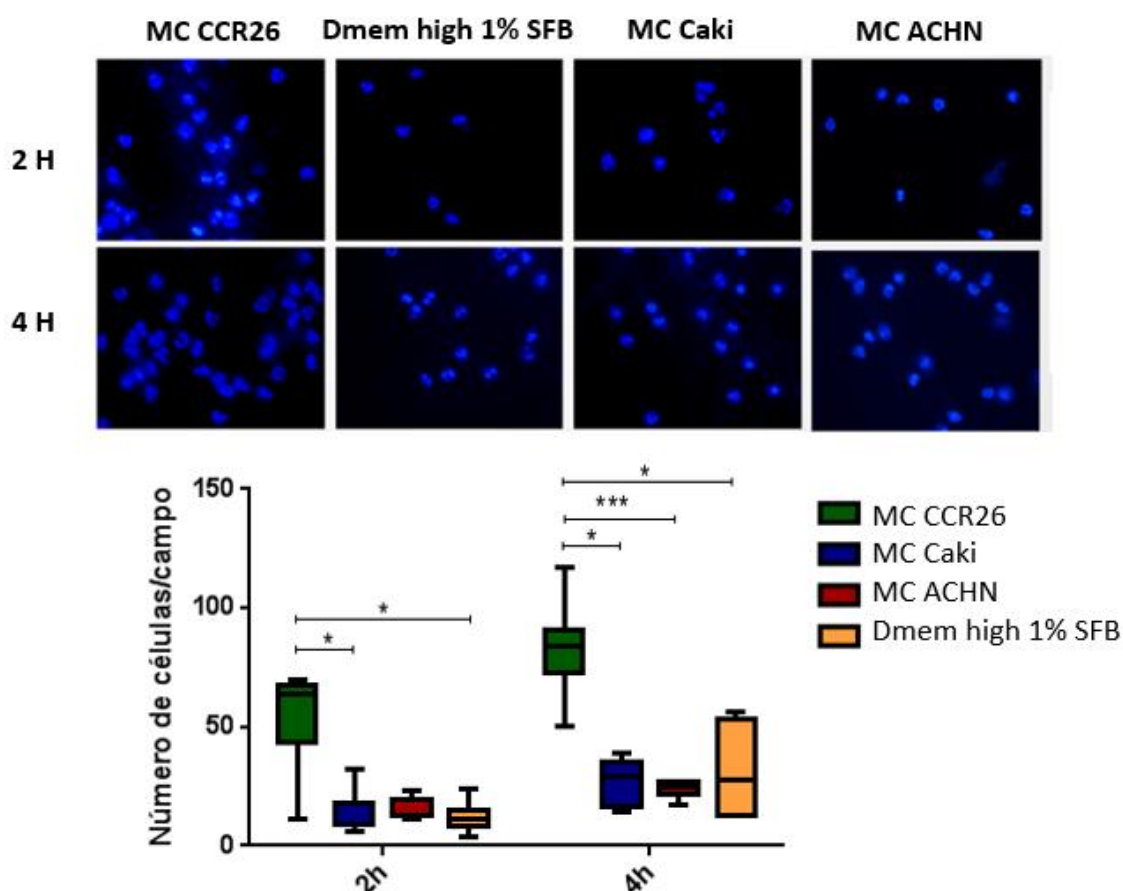


Figura 15. O meio condicionado (CM) total da célula CCR26 promove a migração celular de neutrófilos humanos. Neutrófilos humanos isolados do sangue periférico suspensos em DMEM high foram colocados na parte superior de câmaras *transwell* e na parte inferior foram adicionados MC de cultura das células CCR26, Caki-1 e ACHN e meio controle DMEM high 1% SFB. Após 2 e 4 h os neutrófilos aderidos a face inferior da membrana na câmara foram fixados, os núcleos corados com DAPI, fotografados em aumento de 40x em microscópio de fluorescência e contados no software Image J. O gráfico representa a mediana $\pm$ desvio padrão de sete experimentos independentes. Foi realizado teste estatístico de One Way ANOVA seguido do pós teste Kruskal-Wallis. Valor de * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Fonte: Autoria própria.

Estes resultados indicam que fatores secretados pelas células de carcinomas renais de células claras que formam trombos tumorais em veia cava promovem a migração de neutrófilos.

Os experimentos descritos na Figura 14 mostram que existe uma migração intensa de neutrófilos para a câmara inferior do transwell onde ficam em suspensão no meio de cultura (MC). Além disso, as contagens das células na membrana inferior do transwell mostraram grande variância, particularmente para o MC das células CCR26.

Na tentativa de identificar se era possível avaliar a migração pela contagem nas células no compartimento inferior da câmara, foram realizados experimentos com neutrófilos nas concentrações de 4×10^4 ou 4×10^5 células. O MC de células CCR26 foi usado como quimioatraente e DMEM high 1% SFB como controle negativo. A migração dos neutrófilos foi avaliada após 30 min, 1, 2 e 4 horas pela contagem das células na câmara inferior do *transwell* (Figura 15).

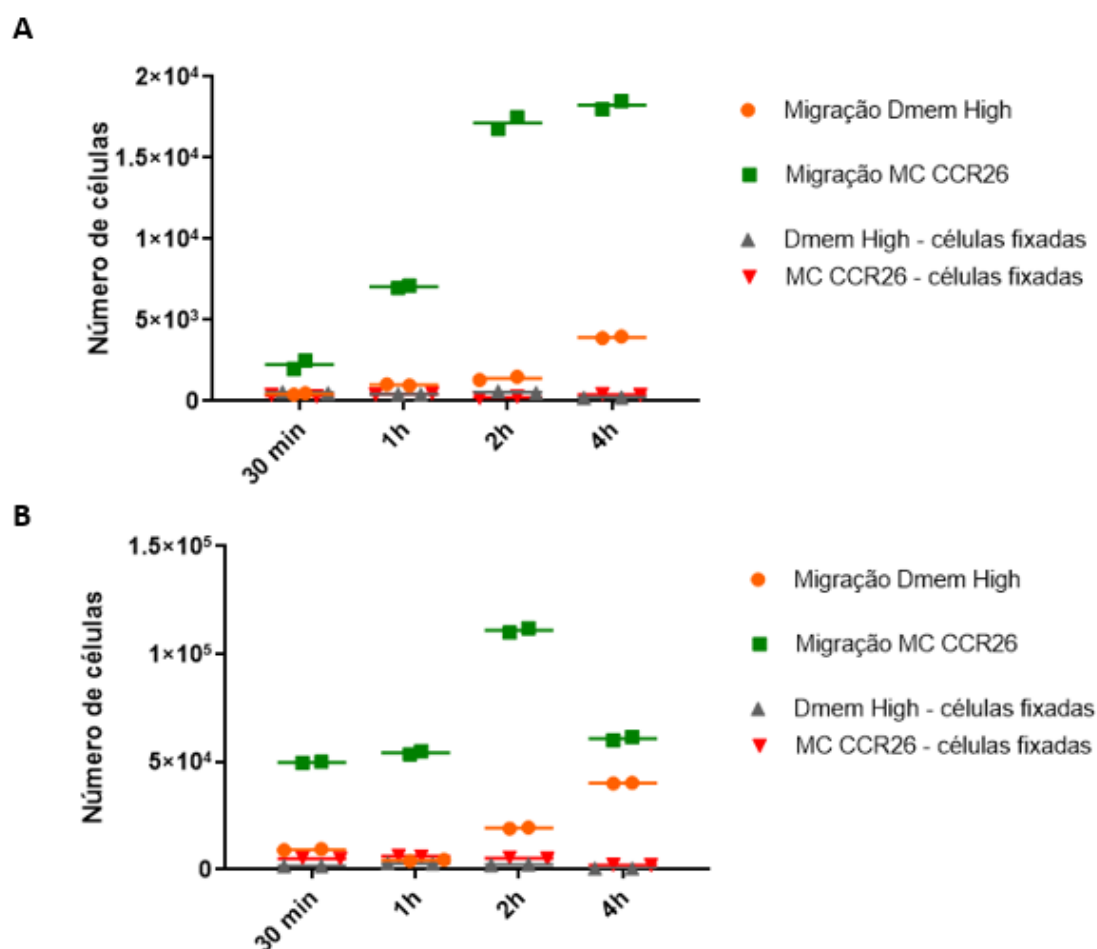


Figura 16. Potencial de migração de neutrófilos *in vitro*. A capacidade de migração de neutrófilos mediada pelo meio condicionado das células CCR26 foi avaliada durante 30 min., 1, 2 e 4 hrs. (A) Foram plaqueados 4×10^4 ou (B) 4×10^5 neutrófilos na parte superior do inserto. As células que migraram para a câmara inferior foram fixadas e contadas. Os gráficos representam a média de dois experimentos independentes. Fonte: Autoria própria.

Os resultados obtidos mostram que o MC de células CCR26 é um potente quimioatraente de neutrófilos quando comparado ao meio de cultura controle (DMEM high 1% SFB).

Os resultados das Figuras 14 e 15 mostram dados semelhantes, e as variações experimentais são menores quando se mede as células no compartimento inferior.

O ensaio de migração com 4×10^5 neutrófilos não mostra uma migração tempo dependente. Esta é proporcionalmente maior do que a observada para o plaqueamento de 4×10^5 células para os tempos de 30 min e 1 horas e depois fica melhor em 2 e 4 horas (Figura 14 B). É provável que o aumento de 10 vezes no número de células plaqueadas sature o sistema e iniba parcialmente o processo de migração ao longo do tempo. Portanto, para os experimentos seguintes optou-se por utilizar a quantidade de 4×10^4 neutrófilos e avaliar a migração celular nos tempos de 2 e 4 h. Os resultados mostrados nas Figuras 14 e 15 representam a média de dois experimentos independentes e portanto, não foi possível realizar uma análise estatística.

4.12 Vesículas extracelulares e fatores solúveis do MC de células CCR26 induzem a migração de neutrófilos.

Vesículas Extracelulares (VEs) foram isoladas a partir do MC de células CCR26 e CaKi. O pellet contendo as VEs foi ressuspensão em meio fresco com SFB depletado de VEs. O sobrenadante foi utilizado para controle de fatores solúveis livres de VEs.

A Figura 16 mostra a quantificação de neutrófilos que migraram para a câmara inferior do transwell quando foram usados MC Total (MC_{total}), Vesículas Extracelulares de MC (MC_{VE}) e Fatores Solúveis de MC (MC_{FS}) como quimioatraentes. DMEM high 1% SFB foi usado como controle negativo. Apenas o tratamento por 2 horas com MC_{total} de células CCR26 é capaz de induzir migração de neutrófilos. MC_{total} de células CaKi e ACHN não promovem migração quando comparados ao controle negativo. A migração de neutrófilos promovida pelo tratamento por duas horas com MC_{VE} de CCR26 (Fig. 16 B) é semelhante aquela observada com MC_{total} desta célula (Fig.16 A) e dobra quando o tratamento é realizado por 4 horas (Fig.16 C). Estes valores são significativamente maiores do que o controle negativo. Por sua vez, a migração de

neutrófilos não é induzida pelo tratamento por 2 ou 4 horas com CM_{total} , CM_{VE} e CM_{FS} de células Caki, e apresenta valores semelhantes ao controle negativo.

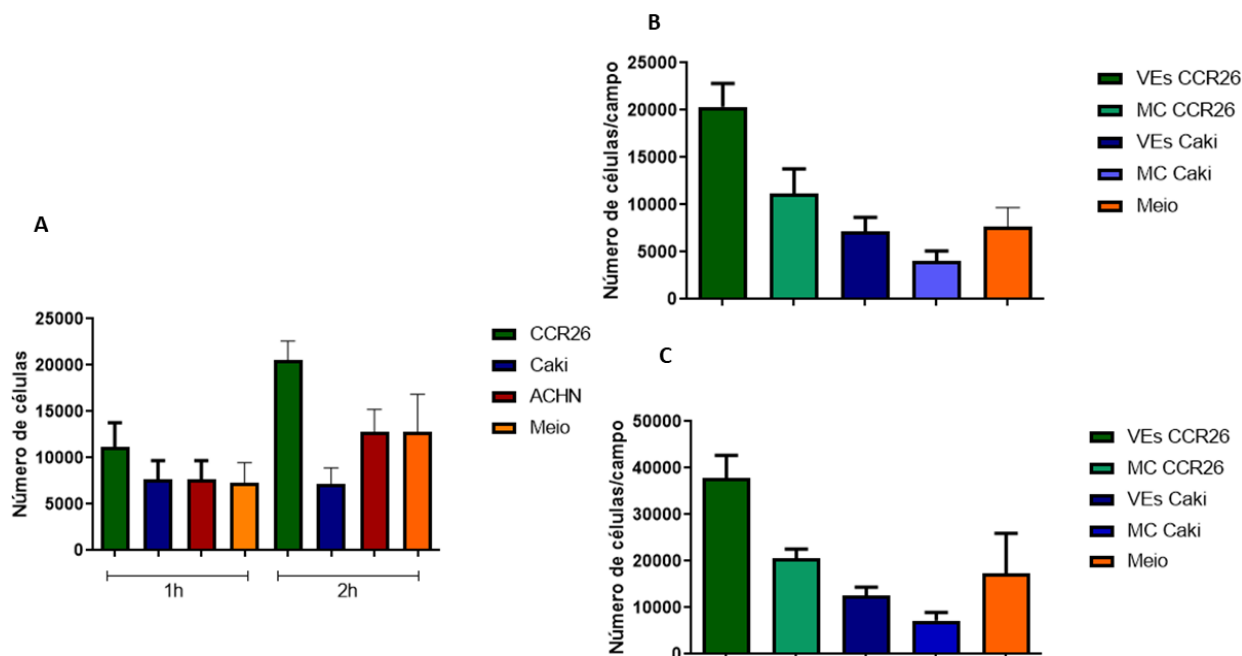


Figura 17. Vesículas extracelulares presentes no MC de células CCR26 são os componentes ativos responsáveis pela indução da migração de neutrófilos *in vitro*. Neutrófilos (4×10^4) foram colocados na parte superior dos insertos *transwell*. A câmara inferior do *transwell* recebeu MC das células tumorais e a migração celular foi avaliada em 1 e 2 h. Os neutrófilos que migraram para a câmara inferior do *transwell* foram quantificados. (A) Migração promovida pelo MC_{Total} (MC total) das células tumorais CCR26, Caki e ACHN e controle negativo DMEM High 1% SFB. (B e C) Migração de neutrófilos promovida por Vesículas Extracelulares do MC (MC_{VE}) e Fatores solúveis do MC (MC_{FS}) de células CCR26 e CaKi após tratamento por 2 (B) e 4 (C) horas. DMEM high 1% SFB foi usado como controle negativo. Os dados representam 2 experimentos independentes conduzidos em triplicata. Fonte: Autoria própria.

Para fazer o isolamento das VEs, as células foram cultivadas de modo que estivessem com quantidades parecidas nas garrafas de cultura. A Figura 18 apresenta os perfis de tamanho e concentração das VEs das linhagens CCR26 e Caki-1.

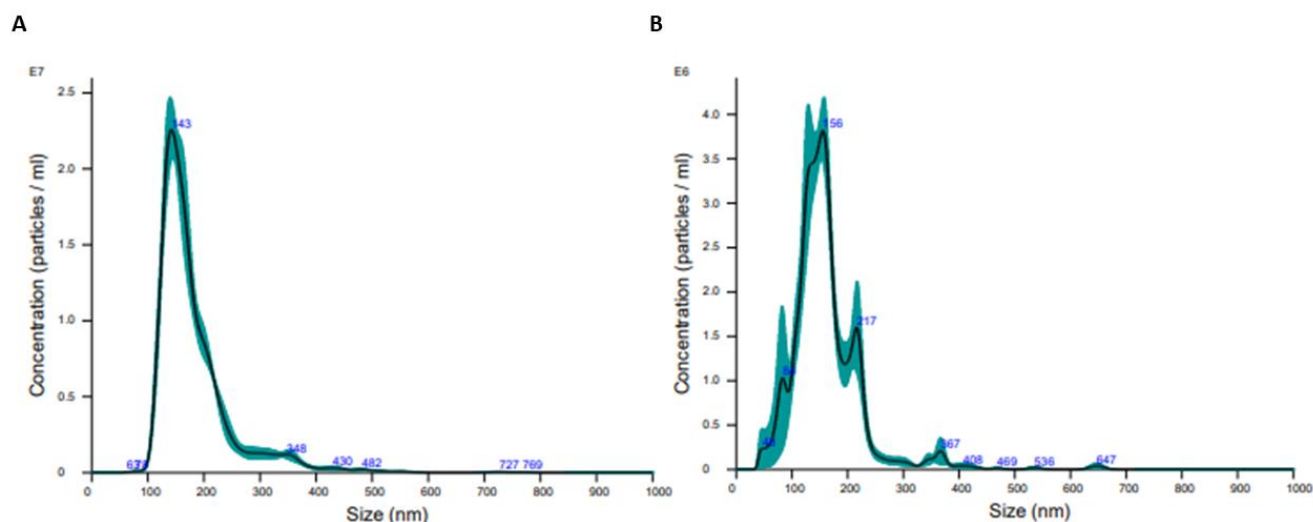


Figura 18. Concentração de vesículas extracelulares extraídas de meio condicionado das células CCR26 (A) e Caki-1 (B). O meio de cultura foi coletado de garrafa T180; as células CCR26 tinham densidades de $2,9 \times 10^6$ e as células Caki-1 de $2,7 \times 10^6$. Os gráficos representam a concentração de partículas por tamanho (nm). Foram realizadas 5 aquisições de cada amostra, em diferentes campos. Dados coletados em Nanosight LM10. Fonte: Autoria própria.

As células CCR26 apresentaram tamanho médio de 182,5 nm e concentração média de $1,86 \times 10^9/\text{ml}$, enquanto as células Caki-1 apresentaram tamanho de 163 nm e concentração média de $3,58 \times 10^8$.

Os resultados em conjunto mostraram que a célula CCR26 liberam VEs e componentes solúveis no meio de cultura e que as VEs são os componentes mais importantes na indução da migração de neutrófilos humanos *in vitro*. Este fenômeno só foi observado em MC de células CCR26 que levam à formação de tumor e trombos tumorais *in vivo*. MC e MC_{VE} de células tumorais de outros pacientes com carcinomas renais de células claras como as Caki e ACHN que não formam trombos *in vivo* são pouco capazes de induzir a migração de neutrófilos quando comparados à CCR26.

No conjunto sugerimos que VEs secretadas por alguns carcinomas renais de células claras podem promover a migração de neutrófilos e induzir a formação de NETs que associados às células tumorais podem levar a formação de trombos tumorais na veia cava.

4.13 Relação linfócito/neutrófilo em pacientes com trombos tumorais

Considerando os achados que indicam a participação dos neutrófilos na formação dos trombos tumorais, uma abordagem relevante foi investigar a proporção de neutrófilos e linfócitos em pacientes com CCR que desenvolvem trombos tumorais em comparação àqueles que não desenvolvem trombos.

Foi realizado uma busca nos prontuários médicos de pacientes com e sem trombo, da informação contida nos hemogramas. Um levantamento preliminar, identificou 14 pacientes que atendiam aos critérios mínimos para avaliação, estadiamento pT3 com trombos (N = 7) e sem trombos tumorais (N = 7). A relação neutrófilos/linfócitos mostra uma mediana de 2,70 para pacientes com CCR sem trombo tumoral e de 2,34 nos pacientes com CCR e trombo tumoral, como representado na Figura 19. A avaliação preliminar não nos permite sugerir que há uma relação entre a razão neutrófilo/linfócito. Porém, estes ensaios ainda estão em desenvolvimento e necessitam de mais pacientes.

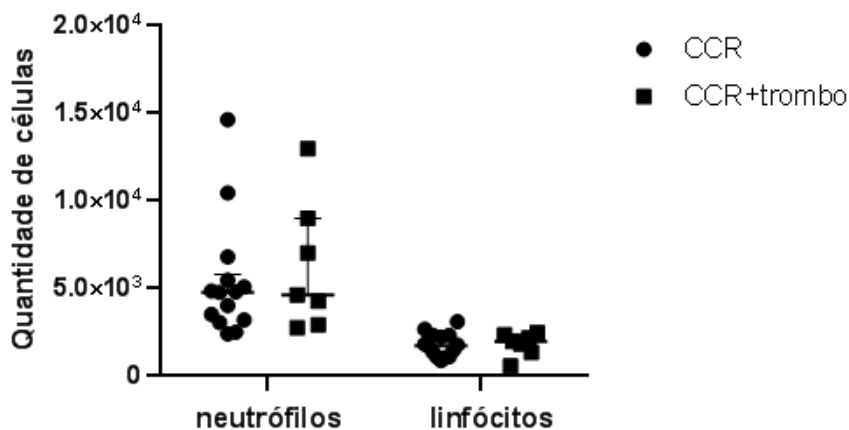


Figura 19. Quantidade de neutrófilos e linfócitos circulantes em pacientes com CCR. Os dados foram coletados antes dos pacientes serem submetidos a cirurgia. O gráfico representa valores obtidos de 14 pacientes com CCR dos quais 7 pacientes apresentam trombos tumorais em veia cava. Dados da mediana + intervalo interquartil. Fonte: Autoria própria.

Os dados obtidos mostram que quanto avaliados na circulação não há diferença entre o número de neutrófilos circulantes de pacientes com CCR com e sem trombos. Entretanto, estes valores podem não representar o que é visto no tecido tumoral e esta avaliação ainda está em desenvolvimento.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo investigar os mecanismos relacionados à formação de trombos tumorais que impactam a sobrevida de pacientes com CCR. Em sua grande maioria, os estudos sobre o desenvolvimento e formação de trombos tumorais no câncer renal abordam os diversos manejos cirúrgicos e intervenções com as combinações de terapias de primeira e segunda linha. Entretanto, existem poucos estudos que abordam os aspectos biológicos dessa condição e tragam de forma clara possibilidades terapêuticas com alvos em vias de sinalização específicas.

Para isso, em trabalho anterior do grupo foi verificado que o fragmento de tumor primário de paciente com câncer renal que apresentava trombo de veia cava quando inoculado em camundongos NSG desenvolviam tumor renal e esses animais também apresentavam trombo tumoral¹⁰⁰. Esta situação se repete a cada passagem dos fragmentos dos tumores crescidos em camundongos para outros animais e, assim, mantendo o modelo de estudo *in vivo*. Este modelo é inédito na literatura e mesmo nos estudos do nosso grupo não obtivemos novos casos de CCR formadores de trombo em que a condição fosse reproduzida em camundongos. Portanto, consideremos que este modelo apresenta uma complexidade que pode trazer respostas para o entendimento dos fatores envolvidos com a formação de trombos tumorais em veia cava nos CCR.

Células do tumor primário deste PDX foram imortalizadas (CCR26), a sua tumorigenicidade foi determinada e, de forma surpreendente, a capacidade de induzir a formação de trombos foi mantida. Em conjunto, estas características tornam este modelo único, pois nos permitirá investigar não somente os mecanismos que governam a formação de trombos, mas também buscar fármacos que possam diminuir, estabilizar ou até mesmo desfazer por completo os trombos, como uma terapia neoadjuvante, por exemplo.

Para avaliarmos melhor o comportamento das células CCR26 foram feitos ensaios de proliferação celular e migração comparando com a linhagem comercial Caki-1 e ensaios de formação de esferoides. As células CCR26 demonstraram capacidade de proliferar mesmo sem aderência ao substrato, demonstrando maior adaptabilidade

ambiental. Investigamos se essa capacidade de proliferação em suspensão estava relacionada com maior capacidade de migração *in vitro*, visto que para células tumorais deixarem seu local de origem e iniciarem o processo de metástase ocorre a transição epitelial mesenquimal e escape para corrente sanguínea.¹¹² No entanto, com estímulo de soro fetal bovino as células Caki-1 possuem maior capacidade de migração *in vitro* que as CCR26, indicando que o extravasamento dessas células do sítio tumoral e formação de trombos, depende de outros processos em conjunto que ocorrem no microambiente tumoral que não somente a migração replicada *in vitro* e analisada isoladamente.

Uma das ideias iniciais era que a formação dos trombos não dependeria exclusivamente da atividade do sistema imune, uma vez que o tumor e os trombos se desenvolvem em um camundongo imunodeficiente como o NSG. Entretanto, apesar de serem depletados de quase a totalidade das células imunes, estes animais ainda possuem quantidades significativas de neutrófilos⁹⁹. Portanto, este fato nos direcionou à avaliação dos mecanismos de formação de trombos tumorais que envolvessem os neutrófilos. Somado a este fato, a relatos da literatura que indicam um papel prognóstico ruim quando há infiltrado de neutrófilos em carcinoma de células renais.

Estas células desempenham um papel crucial no sistema imunológico, sendo responsáveis pela defesa do organismo contra infecções bacterianas e fúngicas, dentre outros processos¹⁰². No contexto do câncer, os neutrófilos podem ser encontrados dentro do tumor, sendo denominados de neutrófilos associados ao tumor, do inglês (TANs). Sabe-se que essa associação de neutrófilos e as células tumorais influencia o microambiente tumoral, afetando o crescimento e a disseminação do câncer renal¹⁰⁴. Os neutrófilos são ainda conduzidos por diversos estímulos a uma morte celular por NETose, onde se formam NETs que estão associados a processos tumorais, respostas inflamatórias e a tromboembolismo venoso associado ao câncer^{105,106,107}.

Em um estudo recente com 183 pacientes com ccCCR foi observado que há um maior acúmulo de NETs no tecido tumoral do que na área tecidual adjacente ao tumor. Os níveis de NETs no tumor estavam associados a uma menor sobrevida global (HR 1.60 [95% CI 1.05-2.43], log-rank p = 0.017), e representam um fator prognóstico de

risco independente (HR 1.733 [95% CI 1.165-2.579], $p = 0.007$) para sobrevida global em pacientes com ccCCR metastáticos¹⁰⁸.

Estes últimos dados convergem com nossos achados da presença de NETs em PDX de ccCCR, medidos pela morfologia e marcação por imunofluorescência com anticorpos anti-mieloperoxidase e histoma H3 citrulinada. Além disso, de forma inédita os resultados obtidos mostram que a presença de NETs está aumentada em PDX de ccCCR que formam trombos tumorais em veia cava quando comparados com aqueles que não formam. Estes dados sugerem a maior capacidade de recrutamento de neutrófilos e formação de NETs nos ccCCR pode estar associada à formação de trombos tumorais nestes tumores. Além disso, verificamos que em pacientes com ccCCR não ocorre um aumento da relação neutrófilos/leucócitos só sangue periférico de pacientes com trombos em veia cava comparados àqueles que não apresentam trombos. Portanto, sugerimos que o mecanismo envolve o recrutamento de leucócitos ao sítio tumoral, o que não afeta seus níveis circulantes ou é compensado pelo aumento na produção destas células pelos pacientes.

Este conjunto de dados levou à proposta de que células tumorais que são capazes formar trombos em veia cava podem liberar fatores que recrutam neutrófilos para o sítio tumoral, promovendo a formação de trombos tumorais. De fato, o tratamento de neutrófilos humanos de doadores normais com MC de células CCR26 (proveniente de ccCCR que forma trombo) leva a uma formação intensa de NETs comprovada pela marcação destas estruturas por imunofluorescência com anticorpos anti-mieloperoxidase. Em MC de linhagens celulares de ccCCR que não formam trombos estas estruturas não foram observadas. É relevante ressaltar a importância de associarmos dados de células de ccCCR que não formam trombos isoladas de PDX resultantes da implantação de tumores dos nossos pacientes. Entretanto, apesar do trabalho intenso que tivemos neste sentido, não conseguimos isolar e cultivar estas células, por isso orientamos estas atividades com linhagens comercialmente disponíveis como controle.

Os experimentos seguintes abordaram se fatores secretados pelas células tumorais poderiam modular a quimioatração de neutrófilos. Esta atividade foi medida

em ensaios de migração de neutrófilos em *transwell*, atraídos pelo MC das células tumorais adicionado à face inferior da membrana. Os dados mostraram que o MC de células CCR26 promove uma migração robusta e tempo dependente. Estes valores são significativamente menores para células CaKi e ACHN, e equivalentes ao meio de cultura controle.

Um dos mecanismos propostos para a formação de trombos tumorais envolve a participação das Vesículas Extracelulares (VEs). Já foi demonstrado que as VEs exercem múltiplas atividades em células tumorais e no microambiente, bem como estão envolvidas em processos trombóticos. Em modelo de trombose *in vivo*, a expressão de alguns micro RNAs (miR-21, 223 e 339) foi significativamente aumentada nas VEs, exemplo da interação do conteúdo dessas vesículas com seu microambiente¹⁰⁹. No nosso modelo, identificamos que o meio condicionado (MC) das células CCR26 é capaz de induzir a migração de neutrófilos e formação de NETs. VEs isoladas do MC apresentam a mesma capacidade, o que indica a participação delas nos processos, o que não ocorre com o sobrenadante do MC onde estão presentes fatores solúveis.

Estes dados sugerem que a formação de trombos tumorais *in vivo* pode ser dependente da atração de neutrófilos ao microambiente tumoral mediada por VEs secretadas pelas células tumorais. Como o aparecimento de trombos tumorais só acontece em 8 a 10% dos pacientes é possível que componentes específicos do cargo destas VEs como proteínas e pequenos RNA possam regular este processo^{47,83}. Adicional ao processo de migração celular, os dados deste trabalho também mostram que o MC de células tumorais que formam trombos induz neutrófilos à morte celular por netose e formação de NETs, componentes sabidamente envolvidos na formação de trombos.

Outro aspecto importante que fortalece nossa hipótese do envolvimento de NETs na formação de trombos tumorais é a presença da citocina IL-8. Existem muitas evidências que associam IL-8 com a formação de NETs. Interessantemente, observamos que camundongos com PDX provenientes de fragmentos do tumor do paciente ou de suas células imortalizadas CCR26, apresentam altas concentrações de IL-8 humana solúvel no plasma, portanto produzida pelas células tumorais e que sabidamente está envolvida com a formação de NETs. Como não vimos atividade de migração mediada

de fatores solúveis no MC de células CCR26, podemos supor que IL-8 não participa do processo de migração de neutrófilos neste modelo ou que não é secretada na forma solúvel. Por outro lado, a secreção de IL-8 em VEs já foi observada previamente em células de tumores de próstata¹⁰⁹. A presença de IL-8 nas frações solúvel e de VE provenientes do MC de células CCR26 precisa ser investigada para que se entenda seu papel no mecanismo que está sendo investigado no presente trabalho.

Portanto, a proposta capacidade das células de tumores ccCCR de formarem trombos em veia cava pelo recrutamento de neutrófilos para o tecido tumoral e promoverem a formação de NETs parece ser fortemente guiada por componentes do cargo de VE provenientes do tumor. Uma vez que NETs também são observadas no trombo tumoral. Sugerimos que as células tumorais secretam fatores associados a VEs que são capazes recrutar neutrófilos e induzir a formação de NETs, desencadeando o processo trombótico. Caso esta hipótese seja verdadeira o uso de inibidores da formação de NETs ou de sua degradação poderiam ser alternativas para a diminuição da formação de trombos ou de sua reversão. Fato que permitiria cirurgias menos complexas e com menos morbidade para a abordagem cirúrgica destes pacientes.

A terapia sistêmica de carcinomas de células renais metastático é realizada preferencialmente com os inibidores de checkpoint imunológico, mas inibidores de tirosina quinase ainda são frequentemente utilizados. Ainda há uma imprevisibilidade sobre a eficácia da terapia que é dada muito em função da alta heterogeneidade das células deste tipo tumoral. Nesse contexto, a busca de biomarcadores que permitam identificar para o melhor tratamento dos pacientes é uma necessidade clínica não atendida. Particularmente no que se refere ao tratamento de pacientes com extensos trombos em veia cava, em que o procedimento cirúrgico necessário para os remover levam a grande morbidade e mortalidade. O fato de NETs poderem promover ou piorar a formação de trombos indica que tratamentos com inibidores de sua formação ou que promovam sua degradação como a Gasdermina D¹¹⁰ e a deoxyribonuclease I (DNase I)¹¹¹ respectivamente, alguns já com uso clínico em outras abordagens, possam ser candidatos terapêuticos nestes tumores.

Neste trabalho foram iniciadas abordagens neste sentido como geração de células CCR26 expressando renilla-luciferase para seguimento da formação de tumores

e trombos e tratamentos *in vivo*. Entretanto, não houve tempo de conduzi-los, mas o modelo gerado permitirá que o grupo siga estes estudos.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível gerar modelos de PDX e de linhagem celular derivada de PDX de tumores de pacientes que apresentam ccCCR. Estes mimetizam a formação do câncer renal de células claras e de trombos tumorais em veia cava. Através destes modelos foi possível mostrar que tanto tumores como trombos tumorais destes modelos apresentam altas concentrações de NETs quando comparados com cCCR que não fazem trombos tumorais.

No modelo identificamos que células de ccCCR que fazem trombos secretam VE que promovem migração de neutrófilos e a formação de NETs. A presença deste biomarcador sugere que terapias que têm como alvo a inibição de NETs ou sua degradação merecem abordagens em modelos pré-clínicos *in vivo*. Uma vez que drogas como Gasdermina D e a deoxyribonuclease I já são usados para tratamento de doenças, seria interessante conduzir estudos de reposicionamento destas drogas para tratamento de ccCCR com fatores de risco para formação de trombos tumorais em veia cava ou que já apresentam esta condição e que sua redução melhoraria a morbidade e mortalidade de abordagem cirúrgica para sua retirada.

7 REFERÊNCIAS

1. Yin, W., Wang, J., Jiang, L., & James Kang, Y. (2021). Cancer and stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 246(16), 1791-1801.
2. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2020). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries (vol 68, pg 394, 2018). *CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS*, 70(4), 313-313.
3. Instituto Nacional de Câncer. INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025. Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>> Acesso em 03 de ago, de 2023.
4. Asco. Kidney Cancer: Statistics. Cancer.net, 2023. Disponível em :<<https://www.cancer.net/cancer-types/kidney-cancer/statistics>> Acesso em 03 de ago, de 2023.
5. Ikuerowo, S. O., Ojewuyi, O. O., Omisanjo, O. A., Abolarinwa, A. A., Bioku, M. J., & Doherty, A. F. (2019). Paraneoplastic syndromes and oncological outcomes in renal cancer. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 22(9), 1271-1275.
6. Capitanio, U., Bensalah, K., Bex, A., Boorjian, S. A., Bray, F., Coleman, J., ... & Russo, P. (2019). Epidemiology of renal cell carcinoma. *European urology*, 75(1), 74-84.
7. Gansler, T., Fedewa, S., Amin, M. B., Lin, C. C., & Jemal, A. (2018). Trends in reporting histological subtyping of renal cell carcinoma: association with cancer center type. *Human pathology*, 74, 99-108.
8. Johansson, M., Carreras-Torres, R., Scelo, G., Purdue, M. P., Mariosa, D., Muller, D. C., ... & Brennan, P. (2019). The influence of obesity-related factors in the etiology of renal cell carcinoma—A mendelian randomization study. *PLoS medicine*, 16(1), e1002724.
9. Kim, C. S., Han, K. D., Choi, H. S., Bae, E. H., Ma, S. K., & Kim, S. W. (2020). Association of hypertension and blood pressure with kidney cancer risk: a nationwide population-based cohort study. *Hypertension*, 75(6), 1439-1446.
10. Scelo, G., & Larose, T. L. (2018). Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 36(36), 3574.

11. Liu, Xiaoqiu, et al. "Dose-response relationships between cigarette smoking and kidney cancer: A systematic review and meta-analysis." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 142 (2019): 86-93.
12. Oto, J., Plana, E., Sánchez-González, J. V., García-Olaverri, J., Fernández-Pardo, Á., España, F., ... & Medina, P. (2020). Urinary microRNAs: looking for a new tool in diagnosis, prognosis, and monitoring of renal cancer. *Current urology reports*, 21(2), 1-8.
13. Bukavina, L., Bensalah, K., Bray, F., Carlo, M., Challacombe, B., Karam, J., ... & Psutka, S. P. (2022). Epidemiology of renal cell carcinoma: 2022 update. *European urology*.
14. Bahadoram, S., Davoodi, M., Hassanzadeh, S., Bahadoram, M., Barahman, M., & Mafakher, L. (2022). Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment. *Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia*, 39(3), 2022-vol3.
15. Capitanio, U., Bensalah, K., Bex, A., Boorjian, S. A., Bray, F., Coleman, J., Gore, J. L., Sun, M., Wood, C., & Russo, P. (2019). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *European urology*, 75(1), 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.036>
16. Warren, A. Y., & Harrison, D. (2018). WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World journal of urology*, 36(12), 1913–1926. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2447-8>
17. Mendhiratta, N., Muraki, P., Sisk Jr, A. E., & Shuch, B. (2021, June). Papillary renal cell carcinoma. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 39, No. 6, pp. 327-337). Elsevier.
18. Athanazio, D.A., Amorim, L.S., da Cunha, I.W. et al. Classification of renal cell tumors – current concepts and use of ancillary tests: recommendations of the Brazilian Society of Pathology. *Surg Exp Pathol* 4, 4 (2021). <https://doi.org/10.1186/s42047-020-00084-x>
19. Lobo, J., Ohashi, R., Amin, M. B., Berney, D. M., Compérat, E. M., Cree, I. A., ... & Moch, H. (2022). WHO 2022 landscape of papillary and chromophobe renal cell carcinoma. *Histopathology*, 81(4), 426-438.
20. Isudi Meo, N.A.; Lasorsa, F.; Rutigliano, M.; Loizzo, D.; Ferro, M.; Stella, A.; Bizzoca, C.; Vincenti, L.; Pandolfo, S.D.; Autorino, R.; et al. Renal Cell Carcinoma as a Metabolic Disease: An Update on Main Pathways, Potential Biomarkers, and Therapeutic Targets. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 14360. <https://doi.org/10.3390/ijms232214360>

21. Badoiu, S. C., Greabu, M., Miricescu, D., Stanescu-Spinu, I. I., Ilinca, R., Balan, D. G., ... & Jinga, V. (2023). PI3K/AKT/mTOR Dysregulation and Reprogramming Metabolic Pathways in Renal Cancer: Crosstalk with the VHL/HIF Axis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8391.
22. Mazumder, S., Higgins, P. J., & Samarakoon, R. (2023). Downstream targets of VHL/HIF- α signaling in renal clear cell carcinoma progression: mechanisms and therapeutic relevance. *Cancers*, 15(4), 1316.
23. Cinque, A., Minnei, R., Floris, M., & Trevisani, F. (2022). The Clinical and Molecular Features in the VHL Renal Cancers; Close or Distant Relatives with Sporadic Clear Cell Renal Cell Carcinoma?. *Cancers*, 14(21), 5352.
24. Jonasch, E., Walker, C. L., & Rathmell, W. K. (2021). Clear cell renal cell carcinoma ontogeny and mechanisms of lethality. *Nature reviews. Nephrology*, 17(4), 245–261. <https://doi.org/10.1038/s41581-020-00359-2>
25. Chromophobe Renal Cell Carcinoma Study. National Cancer Institute. Center for Cancer Genomics. Disponible en: <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga/studied-cancers/chromophobe-renal-cell-carcinoma-study>.
26. Lichtbroun, B. J., Shinder, B., Sara, T. G., Srivastava, A., Saraiya, B., Mayer, T. M., ... & Singer, E. A. (2023). Chromophobe Renal Cell Carcinoma with Sarcomatoid Differentiation. *Journal of kidney cancer and VHL*, 10(3), 1.
27. Al-Bayati, O., Hasan, A., Pruthi, D., Kaushik, D., & Liss, M. A. (2019, June). Systematic review of modifiable risk factors for kidney cancer. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 37, No. 6, pp. 359-371). Elsevier.
28. Patel, H. V., Srivastava, A., Shinder, B., Sadimin, E., & Singer, E. A. (2019). Strengthening the foundation of kidney cancer treatment and research: revising the AJCC staging system. *Annals of Translational Medicine*, 7(Suppl 1).
29. Warren, A. Y., & Harrison, D. (2018). WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World journal of urology*, 36(12), 1913–1926. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2447-8>
30. Patel, H. V., Srivastava, A., Shinder, B., Sadimin, E., & Singer, E. A. (2019). Strengthening the foundation of kidney cancer treatment and research: revising the AJCC staging system. *Annals of Translational Medicine*, 7(Suppl 1).
31. Porta, C., Cosmai, L., Leibovich, B. C., Powles, T., Gallieni, M., & Bex, A. (2019). The adjuvant treatment of kidney cancer: a multidisciplinary outlook. *Nature Reviews Nephrology*, 15(7), 423-433.

32. Oto, J., Plana, E., Sánchez-González, J. V., García-Olaverri, J., Fernández-Pardo, Á., España, F., ... & Medina, P. (2020). Urinary microRNAs: looking for a new tool in diagnosis, prognosis, and monitoring of renal cancer. *Current urology reports*, 21(2), 1-8.
33. Usher-Smith, J. A., Li, L., Roberts, L., Harrison, H., Rossi, S. H., Sharp, S. J., ... & Stewart, G. D. (2022). Risk models for recurrence and survival after kidney cancer: a systematic review. *BJU international*, 130(5), 562-579.
34. Swami, U., Nussenzeig, R. H., Haaland, B., & Agarwal, N. (2019). Revisiting AJCC TNM staging for renal cell carcinoma: quest for improvement. *Annals of translational medicine*, 7(Suppl 1).
35. Sebastià, C., Corominas, D., Musquera, M., Paño, B., Ajami, T., & Nicolau, C. (2020). Active surveillance of small renal masses. *Insights into imaging*, 11(1), 1-18.
36. Campbell, S., Uzzo, R. G., Allaf, M. E., Bass, E. B., Cadeddu, J. A., Chang, A., ... & Pierorazio, P. M. (2017). Renal mass and localized renal cancer: AUA guideline. *The Journal of urology*, 198(3), 520-529.
37. Ljungberg, B., Albiges, L., Abu-Ghanem, Y., Bensalah, K., Dabestani, S., Fernández-Pello, S., ... & Bex, A. (2019). European association of urology guidelines on renal cell carcinoma: the 2019 update. *European urology*, 75(5), 799-810.
38. Lee, H., Lee, M., Lee, S. E., Byun, S. S., Kim, H. H., Kwak, C., & Hong, S. K. (2018). Outcomes of pathologic stage T3a renal cell carcinoma up-staged from small renal tumor: emphasis on partial nephrectomy. *BMC cancer*, 18, 1-7.
39. Vasudev, N. S., Wilson, M., Stewart, G. D., Adeyoku, A., Cartledge, J., Kimuli, M., ... & Banks, R. E. (2020). Challenges of early renal cancer detection: symptom patterns and incidental diagnosis rate in a multicentre prospective UK cohort of patients presenting with suspected renal cancer. *BMJ open*, 10(5), e035938.
40. Cosso, F., Roviello, G., Nesi, G., Shabani, S., Spatafora, P., Villari, D., & Catalano, M. (2023). Adjuvant Therapy for Renal Cell Carcinoma: Hype or Hope?. *International journal of molecular sciences*, 24(4), 4243. <https://doi.org/10.3390/ijms24044243>
41. Bahadoram, S., Davoodi, M., Hassanzadeh, S., Bahadoram, M., Barahman, M., & Mafakher, L. (2022). Renal cell carcinoma: an overview of the epidemiology, diagnosis, and treatment. *G Ital Nefrol*, 39(3), 1.

42. Znaor, A., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A., & Bray, F. (2015). International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *European urology*, 67(3), 519-530.
43. Shimizu, H., Hatakeyama, K., Saito, K., Shobatake, R., Takahashi, N., Deguchi, J., ... & Matintrooto, M. (2022). Age and composition of the thrombus retrieved by mechanical thrombectomy from patients with acute ischemic stroke are associated with revascularization and clinical outcomes. *Thrombosis Research*, 219, 60-69.
44. Fernandes, C. J., Morinaga, L. T., Alves, J. L., Castro, M. A., Calderaro, D., Jardim, C. V., & Souza, R. (2019). Cancer-associated thrombosis: the when, how and why. *European Respiratory Review*, 28(151).
45. Kim, K., Zhou, Q., Christie, A., Stevens, C., Ma, Y., Onabolu, O., ... & Malladi, S. (2021). Determinants of renal cell carcinoma invasion and metastatic competence. *Nature communications*, 12(1), 5760.
46. Leibovich, B. C., Lohse, C. M., Cheville, J. C., Potretzke, T. A., Tsivian, M., Shah, P. H., ... & Lyon, T. D. (2020). Renal cell carcinoma with inferior vena cava extension: can classification be optimized to predict perioperative outcomes?. *Kidney Cancer*, 4(2), 111-115.
47. Quencer KB, Friedman T, Sheth R, Oklu R. Tumor thrombus: incidence, imaging, prognosis and treatment. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2017 Dec;7(Suppl 3):S165-S177. doi: 10.21037/cdt.2017.09.16. PMID: 29399520; PMCID: PMC5778532.
48. Shi, X., Pang, Q., Nian, X., Jiang, A., Shi, H., Liu, W., ... & Zhang, W. (2023). Integrative transcriptome and proteome analyses of clear cell renal cell carcinoma develop a prognostic classifier associated with thrombus. *Scientific Reports*, 13(1), 9778.
49. Kim, K., Zhou, Q., Christie, A., Stevens, C., Ma, Y., Onabolu, O., ... & Malladi, S. (2021). Determinants of renal cell carcinoma invasion and metastatic competence. *Nature communications*, 12(1), 5760.
50. Campi, R., Tellini, R., Sessa, F., Mari, A., Cocci, A., Greco, F., ... & Minervini, A. (2019). Techniques and outcomes of minimally-invasive surgery for nonmetastatic renal cell carcinoma with inferior vena cava thrombosis: a systematic review of the literature. *Minerva urologica e nefrologica= The Italian journal of urology and nephrology*, 71(4), 339-358.
51. Beksac, A. T., Shah, Q. N., Paulucci, D. J., Lo, J. Z., Okhawere, K. E., Elbakry, A. A., ... & Badani, K. K. (2019, September). Trends and outcomes in contemporary management renal cell carcinoma and vena cava thrombus. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 37, No. 9, pp. 576-e17). Elsevier.

52. Cao, C., Bi, X., Liang, J., Li, L., Zhang, H., Xiao, Z., ... & Li, C. (2019). Long-term survival and prognostic factors for locally advanced renal cell carcinoma with renal vein tumor thrombus. *BMC cancer*, 19(1), 144.
53. Labbate, C., Hatogai, K., Wernitz, R., Stadler, W. M., Steinberg, G. D., Eggener, S., & Sweis, R. F. (2019). Complete response of renal cell carcinoma vena cava tumor thrombus to neoadjuvant immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7(1), 1-6.
54. Yoshida, K. (2023). Advances in Molecular-Targeted Therapies of Advanced Urological Cancers: Focus on Advanced Renal Cell Carcinoma. *Tokyo Women's Medical University Journal*, 2023001.
55. Shi, Y., Zhang, Q., Bi, H., Lu, M., Tan, Y., Zou, D., ... & Ma, L. (2022). Decoding the multicellular ecosystem of vena cava tumor thrombus in clear cell renal cell carcinoma by single-cell RNA sequencing. *Genome Biology*, 23(1), 87.
56. Yang, L., Liu, J., Li, S., Liu, X., Zheng, F., Xu, S., ... & Xiong, J. (2023). Based on disulfidptosis, revealing the prognostic and immunological characteristics of renal cell carcinoma with tumor thrombus of vena cava and identifying potential therapeutic target AJAP1. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 1-18.
57. Adrover, J. M., McDowell, S. A., He, X. Y., Quail, D. F., & Egeblad, M. (2023). NETworking with cancer: The bidirectional interplay between cancer and neutrophil extracellular traps. *Cancer Cell*.
58. Zhang, Y., Guo, L., Dai, Q., Shang, B., Xiao, T., Di, X., ... & Wang, Y. (2022). A signature for pan-cancer prognosis based on neutrophil extracellular traps. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 10(6).
59. Patel, S., Fu, S., Mastio, J. et al. Unique pattern of neutrophil migration and function during tumor progression. *Nat Immunol* 19, 1236–1247 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0229-5>.
60. Matlung, H.L., Babes L., Zhao X.W., van Houdt M., Treffers L.W., van Rees D.J., Franke K., Schornagel K., Verkuijlen P., Janssen H., et al.. 2018. Neutrophils kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis. *Cell Rep*. 23:3946–3959.e6. 10.1016/j.celrep.2018.05.082.
61. Silva, C. M. S., Wanderley, C. W. S., Veras, F. P., Sonego, F., Nascimento, D. C., Gonçalves, A. V., ... & Cunha, F. Q. (2021). Gasdermin D inhibition prevents multiple organ dysfunction during sepsis by blocking NET formation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 138(25), 2702-2713.

62. Ambarwati, N. S. S., Desmiaty, Y., Ahmad, I., Samsul, E., & Ramadhan, A. M. (2023). Elastase and COVID-19 relationship, and potential natural resource as elastase inhibitors: A comprehensive review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*.
63. Vorobjeva, N. V., & Chernyak, B. V. (2020). NETosis: molecular mechanisms, role in physiology and pathology. *Biochemistry (Moscow)*, 85, 1178-1190.
65. Xu, X., Wu, Y., Xu, S., Yin, Y., Ageno, W., De Stefano, V., ... & Qi, X. (2022). Clinical significance of neutrophil extracellular traps biomarkers in thrombosis. *Thrombosis Journal*, 20(1), 63.
66. Gershkovitz, M., Caspi, Y., Fainsod-Levi, T., Katz, B., Michaeli, J., Khawaled, S., ... & Granot, Z. (2018). TRPM2 mediates neutrophil killing of disseminated tumor cells. *Cancer research*, 78(10), 2680-2690.
67. Bouti, P., Zhao, X. W., Verkuijlen, P. J., Tool, A. T., Van Houdt, M., Köker, N., ... & van den Berg, T. K. (2021). Kindlin3-Dependent CD11b/CD18-Integrin Activation Is Required for Potentiation of Neutrophil Cytotoxicity by CD47–SIRP α Checkpoint Disruption. *Cancer immunology research*, 9(2), 147-155.
68. Nie, M., Yang, L., Bi, X., Wang, Y., Sun, P., Yang, H., ... & Jiang, W. (2019). Neutrophil extracellular traps induced by IL8 promote diffuse large B-cell lymphoma progression via the TLR9 signaling. *Clinical Cancer Research*, 25(6), 1867-1879.
69. Xiong, S., Dong, L., & Cheng, L. (2021). Neutrophils in cancer carcinogenesis and metastasis. *Journal of hematology & oncology*, 14(1), 1-17.
70. SenGupta, S., Hein, L. E., & Parent, C. A. (2021). The recruitment of neutrophils to the tumor microenvironment is regulated by multiple mediators. *Frontiers in Immunology*, 12, 734188.
71. Albregues, J., Shields, M. A., Ng, D., Park, C. G., Ambrico, A., Poindexter, M. E., ... & Egeblad, M. (2018). Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science*, 361(6409), eaao4227.
72. Tatsumi, K. (2024). The pathogenesis of cancer-associated thrombosis. *International Journal of Hematology*, 1-10.
73. Rosell, A., Gautam, G., Wannberg, F., Ng, H., Gry, H., Vingbäck, E., ... & Thålin, C. (2023). Neutrophil extracellular trap formation is an independent risk factor for occult cancer in patients presenting with venous thromboembolism. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 21(11), 3166-3174.

74. Donati, M. B., & Lorenzet, R. (2012). Thrombosis and cancer: 40 years of research. *Thrombosis research*, 129(3), 348-352.
75. Raposo, G., & Stahl, P. D. (2019). Extracellular vesicles: a new communication paradigm?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(9), 509-510.
76. Herrmann, I. K., Wood, M. J. A., & Fuhrmann, G. (2021). Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nature nanotechnology*, 16(7), 748-759.
77. Kao, C. Y., & Papoutsakis, E. T. (2019). Extracellular vesicles: exosomes, microparticles, their parts, and their targets to enable their biomanufacturing and clinical applications. *Current opinion in biotechnology*, 60, 89-98.
78. Stahl, P. D., & Raposo, G. (2019). Extracellular vesicles: exosomes and microvesicles, integrators of homeostasis. *Physiology*.
79. Di Bella, M. A. (2022). Overview and update on extracellular vesicles: Considerations on exosomes and their application in modern medicine. *Biology*, 11(6), 804.
80. Nederveen, J. P., Warnier, G., Di Carlo, A., Nilsson, M. I., & Tarnopolsky, M. A. (2021). Extracellular vesicles and exosomes: insights from exercise science. *Frontiers in physiology*, 11, 604274.
81. Verdera, H. C., Gitz-Francois, J. J., Schiffelers, R. M., & Vader, P. (2017). Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*, 266, 100-108.
82. Bruno, S., Grange, C., Deregibus, M. C., Calogero, R. A., Saviozzi, S., Collino, F., ... & Camussi, G. (2009). Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(5), 1053-1067.
83. Barreca, M. M., Cancemi, P., & Geraci, F. (2020). Extracellular Vesicles: The New Frontier of Stem Cell Regenerative Medicine?.
84. Chen, K., Li, Y., Xu, L., Qian, Y., Liu, N., Zhou, C., ... & Ge, Y. Z. (2022). Comprehensive insight into endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles as a promising candidate for disease treatment. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 238.
85. Zhu, S., Li, S., Yi, M., Li, N., & Wu, K. (2021). Roles of microvesicles in tumor progression and clinical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 7071-7090.

86. Karpman, D., Ståhl, A. L., & Arvidsson, I. (2017). Extracellular vesicles in renal disease. *Nature Reviews Nephrology*, 13(9), 545.
87. Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., ... & Théry, C. (2016). Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(8), E968-E977.
88. Kao, C. Y., & Papoutsakis, E. T. (2019). Extracellular vesicles: exosomes, microparticles, their parts, and their targets to enable their biomanufacturing and clinical applications. *Current opinion in biotechnology*, 60, 89-98.
89. Aharon, A., & Brenner, B. (2009). Microparticles, thrombosis and cancer. *Best practice & research Clinical haematology*, 22(1), 61-69.
90. Garnier, D., Magnus, N., Lee, T. H., Bentley, V., Meehan, B., Milsom, C., ... & Rak, J. (2012). Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor. *Journal of Biological Chemistry*, 287(52), 43565-43572.
91. Muhsin-Sharafaldine, M. R., Saunderson, S. C., Dunn, A. C., Faed, J. M., Kleffmann, T., & McLellan, A. D. (2016). Procoagulant and immunogenic properties of melanoma exosomes, microvesicles and apoptotic vesicles. *Oncotarget*, 7(35), 56279.
92. Chen, K., Li, Y., Xu, L., Qian, Y., Liu, N., Zhou, C., ... & Ge, Y. Z. (2022). Comprehensive insight into endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles as a promising candidate for disease treatment. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 238.
93. Dudiki, T., Veleparambil, M., Zhevlakova, I., Biswas, S., Klein, E. A., Ford, P., ... & Byzova, T. V. (2023). Mechanism of tumor-platelet communications in cancer. *Circulation research*, 132(11), 1447-1461.
94. Gomes, F. G., Sandim, V., Almeida, V. H., Rondon, A. M., Succar, B. B., Hottz, E. D., ... & Monteiro, R. Q. (2017). Breast-cancer extracellular vesicles induce platelet activation and aggregation by tissue factor-independent and-dependent mechanisms. *Thrombosis research*, 159, 24-32.
95. Liu, Y., Wu, W., Cai, C., Zhang, H., Shen, H., & Han, Y. (2023). Patient-derived xenograft models in cancer therapy: Technologies and applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 160.
96. Abdolahi, S., Ghazvinian, Z., Muhammadnejad, S., Saleh, M., Asadzadeh Aghdai, H., & Baghaei, K. (2022). Patient-derived xenograft (PDX) models,

applications and challenges in cancer research. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 206.

97. Rygaard, J., & Poulsen, C. O. (1969). Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 77(4), 758-760.

98. The Jackson Laboratory. [jax.org](https://www.jax.org), (2024). Disponível em: <https://www.jax.org/strain/005557>

99. Collins, A. T., & Lang, S. H. (2018). A systematic review of the validity of patient derived xenograft (PDX) models: the implications for translational research and personalised medicine. *PeerJ*, 6, e5981.

100. Beserra, A. O., Estevan, E. C., Bezerra, S. M., Torrezan, G. T., Ikegami, A., Dellê, H., ... & Santos, T. G. (2022). Patient-derived renal cell carcinoma xenografts capture tumor genetic profiles and aggressive behaviors. *Kidney Cancer*, 6(1), 11-22.

101. Abdolahi, S., Ghazvinian, Z., Muhammadnejad, S., Saleh, M., Asadzadeh Aghdai, H., & Baghaei, K. (2022). Patient-derived xenograft (PDX) models, applications and challenges in cancer research. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 206.

102. Okada, S., Vaeteewoottacharn, K. & Kariya, R. Application of Highly Immunocompromised Mice for the Establishment of Patient-Derived Xenograft (PDX) Models. *Cells* 8, 889 (2019).

103. Park, J. Y., Jeong, A. L., Joo, H. J., Han, S., Kim, S. H., Kim, H. Y., ... & Yang, Y. (2018). Development of suspension cell culture model to mimic circulating tumor cells. *Oncotarget*, 9(1), 622.

104. Kolman, J. P., Pagerols Raluy, L., Müller, I., Nikolaev, V. O., Trochimiuk, M., Appl, B., ... & Trah, J. (2022). Net release of long-term surviving neutrophils. *Frontiers in Immunology*, 13, 815412.

105. Herre, M., Cedervall, J., Mackman, N., & Olsson, A. K. (2023). Neutrophil extracellular traps in the pathology of cancer and other inflammatory diseases. *Physiological Reviews*, 103(1), 277-312.

106. Mauracher, L. M., Posch, F., Martinod, K., Grilz, E., Däullary, T., Hell, L., ... & Thaler, J. (2018). Citrullinated histone H3, a biomarker of neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of venous thromboembolism in cancer patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16(3), 508-518.

107. Carminita, E., Crescence, L., Panicot-Dubois, L., & Dubois, C. (2022). Role of neutrophils and NETs in animal models of thrombosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1411.
108. Xie, R., Shang, B., Shi, H., Bi, X., Song, Y., Qu, W., ... & Shou, J. (2023). Neutrophil extracellular traps in relationship to efficacy of systemic therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Medicine*.
109. He, Y., & Wu, Q. (2023). The effect of extracellular vesicles on thrombosis. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 16(3), 682-697.
110. Zhu C, Xu S, Jiang R, Yu Y, Bian J, Zou Z. The gasdermin family: emerging therapeutic targets in diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Apr 8;9(1):87. doi: 10.1038/s41392-024-01801-8. PMID: 38584157; PMCID: PMC10999458.
111. Demkow U. Molecular Mechanisms of Neutrophil Extracellular Trap (NETs) Degradation. *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 3;24(5):4896. doi: 10.3390/ijms24054896. PMID: 36902325; PMCID: PMC10002918.